

북방대합, *Spisula sachalinensis* 수정을 위한 최적방법

이정용⁺ · 장윤정* · 전민지* · 장해진* · 장영진*
국립수산진흥원 강릉수산종묘시험장, *부경대학교 양식학과

Optimal Method for Fertilization of Surf Clam, *Spisula sachalinensis*

Jeong Yong LEE⁺, Yun Jeong CHANG*, Min Jee CHUN*
Hae Jin CHANG* and Young Jin CHANG*

Kangnung Hatchery, NFRDI, Kangnung 210-807, Korea
*Department of Aquaculture, Pukyong National University,
Busan 608-737, Korea

In order to obtain the basic information for the seedling production of surf clam, *Spisula sachalinensis*, sperm motility and optimal method for fertilization were investigated. Sperm concentration of *S. sachalinensis* milt was 2.02×10^{10} cell/mL and approximately 96.0% of sperm showed forward movement after exposure to seawater. When sperm and eggs obtained by incision method were fertilized in 1 hour and 4 hours, respectively, high fertilization and hatching rate were achieved. The optimal sperm concentrations and egg density for fertilization and hatching were 10~100 inds./egg and 100~200 inds./mL sea water, respectively.

Key words: Surf clam, *Spisula sachalinensis*, Fertilization

서 론

북방대합, *Spisula sachalinensis*은 일본 북부, 사할린, 한국 동해 북부연안의 수심 8~20 m 모래바닥에 서식하는 개량조개과의 비부착성 조개류로서 각장 10~12 cm, 중량 200~500 g에 이르는 대형종이며 (Lee et al., 1997), 바닥뿌림식 양식이 가능한 매체동물 (Infauna)이기 때문에 풍파가 심한 동해안 해역에 가장 적합한 증양식 개발대상종이라 할 수 있다. 북방대합의 자원증대 및 양식을 위해서는 안정적인 종묘의 확보가 이루어져야 하며, 이를 위해서는 인공 종묘의 생산이 필수적이다. 조개류의 인공 종묘생산을 위해서는 수정에서 유생단계까지의 초기 성장과 생존율을 높여야 하므로 양질의 알과 정자를 이용한 최적의 수정으로 건강한 수정란 확보가 우선적으로 이루어져야 한다.

일반적으로 체외수정을 하는 조개류에서 정자와 난자가 만나는 최종단계는 수서 환경이다. 체외로 방출된 정자는 방향성 없이 무작위적으로 헤엄쳐 움직이나, 한번 방출되는 정자의 수가 많기 때문에 알과의 수정이 가능하며, 더욱이 알의 용적은 체세포에 비하여 아주 크기 때문에 비교적 쉽게 정자의 표적이 될 수 있다. 그러나 방란 방정된 알과 정자는 일정시간 후에는 수정 능력이나 운동성을 상실하기 때문에 수정률 및 부화율 감소의 원인이 되고 있다. 그리고 하나의 알에 다수의 정자가 수정하는 다정수정 (polyspermy)의 가능성 또한 높다고 할 수 있는데, 다정수정과 비정상적인 난할은 높은 상관관계를 나타냄으로 대부분의 종에 있어 다정수정 방지는 정상적인 발생의 기본이다 (Stephano and Gould, 1988). 따라서 다정수정을 방지하기 위해서는 알에 대한 정자의 적정 농도 및 매정시간을 결정하는 것이 매우 중요하다.

조개류의 수정과 발생에 관해서는 왕가리비, *Pecten maximus* (Gruffydd and Beaumont, 1970), 가무락, *Cyclina sinensis* (Choi and Song, 1973), 참굴, *Crassostrea gigas* (Staeger and Horton, 1976; Stephano and Gould, 1988), 지중해담치, *Mytilus galloprovincialis* (Dufresne-Dube et al., 1983), 북미산 북방대합 *Spisula solidissima* (Clotteau and Dube, 1993), 바닷굴, *Crassostrea nippona* (Yoo and Kang, 1996) 등의 연구가 있으나 양질의 수정란 확보를 위한 수정방법에 관한 연구는 드문 편이다.

