

결빙억제제의 종류, 농도 및 침지시간이 참전복 *Haliotis discus hannai* 발생배의 생존활성에 미치는 영향

정종균^{1,2} · 임한규² · 손맹현² · 김종현² · 정민환² · 장영진^{1,*}

¹부경대학교 해양바이오신소재학과, ²국립수산과학원 전략양식연구소 양식관리과

Effects of Concentration and Immersion Time of Three Cryoprotective Agents on the Embryos Development of Abalone *Haliotis discus hannai*

Jong Kyun Chung^{1,2}, Han Kyu Lim², Maeng-Hyun Son², Jong-Hyun Kim²,
Min Hwan Jeong² and Young Jin Chang^{1,*}

¹Dept. of Marine Bio-materials and Aquaculture, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

²Aquaculture Management Division, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-705, Korea

ABSTRACT : The tolerance evaluation for abalone *Haliotis discus hannai* embryos was performed using different concentrations of cryoprotective agents (CPAs): dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol added to 0.2 M sucrose, respectively. 4-cell, trochophore and veliger were exposed in each CPA with different concentration for 10, 20 and 30 minutes of immersion time. Developmental rates were increased with decreased concentration of every CPA and decreased immersion time, and differed from types of CPA. Developmental rates of veliger in all the CPAs were higher than those of 4-cell and trochophore. The developmental rates and larval activity indices in ethylene glycol were comparatively higher than those in other CPAs and the effective CPA and its concentration for the cryopreservation of the abalone embryos was suggested as 2.0 M ethylene glycol with equilibration time of 30 minutes.

Key words : Abalone, *Haliotis discus hannai*, Embryo, Development, CPA, Immersion test, Cryopreservation.

요 약 : 결빙억제제(CPA)의 종류, 농도 및 침지시간이 참전복 *Haliotis discus hannai* 발생배의 생존활성에 미치는 영향을 조사하였다. 4세포, 담륜자 및 피면자를 dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, propylene glycol 농도별로 10분, 20분 및 30분 간 침지하였다. CPA 침지 후 각 발생배의 발생진행률은 각 CPA 농도가 낮을수록, CPA 침지시간이 짧을수록 높았다. 또한, 피면자에서 비틀립전까지의 발생진행률은 4세포에서 담륜자까지의 것보다 높았다. CPA 침지 후 발생진행률 및 유생활성지수는 ethylene glycol에서 가장 높았다. 참전복 발생배의 냉동보존 효과를 높일 수 있는 CPA 및 농도는 ethylene glycol 2.0 M, 평형시간은 30분인 것으로 추정된다.

서 론

최근 굴, 전복 등의 패류양식이 성행하고 있으나, 환경오염의 가중에 의해 수질 및 바닥질 환경이 나빠지고 수중의 먹이생물이 부실하여, 모패후보 자원의 성장지연 및 성숙부전이 초래되거나 자연유생의 발생이 부진하는 등 양식관리뿐만 아니라 종묘의 수급에서 해결해야 할 많은 문제점이 드

러나고 있다. 따라서 양식종묘의 원활한 수급이 어려워진 자연채묘보다 인공 종묘생산을 통해 종패를 생산하는 방향으로 기술개발이 전개되고 있다. 인공종묘의 생산기술을 확립하기 위해서는 우량형질을 지닌 건강한 어미의 보존과 대량 유생의 연중공급이 가능한 시스템을 구축해야 할 것이다. 어미의 종보존과 유생의 대량확보를 위한 한가지 방법으로서, 패류 발생배의 냉동보존 기술개발을 들 수 있다.

현재까지 발생배의 냉동보존은 주로 포유류를 대상으로 연구되어 왔으며(Arii et al., 1987), 어류에서는 무지개송어 *Oncorhynchus mykiss*(Billard, 1992) 등이 연구된 바 있다.

* 교신저자: 장영진, 부산광역시 남구 용소로 45 부경대학교 해양바이오신소재학과. (우) 608-737, (전) 051-629-5915, E-mail: yjchang@pknu.ac.kr

그러나 패류나 새우류 같은 해양 무척추동물에 대한 연구는 가축에 비해 상대적으로 미진한 실정이며, 배를 성공적으로 냉동보존하여 번식에 활용한 연구는 버지니아굴 *Crassostrea virginica* 정도로 그치고 있다(Paniagua-Chaves & Tiersch, 2001). 패류 발생배의 냉동보존에 있어 굴과 같은 조개류는 알이 매우 작고 난막의 두께가 얇으므로 냉동실험이 비교적 용이하여 몇몇 연구결과가 얻어지고 있지만(Choi & Chang, 1999; Chang et al., 2001; Jo et al., 2002; Choi et al., 2007), 전복과 같이 수정란의 크기가 크고 두꺼운 난막을 지닌 고등류에 관하여는 Roux 등(2008)의 보고와 같은 초기연구에 머물고 있어 발생배의 성공적인 냉동보존을 위한 기반 지식의 축적이 필요하다.

발생배의 냉동보존 기법의 개발에서 주된 연구항목은 결빙억제제(cryoprotective agent, CPA)의 선택과 농도별 평형 시간, 냉동률 및 해동률 등이다. 그 중에서도 가장 핵심적인 요소로는 적정 CPA의 세포내 침투속도 및 평형시간을 들 수 있다. 그러므로 적정 CPA의 선정 및 발생배 세포내 침투속도와 평형시간을 추정하기 위한 다양한 CPA 침지 및 용출 실험과 이에 따른 발생배의 생존활성을 파악해야 한다.

따라서 본 연구에서는 패류양식 산업의 중요위치를 점하고 있는 참전복 *Haliotis discus hannai* 발생배의 냉동보존을 위한 기초자료를 얻기 위하여, 양질의 수정란을 획득하여 CPA 별, 농도별, 침지시간별로 발생배의 발생진행률 및 운동활성을 조사하였다.

재료 및 방법

채란 · 채정용 모패는 4년생 참전복으로서 채집 후 패각에 붙어있는 이물질을 제거한 다음 계측하였다. 모패의 크기는 각장 144.8±5.0 mm, 각고 46.4±5.5 mm, 전중 78.7±6.6 g이었다(Table 1).

생식소 성숙상태를 관찰하여 성숙기 및 방출기에 달한 개체만을 골라 실내에서 2.5시간 동안 공기노출한 다음, 자외선조사해수 자극에 의해 채란 · 채정하여 수정란을 얻었다. 인공수정 및 세란에는 10 μm, 5 μm 필터 순으로 1, 2차 여과를 거쳐 자외선 멸균한 해수를 사용하였다. 실험에 사용한 모든 수정란에 대한 수정률, 발생과정 및 부화율을 관찰하여 정상발생 여부를 확인하였다.

CPA 침투가 참전복 발생배의 발생진행률에 미치는 영향

Table 1. Size of abalone *Haliotis discus hannai* used in the experiments

Sex	Shell length (mm)	Shell height (mm)	Total 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
Average	144.8±5.0	46.4±5.5	78.7±6.6

을 파악하기 위해, 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 sucrose에 dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma, USA), ethylene glycol(EG, Sigma, USA), propylene glycol(PG, Shinyo Pure Chemical, Japan)을 최종농도 0.1, 0.5, 1.0 및 2.0 M이 되도록 혼합하였다. 희석제 및 CPA의 농도별 삼투질농도는 삼투압측정기(The Advanced™ Osmometer, USA)를 사용하여 측정하였다(Table 2). 이 후 4세포, 담륜자

Table 2. Osmolalities of three cryoprotective agents with 0.2 M sucrose

Kind	Concentration (M)	Osmolality (mOsm/kg)
Dimethyl sulfoxide	0.1	1,434.3±9.1
	0.5	2,624.7±43.5
	1.0	> 3,000
	2.0	> 3,000
Ethylene glycol	0.1	1,322.0±10.6
	0.5	1,799.0±22.6
	1.0	2,397.9±6.7
	2.0	> 3,000
Propylene glycol	0.1	1,411.23±8.7
	0.5	2,137.0±3.6
	1.0	2,858.0±17.0
	2.0	> 3,000

(trochophore) 및 피면자(veliger) 유생을 10, 20, 30분간 침지하고 이어서 인공해수에 각각 10, 20, 30분간 담구어 CPA를 용출시킨 다음, 4세포는 담륜자까지, 담륜자는 피면자까지, 피면자는 비틀림전(before torsion)까지의 발생진행률을 관찰하였다.