따라서 이 연구에서는 북방대합의 정자 운동성 및 수정률과 부화율 향상을 위한 수정방법을 조사하였다.

재료 및 방법

실험은 2000년 5월 하순 강원도 양양군 현남면 연안에서 형망으로 채취된 북방대합을 실내수조에 수용하여 실시하였다.

1. 정자 운동성

정액의 농도는 충분히 성숙한 수컷 어미로부터 해수가 섞이지 않도록 절개법으로 채정한 원정액을 여과해수로 희석한 후 2% eosin 용액으로 정자를 염색한 다음, 광학현미경 아래에서 혈구계산판으로 계수하여 계산하였다. 정자의 운동성은 원정액 및 채정 직후 해수 중에 희석한 정액을 실온 (20°C)에 보관하며 채정 직후, 1시간 후, 2시간 후, 3시간 후, 4시간 후 및 5시간 후에 현미경하에서 전진운동하는 정자의 비율을 3회 측정하여 평균을 계산하여 조사하였다.

2. 체란 및 채정후 경과시간에 따른 수정률과 부화율

절개법으로 채란된 알의 경과시간에 따른 수정능력을 파악하기

⁺Corresponding author: jylee@nfrda.re.kr

위하여 채란 직후, 1시간 후, 2시간 후, 3시간 후 및 4시간 후에 수정하여 수정률과 부화율을 조사하였다. 채란 후 알은 해수에 수용하여 실온 (20℃)에 보관하였으며, 인공수정을 위하여 물러가제로 알을 거른 다음, 여과 살균 해수가 들어있는 1L 비이커에 넣어 정액과 혼합하였다. 수정시 알의 수용밀도는 100개/mL였으며, 정자는 수정 직전에 절개법으로 채정하여 운동성을 확인한 후 사용하였으며, 정자농도는 알 1개당 정자 100개의 비율로 하였다. 수정률은 수정 20분 후에 세란하여 발생중인 알의 비율로 하였으며, 부화율은 veliger 유생기까지의 생존율로서 계산하였다.

절개법으로 채정한 정자의 경과시간에 따른 수정능력을 파악하기 위하여 채정 직후, 1시간 후, 2시간 후, 3시간 후 및 4시간 후에 수정하여 수정률과 부화율을 조사하였다. 채정한 정액은 해수에 희석하여 실온 (20℃)에서 보관하면서 수정에 사용하였으며, 알은 수정 직전에 절개법으로 채란하여 사용하였다. 실험 방법 및 환경은 채란 후 경과시간에 따른 실험과 동일하게 하였다.

3. 정자농도 및 매정시간에 따른 수정률과 부화율

인공 수정시 최적 정자농도를 조사하기 위하여 알 1개당 정자 1, 10, 100, 1,000, 10,000개의 비율이 되도록 알과 정자를 수정하여 수정률과 부화율을 조사하였다. 실험은 수온 20℃의 여과 살균 해수가 들어있는 1L 비이커에 절개법으로 채란된 알을 100개/mL의 밀도로 수용한 후 절개법으로 채정된 원정액을 각각의 비율로 해수에 희석하여 운동성을 확인한 다음 첨가하여 실시하였다. 수정률은 수정 20분 후에 세란하여 발생 중인 알의 비율로 하였으며, 부화율은 벨리저유생기까지의 생존율로서 계산하였다.

수정 후 세란까지의 매정시간에 따른 수정률과 부화율을 조사하기 위하여 절개법으로 얻어진 알과 정자를 채란 채정 30분 후에 1:100의 비율로 수정한 다음, 10, 20, 30, 60, 120 및 240분 후에 세란하여 수정율을 조사하였으며, 부화율은 veliger 유생기까지의 생존율로서 계산하였다. 인공수정은 여과 살균한 20℃의 해수가 들어있는 1L 비이커에서 실시하였으며, 이 때 알의 수용밀도는 mL당 100개로 하였다.