CPA의 침지와 용출 후 참전복 유생의 운동활성에 미치는 영향을 파악하기 위해, 0.2 M sucrose에 DMSO, EG, PG를 최종농도 0.1, 0.5, 1.0 및 2.0 M이 되도록 혼합하였다. 이후 CPA별, 농도별로 유생을 30분간 침지하고, 인공해수로 30분간 CPA를 용출한 다음, 담륜자와 피면자의 유생활성지수(larval activity index, LAI)를 Table 3의 기준에 따라 측정하였다. 모든 침지실험에서의 CPA액 및 인공해수의 온도는 20°C로 하였다.

CPA 침투 및 용출 과정 중 참전복 유생의 경시별 LAI를 파악하기 위해, 전술한 CPA별, 농도별로 유생을 30분간 침지하고, 인공해수로 30분간 CPA를 용출하면서, 침지 직후부터 5분 간격으로 담륜자와 피면자의 LAI를 측정하였다. 각 CPA 농도별 침지과정에서 유발되는 형태 이상 발생배를 관찰하여 그 비율을 산정하였다. 이상의 모든 실험은 참전복 모패로부터 2회 채란하여 반복으로 실시하였다.

Table 3. Numerical calculation for evaluation 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 cilial movement only
V	0	Immobile embryo

각 실험결과로부터 얻어진 자료값(mean±S.D.) 사이의 유의차 유무는 SPSS 통계패키지(version 18.1)에 의한 ANOVA 및 Duncan's multiple range test를 실시하여 평균간의 유의성($P=0.05$)을 검정하였다.

결 과

산란유발에 의해 얻은 참전복 수정란은 수온 20°C에서 수정 후 1.5시간째에 제1극체를 방출하였고, 3시간째에 4세포로 진입하였다. 이어서 수정 후 13시간 만에 담륜자로 부화하였으며, 36시간째에는 피면자 유생으로 발달하였다. CPA 침지 실험구에서의 발생속도를 대조구와 비교한 결과, 4세포까지는 4시간으로 1시간이 지연되었으며, 부화는 대조구보다 3.5시간 느린 16.5시간이 소요되었다. 그리고 비틀림 전까지는 수정 후 41시간이 소요되었다(Fig. 1). 실험에 사용한 전복 알의 수정률은 94.7%, 부화율은 82.6%로서 정상적인 발생경과를 보였다.

CPA 농도별 침지시간별 4세포기 발생배의 담륜자까지 발생진행률은 Fig. 2에서와 같이, CPA 농도가 낮을수록 침지 시간이 짧을수록 높아지는 일률적인 경향을 보였다. CPA 10분 침지 후 4세포의 발생진행률은 0.1 M DMSO, EG 및 PG에서 각각 90.8%, 97.8%, 79.3%였다. 반면, 2.0 M에서는 각각 60.1%, 51.0%, 50.2%로 급격히 낮아졌다. 또한, EG에서의 발생진행률이 다른 두 CPA보다 높았지만, 2.0 M 침지 10분에서는 DMSO보다 낮은 결과를 보였다.

각 CPA 침지시간에 따른 4세포의 담륜자까지 발생진행률은 10분, 20분 및 30분 침지 모두 0.1 M EG에서 각각 97.8%, 80.7%, 80.0%로 가장 높았으며, 2.0 M DMSO, EG 및 PG 30분 침지에서는 발생진행률이 모두 50% 이하로 낮아졌다.

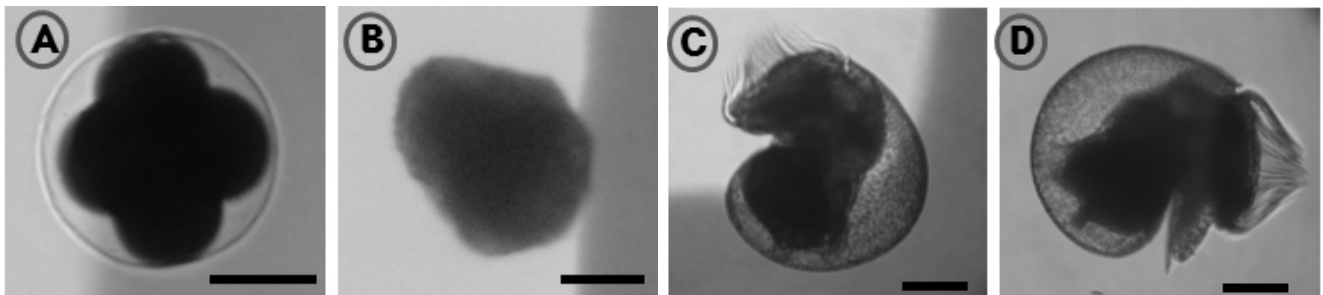


Fig. 1. Egg development and metamorphosis of abalone *Haliotis discus hannai* larva. A: 4-cell, B: trochophore, C: veliger, D: before torsion. Bar=100 μ m.