4. 알의 수용밀도에 따른 수정률과 부화율

인공 수정시 알의 최적 수용밀도를 조사하기 위하여 mL당 20, 100, 200, 400, 800 및 1,600개의 밀도로 수용하여 수정한 후 수정률과 부화율을 조사하였다. 실험은 수온 20℃, 염분 34‰의 여과 살균 해수가 들어있는 1L 비이커를 사용하여 3반복 실험을 실시하였다. 수정은 절개법으로 채란 및 채정된 알과 정자를 사용하였으며, 알 1개당 정자 100개의 비율로 하였다. 수정률은 수정 20분 후에 세란하여 발생중인 알의 비율로 하였으며, 부화율은 veliger 유생기까지의 생존율로서 계산하였다.

결 과

1. 정자 운동성

절개법으로 채정된 북방대합 원정액의 정자 농도는 2.02×10^{10} /mL였으며, 채정 직후 운동성은 원정액이나 해수중에 희석된 정액

모두 96.0%의 정자가 전진운동을 하였다. 그러나 채정 1시간 후에는 해수중에 희석한 정자가 60.7%, 그리고 원정액 상태로 보존한 정자가 42.0%로 운동성이 감소하였으며, 채정 2시간 후에는 각각 42.5%와 23.0%로 감소하였다. 채정 3시간 후에는 해수중에 희석한 정자와 원정액 상태의 정자 모두 20% 이하의 운동성을 보였으며, 채정 4시간 후에는 해수중에 희석한 정자만이 5.3%의 낮은 운동성을 보였다 (Fig. 1).

2. 채란 및 채정후 경과시간에 따른 수정률과 부화율

절개법으로 채란한 알의 채란 직후 수정률은 94.7%였으며 채란 4시간 후까지도 94.6% 이상으로서, 채란 4시간까지는 경과시간에 따른 수정률의 차이가 없었다. 또한 부화율에 있어서도 채란 직후에 수정시킨 알 (87.2%)과 채란 4시간 후에 수정시킨 알 (87.8%) 사이에 큰 차이가 없었다 (Fig. 2). 그러나 절개법으로 채정한 정자의 경우, 경과시간에 따른 수정률이 채정 직후와 1시간 후에는 96.7%와 96.1%로 높았으나 2시간 후부터 72.1%로 감소하기 시작

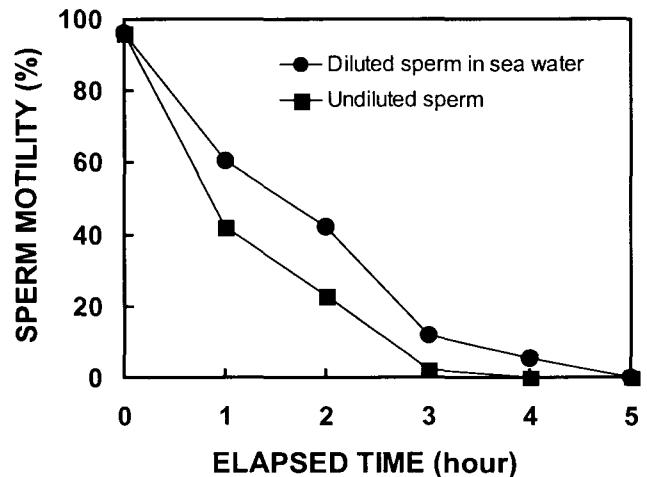


Fig. 1. Variations of sperm motility by elapsed time after spawning the diluted sperm in sea water and undiluted sperm of *Spisula sachalinensis*.

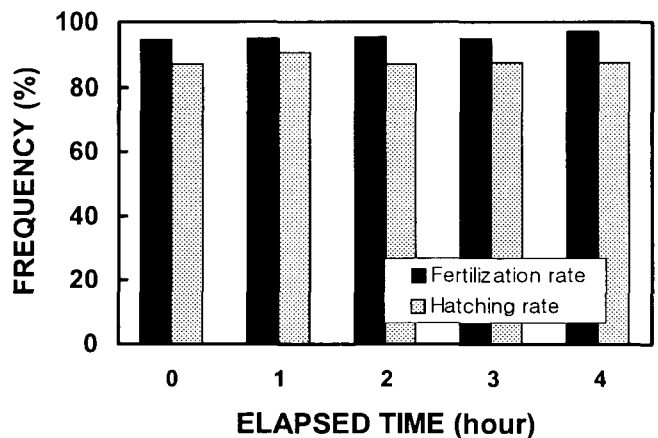


Fig. 2. Fertilization and hatching rate of *Spisula sachalinensis* by elapsed time after spawning.