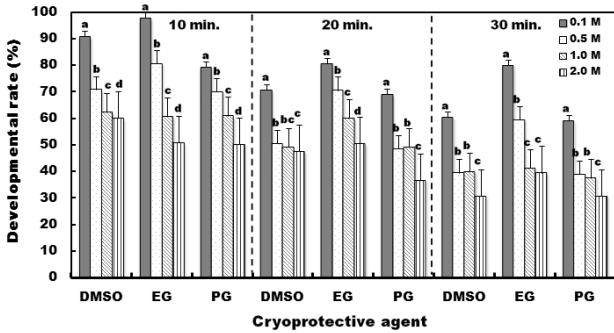


Fig. 2. Developmental rates from 4-cell to trochophore of abalone *Haliotis discus hannai* in each immersion time in three cryoprotective agents. DMSO: dimethyl sulfoxide, EG: ethylene glycol, PG: propylene glycol.

CPA 농도별 침지 후 답륜자의 피면자까지 발생진행률 역시 CPA 농도가 높을수록 침지시간이 길수록 낮아지는 경향을 보였다(Fig. 3). 각 CPA 농도 0.5 M에 10분 침지 후의 답륜자 발생진행률은 EG 93.8%, DMSO 89.1%, PG 70.5% 순이었다. 모든 CPA 농도별 침지에서 가장 높은 발생진행률을 보인 것은 0.1 M EG에 10분 침지한 답륜자로서 95.1%에 달했다.

CPA 침지시간 10분, 20분 및 30분에 따른 답륜자의 피면자까지 발생진행률은 0.1 M EG에서 각각 95.1%, 75.6%, 75.8%로 나타나, 다른 CPA에 비해 높았다. 그러나, CPA 농도 2.0 M에서는 EG 10분 침지 외에는 모두 50% 이하의 발생진행률을 보였다. 특히 2.0 M PG의 침지시간별 발생진행률은 각각 41.5%, 30.2% 및 25.9%로 가장 낮았다.

CPA 농도별 침지 후 피면자의 비틀림전까지 발생진행률

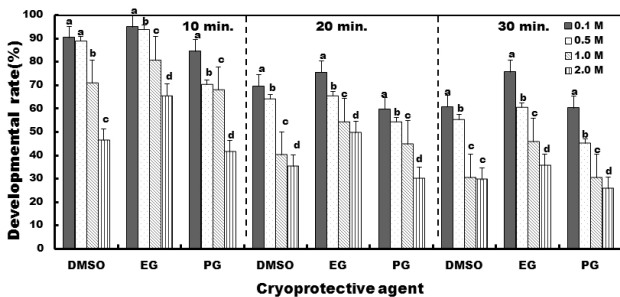


Fig. 3. Developmental rates from trochophore to veliger of abalone *Haliotis discus hannai* in each immersion time in three cryoprotective agents. DMSO: dimethyl sulfoxide, EG: ethylene glycol, PG: propylene glycol.

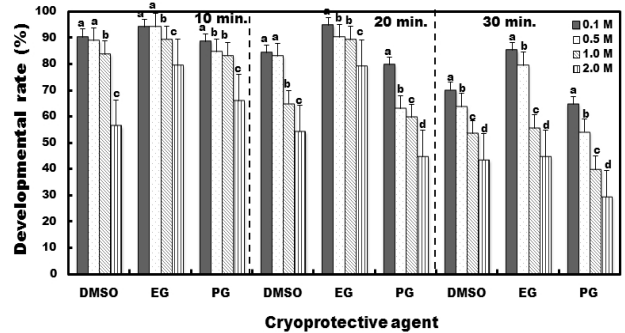


Fig. 4. Developmental rates from veliger to before torsion of abalone *Haliotis discus hannai* in each immersion time in three cryoprotective agents. DMSO: dimethyl sulfoxide, EG: ethylene glycol, PG: propylene glycol.

역시 CPA 농도가 높을수록 침지시간이 길수록 낮아지는 경향을 보였다(Fig. 4). 특히, 2.0 M EG에서의 발생진행률은 침지 20분에서 79.3%로 높았으나, 침지 30분에서는 44.8%로 급격하게 감소하였다. CPA농도에 따라 비교하였을 때, DMSO 0.1 M과 2.0 M은 각각 90.4%와 56.5%로 큰 차이를 나타냈다.

CPA 침지에 따른 유생의 행동반응을 관찰한 결과, 낮은 농도에서는 비대칭 나선운동을 정지하였으나, 농도가 점차

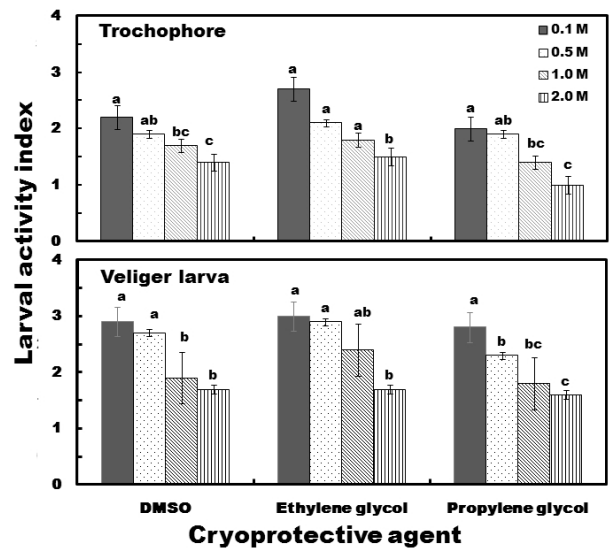


Fig. 5. Larval activity index (LAI) of abalone *Haliotis discus hannai* trochophores and veliger larvae post-immersed in CPAs. Same letters indicate no significant differences ($P>0.05$). DMSO: dimethyl sulfoxide.

높아지자 모든 유생은 섬모운동을 멈추고 심장박동만 유지하였다. CPA별, 농도별로 30분 침지한 담륜자의 LAI는 Fig. 5에서 보는 바와 같이 DMSO 0.1, 0.5, 1.0 및 2.0 M에서 각각 2.2, 1.9, 1.7 및 1.4로 나타나, CPA 농도가 높아질수록 LAI가 유의하게 낮아짐을 알 수 있었다($P<0.05$). EG와 PG에서도 역시 같은 경향을 나타냈다. 피면자 유생을 0.1 M DMSO, EG 및 PG에 침지하였을 때 LAI는 각각 2.9, 3.1 및 2.8로 EG에서의 LAI가 다른 두 CPA보다 유의하게 높았다($P<0.05$). 담륜자 및 피면자에 대한 CPA 침지 후 LAI를 관찰한 결과, 0.1 M EG에서 각각 2.8 및 3.1로 가장 높은 활성을 나타냈으며, 피면자가 담륜자에 비해 운동활성이 높아 더 강한 CPA 내성을 가진 것을 알 수 있었다(Fig. 5).

참전복 담륜자 및 피면자의 CPA 침지 직후부터 운동활성을 관찰한 결과, 침지시간이 경과할수록 운동성이 서서히 감소하였다. 30분 경과 후 인공해수로 희석하여 CPA를 용출하였더니 시간경과에 따라 운동성이 점차 증대되었으나, 침지 전의 운동활성으로는 회복되지 않았다(Figs. 6, 7). 0.1 M EG에 10, 20, 30분간 침지한 담륜자는 각각 4.0, 3.3, 1.0의 LAI를 나타냈으며, CPA 용출 10, 20, 30분째 LAI는 각각 2.0, 2.3, 3.0로 회복되었다. 그러나 2.0 M EG에서는 LAI가 각각 3.0, 1.8, 0으로 내려가 전혀 움직이지 않다가 CPA 용출시에는 각각 1.5, 1.5, 1.7로 회복되었으나, 운동성의 회복 속도가 0.1 M에서의 결과에 비해 현저하게 느린 것을 알 수 있었다. 또한 EG와 PG에서의 침지 결과를 비교해 보면, 0.1 M에서 침지 20분째의 LAI는 3.3, 2.8, CPA 용출 30분째는

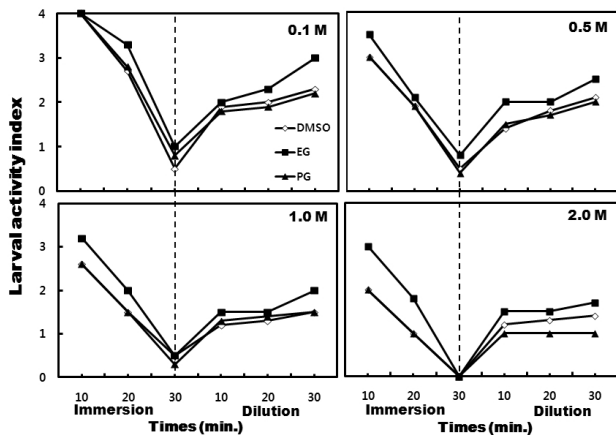


Fig. 6. Time course of larval activity index (LAI) of abalone *Haliotis discus hannai* trochophores according to immersion in cryoprotective agents and dilution in artificial seawater.