하여 3시간 후와 4시간 후에는 각각 27.7%와 23.4%로 매우 낮아졌다. 부화율에 있어서도 채정 직후 수정시킨 정자에서는 84.6%로 높게 나타났으나 2시간 후에 수정시킨 정자에서는 62.7%로 감소하였으며, 3시간과 4시간 후에 수정시킨 정자에서는 각각 3.1%와 0%로 급격히 감소하였다 (Fig. 3).

3. 정자농도 및 매정시간에 따른 수정률과 부화율

정자 농도에 따른 수정률과 부화율을 조사한 결과, 알 1개당 정자 1개의 비율로 수정한 경우 수정률과 부화율은 51.6%와 47.5%로 낮게 나타났으며, 10개의 비율로 수정한 경우 수정률과 부화율은 99.0%와 87.7%로 나타났다. 한편, 100개, 1,000개 및 10,000개의 비율로 수정한 경우 수정률은 모두 95% 이상으로 차이를 보이지 않았으나, 부화율에 있어서는 각각 85.3%, 78.9% 및 70.9%로 정자 비율이 높을수록 낮게 나타났다 (Fig. 4).

매정시간에 따른 수정률과 부화율을 조사한 결과, 수정률은 60분까지는 96.8% 이상으로 높게 나타났으나 120분 및 240분 후에는 88.4%로 감소하였다. 부화율에 있어서도 수정 후 60분까지는 84.4%

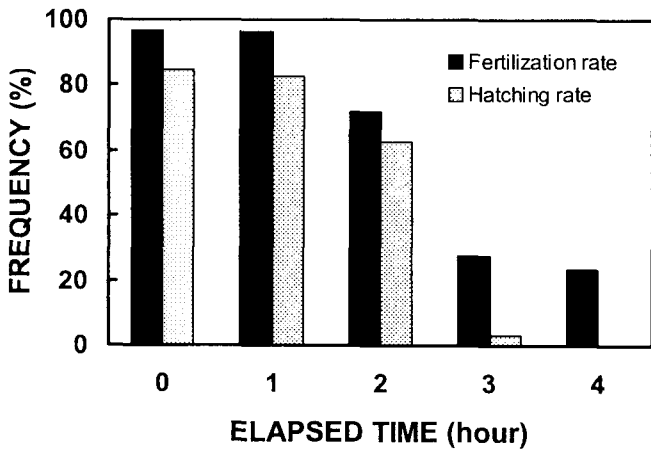


Fig. 3. Fertilization and hatching rate of *Spisula sachalinensis* by elapsed time after sperm induction.

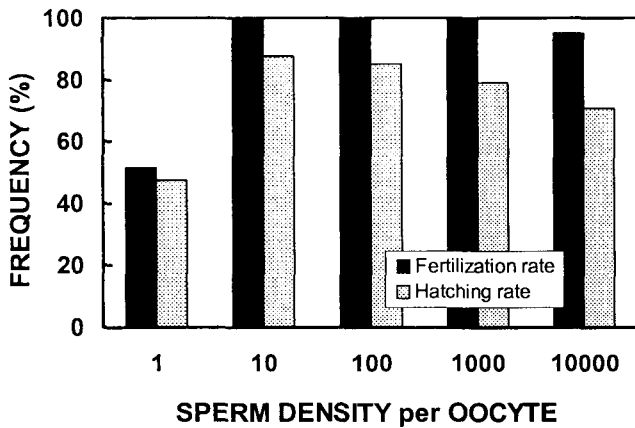


Fig. 4. Fertilization and hatching rate of *Spisula sachalinensis* by sperm density per oocyte in fertilization.

이상으로 높았으나 120분과 240분 후에는 78.5%와 68.2%로 낮게 나타났다 (Fig. 5).

4. 알의 수용밀도에 따른 수정률과 부화율

알의 수용밀도에 따른 수정률과 부화율은 mL당 20개의 알을 수용하였을 때, 각각 91.6%와 78.0%를 보였으며, mL당 100개의 알을 수용하였을 때는 각각 92.2%와 86.9%로 나타났다. 또한 알의 수용밀도를 mL당 200개, 400개, 800개 및 1,600개로 하여 수정하였을 때 수정률은 94.3% 이상으로 높게 나타났으나, 부화율은 각각 84.1%, 78.5%, 68.3% 및 49.1%로 알의 수용 밀도가 높을수록 낮게 나타났다 (Fig. 6).

고찰

수정이란 반수체 (haploid)의 두 배우자, 즉 난자와 정자가 융합하여 배수체 (diploid)의 접합자가 되는 것을 말하며, 이로서 접합자 (수정란)는 개체발생을 시작하게 된다 (김, 1994). 그러므로 양질의 수정란 확보를 위해서는 수정의 최적 조건이 밝혀져야

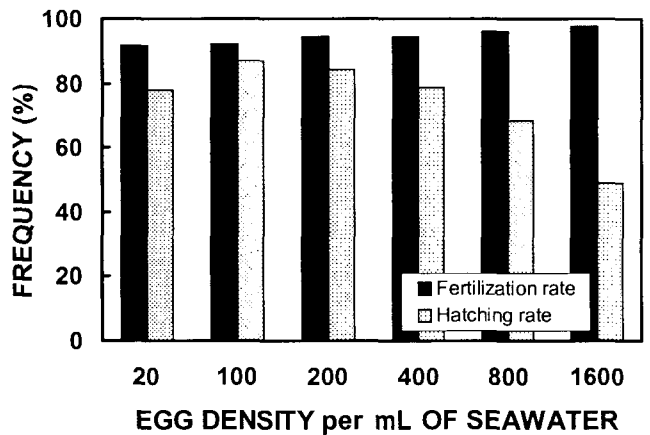


Fig. 5. Fertilization and hatching rate of *Spisula sachalinensis* by elapsed time from fertilization to egg washing.

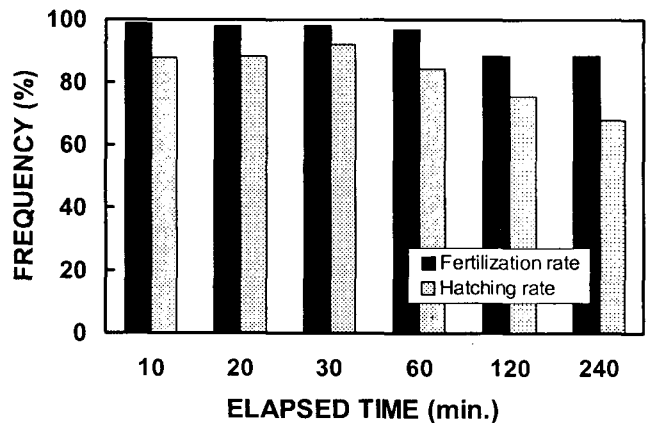


Fig. 6. Fertilization and hatching rate of *Spisula sachalinensis* by egg density per mL of seawater in fertilization.

한다. 조개류 중 버지니아 굴, *Crassostrea virginica*의 경우 산란된 알이나 적출한 알은 해수중에서 난핵포 붕괴가 일어나며, 정자가 없는 해수에서 배양될 때 감수분열 중기 I에서 발생이 정지됨으로 (Longwell et al., 1967; Osanai, 1985), 정상적인 수정과 발생이 이루어지기 위해서는 산출된 알은 일정 시간 내에 수정이 이루어져야 한다.

체외수정을 하는 어류의 경우, 배정된 정자는 체외로 방출되기 전까지는 정소 내에서 운동이 억제되어 운동 에너지원인 ATP를 보존하며, 환경수에 방출되어질 때 운동이 개시된다 (Morisawa and Morisawa, 1990). 조개류의 정자 운동성에 관한 연구는 많지 않으며, 이 연구에서 북방대합의 정자는 생식소로부터 적출 직후 해수와 희석되지 않은 원정액 상태에서도 운동이 시작되어 96% 이상의 정자가 전진운동을 하였으며, 해수와 희석한 1시간 및 2시간 후에는 약 60%와 40%로 감소하였다. 또한 북방대합 정자는 해수에 희석하지 않은 원정액보다 해수에 희석한 조건에서 운동성이 활발하였으며, 운동시간도 오랫동안 지속되었다.