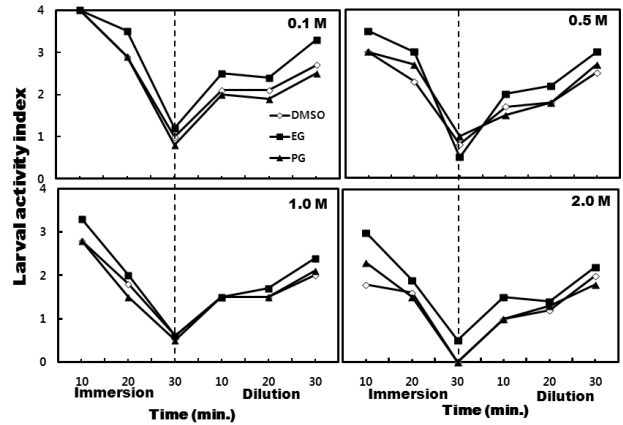


Fig. 7. Time course of larval activity index of abalone *Haliotis discus hannai* veliger larvae according to immersion in cryoprotective agents and dilution in artificial seawater.

3.0, 2.2로 EG에서의 LAI가 높아 CPA에 대한 내성이 더 컸다(Fig. 6). CPA 농도별 LAI는 DMSO 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 M에서 각각 4.0, 3.0, 2.8, 1.8로 나타나 CPA 농도가 높아질수록 LAI는 낮아졌다. 이러한 경향은 EG에서 각각 4.0, 3.5, 3.3, 3.0, PG에서 4.0, 3.0, 2.8, 2.3의 LAI를 보여 같은 결과를 나타냈으며, EG에서의 LAI가 상대적으로 높음을 알 수 있었다(Fig. 7).

CPA별, 농도별 침지후 발생을 진행하는 일부 담륜자와 피면자에서 관찰된 형태이상은 Fig. 8에서 보는 바와 같이, 담륜자에서는 세포막이 파열되어 세포질이 개체 외부로 돌출되었으며, 피면자에서는 체표의 세포막이 붕괴되거나 세포질이 위축되어 표면이 함몰되는 형태 이상을 보였다.

CPA별, 농도별 침지에 따른 담륜자의 형태이상률을 관찰한 결과, Fig. 9와 같이 DMSO와 PG에서는 10분 침지시 각

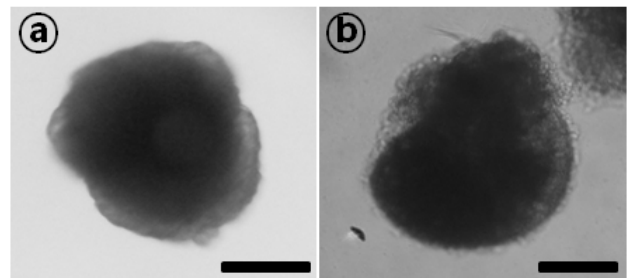


Fig. 8. Morphological abnormalities of abalone *Haliotis discus hannai* embryos post-immersed in CPAs. (a): trochophore, (b): veliger. Bar=100 μ m.

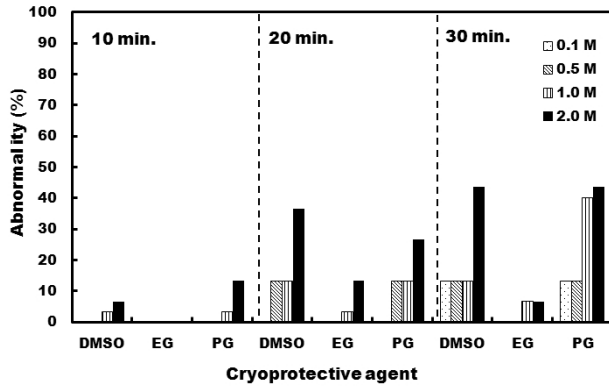


Fig. 9. Abnormalities of abalone *Haliotis discus hannai* trochophores according to immersion times in three cryoprotective agents. DMSO: dimethyl sulfoxide, EG: ethylene glycol, PG: propylene glycol.