채란후 경과시간에 따른 수정률과 부화율을 조사한 결과에서 채란 직후부터 4시간까지는 큰 차이를 보이지 않은 반면, 채정후 경과시간에 따른 부화율에 있어서는 채정 직후 수정시킨 정자에서는 84.6%로 높게 나타났으나 2시간 후에 수정시킨 정자에서는 62.7%로 감소하였으며, 3시간과 4시간 후에 수정시킨 정자에서는 각각 3.1%와 0%로 급격히 감소하였다. 비록 이 연구에서 사용된 정자와 알이 서로 다른 개체로부터 얻어진 것이었으나 정자의 운동성 및 알의 상태를 확인하고 수정하였으며, 채란 후 경과시간에 따른 조사에서 수정률 및 부화율에서 차이를 보이지 않음으로써 개체간의 차이는 없는 것으로 판단되므로 알은 채란 4시간까지는 수정 능력에 차이가 없으며, 정자는 채정 1시간 이내에 수정하는 것이 효과적이었다. 한편 Stephano and Gould (1988)는 참굴의 수정시 난소로부터 적출한 후 즉시 수정된 알은 다정수정 가능성이 높기 때문에 부화율이 낮은 반면, 방란된 알은 다정수정이 억제되어 부화율이 높다고 하였으며, Alliegro and Wright (1983)는 방란되거나 절개법으로 채란한 참굴의 알이 해수에서 1.5시간 배양할 때 다정수정의 가능성이 감소한다고 하였다. 이 연구에서는 절개법으로 채란한 알을 사용함으로써 채란 직후에는 다정수정의 가능성이 높을 수 있으나 채란 직후부터 4시간까지는 수정률 및 부화율에서 차이를 보이지 않았다. 그러므로 북방대합의 채란 후 경과시간에 따른 다정수정을 방지하기 위한 알의 반응에 대해서는 더욱더 세분화된 연구가 요구된다.

조개류의 난모세포는 다정수정 방지 기능이 미약하여 부화율의 감소 원인이 되고 있으며 (Longo, 1972; Dufresne-Dube et al., 1983), Stephano and Gould (1988)는 다정수정은 수정시 알에 대한 정자비와 대수함수관계라고 보고하였다. Santos and Nascimento (1985)는 굴의 수정에서 50% 이상의 정상적인 veliger 유생을 얻기 위한 알과 정자의 비율을 1:100~5,000으로 보고하였으나, 이 연구에서 북방대합의 부화율은 알과 정자의 비율이 1:10~100일 때 85% 이상의 나타났으며, 1:1,000~10,000의 비율에서는 부화율이 감소하였다. 또한 1:1의 비율에서는 51.6%와 47.5%의 수정률과 부화율을 보임으로써, 낮은 정자 농도에서는 알과 정자가 만날

확률이 낮다는 것을 알 수 있었다. 또한 수정시킨 후 세란까지의 매정시간에 따른 부화율에 있어서도 수정 1시간 이내에는 80% 이상이었으나 4시간 후에는 68.2%로 낮아짐으로써, 수정 후 남은 정자의 세란은 높은 생존율을 위한 중요한 과정으로 판단된다. 따라서 북방대합의 수정을 위해서는 알 1개에 정자 10~100개의 비율로 수정하여 수정 1시간 이내에 세란하는 것이 효과적인 것으로 판단된다.

알의 수용밀도에 따른 실험 결과, 밀도가 높을수록 수정률이 높게 나타나거나 차이가 없는 반면, 부화율은 낮게 나타남으로써 밀도가 높으면 알과 정자가 만날 수 있는 확률이 높으나 수정 후 발생을 위해서는 낮은 밀도가 효과적인 것으로 생각된다. 그러나 인공 종묘생산을 위한 수정란의 부화는 시설면적에 따른 경제성을 고려하여 100~200개/mL의 밀도를 유지하는 것이 효과적인 것으로 판단된다.

이상과 같이 이 연구에서는 북방대합 인공 종묘생산을 위한 기초연구로서 양질의 수정란 확보를 위하여 최적 수정방법을 구명하였으므로 양식생산자에 의해 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

요 약

이 연구에서 북방대합의 정자 운동성 및 수정률과 부화율 향상을 위한 수정방법을 조사하였다. 북방대합 원정액의 정자 농도는 2.02×10^{10} /mL였으며, 채정 직후에는 원정액이나 해수중의 정액에서 모두 96.0%의 정자가 전진운동을 하였다. 절개법으로 얻어진 알과 정자는 각각 채란 4시간 이내에, 채정 1시간 이내에 수정하는 것이 효과적이었다. 인공수정을 위한 알 1개에 대한 정자수는 10~100개에서 수정률과 부화율이 모두 높았으며, 수정 후 1시간 이내에 세란하는 것이 효과적이었다. 최적의 수정 및 발생을 위한 알의 수용밀도는 100~200개/mL였다.

참 고 문 헌

- Alliegro, M.C. and M.A. Wright. 1983. Polyspermy inhibition in the oyster, *Crassostrea virginica*. J. Exp. Zool., 227, 127~137.
- Choi, S.S. and Y.K. Song. 1973. Studies on the artificial fertilization and development of *Cyclina sinensis*. Bull. Korean Fish. Soc., 6, 76~80 (in Korean).
- Clotteau, G. and F. Dube. 1993. Optimization of fertilization parameters for rearing surf clams (*Spisula solidissima*). Aquaculture, 114, 339~353.
- Dufresne-Dube, L., F. Dube, P. Guerrier and P. Couillard. 1983. Absence of a complete block to polyspermy after fertilization of *Mytilus galloprovincialis* (mollusca pelecypoda) oocytes. Develop. Biol., 97, 27~33.
- Gruffydd, L.D. and A.R. Baumont. 1970. Determination of the potassium concentration of eggs and spermatozoa for the production of normal larvae in *Pecten maximus* (mollusca, lamellibranchia). Helgolander Wiss. Meeresunters, 20, 486~497.
- Lee, J.Y., Y.J. Chang and C.S. Lee. 1997. Reproductive cycle of surf clam, *Spisula sachalinensis*. J. Korean Fish. Soc., 30, 132~138

- (in Korean).
- Longo, F.J. 1972. An ultrastructural analysis of polyspermy in the surf clam, *Spisula solidissima*. J. Exp. Zool., 183, 153~180.
- Longwell, A.C., S.S. Stiles and D.G. Smith. 1967. Chromosome complement of the american oyster, *Crassostrea virginica*, as soon in meiotic and cleaving eggs. Can. J. Genet. Cytol., 9, 845~856.
- Morisawa, M. and S. Morisawa. 1990. In "Control of sperm motility: Biological and clinical aspects" Ed by C. Gagnon, CRC Press, Boca Raron, pp. 137~152.
- Osanai, K. 1985. *In vitro* induction of germinal vesicle breakdown in oyster oocytes. Bull. Mar. Biol. Stn. Asamushi, Tohoku Univ., 18, 1~9.
- Santos, A.E. and I.A. Nascimento. 1985. Effects of gamete density, salinity and temperature on the normal embryonic development of the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorea* Guilding. Aquaculture, 47, 335~352.
- Staeger, W.H. and H.F. Horton. 1976. Fertilization method quantifying gamete concentrations and maximizing larvae production in *Crassostrea gigas*. U.S. Natl. Mar. Fish. Serv. Fish. Bull., 74, 698~701.
- Stephano, J.L. and M. Gould. 1988. Avoiding polyspermy in the oyster (*Crassostrea gigas*). Aquaculture, 73, 295~307.
- Yoo, S.K. and K.H. Kang. 1996. Spawning induction according to stimulating treatment and influence of water temperature on egg development and larvae rearing of oyster, *Crassostrea nippona*. Korean J. Malacol., 12, 91~97 (in Korean).
- 김문규. 1994. 수정. 조완규 편저 발생생물학, pp. 201~231.

2001년 11월 10일 접수
2002년 3월 12일 수리