각 6.6%, 13.3%를 나타냈지만, EG에서는 형태이상률이 발견되지 않았다. CPA 침지시간에 따른 형태이상률은 1.0 M PG 침지 10, 20 및 30분에서 각각 3.3%, 13.3%, 40.0%로 나타나, 침지시간이 길어질수록 그 비율이 높아지는 경향을 보였다. 특히, 2.0 M DMSO 30분 침지에서는 43.6%로 가장 높은 비율을 나타냈다.

반면, 피면자의 CPA 침지실험에서는 담륜자보다는 낮은 형태이상률을 나타냈다(Fig. 10). 피면자의 형태이상률이 가장 높았던 것은 2.0 M PG 30분 침지로서 26.6%에 달했다. 담륜자 및 피면자 침지실험의 모든 결과를 비교하여 보면, EG 침지에서 다른 2종의 CPA 침지에 비해 낮은 비율을 나타냈다.

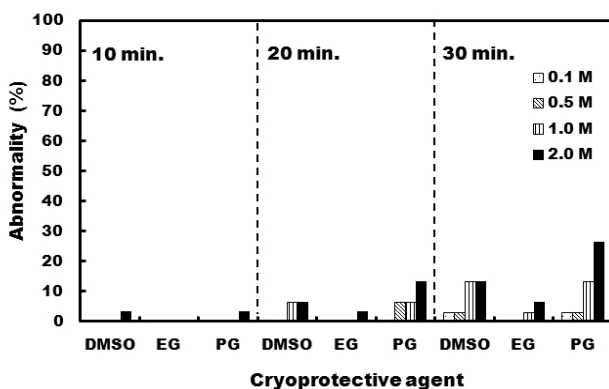


Fig. 10. Abnormalities of abalone *Haliotis discus hannai* veliger according to immersion times in three cryoprotective agents. DMSO: dimethyl sulfoxide, EG: ethylene glycol, PG: propylene glycol.

고 찰

냉동보존에 있어서 CPA 독성에 대한 발생배의 내성은 살아있는 세포를 성공적으로 보존하기 위해 우선적으로 고려해야 하는 중요한 요인이다(Kasai et al., 1981). 또한, 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). 이와 같이 냉동보존의 첫 과정은 적정 CPA의 선택이라 할 수 있다.

DMSO는 송사리 *Oryzias latipes*(Arii et al., 1987), 무지개송어(Arii et al., 1992), 초어 *Ctenopharyngodon idella*(Zhang et al., 1992)와 참굴 *Crassostrea gigas*(Chao et al., 1997)의 발생배 냉동에서 효과적인 CPA로 보고된 바 있다. 또한, DMSO는 어류 정자의 냉동보존을 위한 CPA로서 가장 많이 사용되었으며, 그 효과 역시 충분히 입증된 바 있다(Lim, 1998). 그러나 본 연구에서는 DMSO와 propylene glycol은 침지 후 발생진행률 및 운동활성이 ethylene glycol에 비해 낮은 결과를 보였다. 물론 CPA의 효과는 동물종에 따라서 다를 수 있겠지만, 가장 근본적인 문제로서 냉동시 세포막의 내외에 평형을 이루어야 할 CPA의 분자량 및 삼투질농도를 검토해야 한다. CPA는 그 자체 분자량이나 세포막의 CPA에 대한 투과성에 따라 냉동 효과가 다르다(Renard & Cochard, 1989). 현재까지 반응되고 있는 CPA 중 가장 작은 분자량으로 이루어진 methanol은 빠른 속도로 막계를 투과하며, 분자량이 큰 glycerol은 느리게 투과한다. 또한 세포막 내외의 삼투압 차이가 클수록 CPA의 투과속도는 빨라질 수밖에 없다(Chao et al., 1997). 본 연구에서 각종 CPA 침지 후 발생배 운동활성(LAI)은 0.1 M ethylene glycol에서 3.05로 DMSO와 propylene glycol에 비해 높았는데, 이는 ethylene glycol의 분자량이 42.67로 가장 작고, DMSO와 propylene glycol은 각각 78.13, 76.10로 분자량이 큰 데에 기인한 것으로 추측된다. 또한, 이는 Renard & Cochard(1989)의 CPA독성으로 인한 배의 손상이 CPA의 높은 삼투압과 생화학적 영향에 의한 것으로 CPA의 분자량과 관련된다는 언급과 상통하는 부분이 있다고 할 수 있다.

적정 CPA나 그 농도를 선택하는 데 있어 가장 중요한 요소의 하나는 CPA 침지시간 즉, 평형시간이라 할 수 있다. 세

포내에 충분히 CPA가 침투되고 세포내 수분이 탈수되면서 세포 내외의 삼투압 평형이 이루어져야 냉동시 CPA가 기능을 발휘하여 빙결정에 의한 동해를 막을 수 있게 된다. Roux et al.(2008)은 남아프리카 전복류 *Haliotis midae* 발생배의 침지실험에서 30분간 polyethylene glycol 침지가 발생배 부화율 90% 이상으로 적합하다는 결과를 얻었다. 본 연구에서도 30분을 최장시간으로 하여 10분 및 20분의 CPA 침지시간을 설정한 실험에서 침지시간이 짧을수록 참전복의 각 발생단계에서 발생진행률이 높아지는 것을 알 수 있었다. 그러나 발생진행률이 높은 CPA 침지시간이라 해서 실제 냉동에서 동해를 적게 입을 것이라는 해석은 무리하다고 판단된다. 왜냐하면, 침지시간이 짧을수록 회석 후 발생진행률이 높다는 것은 CPA가 적게 침투하여 발생배에 영향을 거의 미치지 않은 것으로 보이기 때문이다. 그러므로 발생배를 CPA에 침지한 다음, 경시별 운동활성을 관찰하여 충분한 CPA의 세포내 침투에 따라 운동활성이 멈추는 단계까지의 소요시간을 냉동시 적정 평형시간으로 간주해야 할 것이다. 더욱이 본 연구에서는 CPA 침지 30분에 발생배의 섬모운동이 멈추었으나 즉시 인공해수에 침지하였더니 다시 운동활성이 회복됨을 알 수 있었다. 이는 운동이 멈춘 발생배에 CPA가 충분히 침투하여 운동활성을 저지했지만, 발생배의 폐사를 초래할 만큼의 수준은 아니라는 것을 의미한다. 따라서 발생배의 운동성이 멈추는 CPA 농도 및 침지시간이 냉동시 적정 CPA 및 평형시간이라고 보는 것이 합당하다 할 것이다. 이 판단에 따른 본 연구의 해당 CPA 농도 및 침지시간은 2.0 M의 DMSO와 propylene glycol 및 30분이었다. 그러나 이와 같은 높은 농도의 CPA 침지는 40.0~43.6%의 가장 높은 형태이상률을 초래하여 냉동 전부터 문제시되기도 한다.

Ethylene glycol은 세포내로의 투과성이 높고 빙핵 형성을 제한한다는 Cseh 등(1997)의 언급을 고려한다면, 본 연구에서 침지시 형태이상률이 10% 이하로 나타나는 2 M 이하의 ethylene glycol이 적합할 것으로 사료된다. 또한 전술한 바와 같이 침지 후 부화율 90% 이상의 결과를 보였던 polyethylene glycol(Roux et al., 2008) 역시 ethylene glycol 계통의 CPA이며, 이와 같이 특정 CPA가 종특이성을 가진다는 Suzuki et al.(1995)의 언급을 고려해 보더라도 형태이상률이 가장 낮았던 2.0 M ethylene glycol이 적정 CPA일 것으로 판단된다.

한편, 패류 발생배에 대한 각종 CPA의 세포내 침투속도

가 밝혀져 있지 않으므로 낮은 CPA 농도와 장시간 침지 또는 높은 농도와 단시간 침지 어느 쪽이 냉동에 효과적일지에 대하여는 보다 더 심도있는 실험과 논의가 필요하다. 그러므로 본 연구에서 얻어진 결과를 기반으로 하여 실질적인 냉동 실험에서 적정 CPA의 농도 및 평형시간의 효과를 입증하는 단계적 연구가 진행되어야 할 것이다.

감사의 글

이 논문은 국립수산물과학원 자율경쟁과제 사업비(RP-2011-AQ-104)로 수행된 연구의 일부이며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

- 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.
- Arii N, Nami K, Gomi F, Nakazawa T (1987) Cryoprotection of medaka embryos during development. Zool Sci 4: 813-818.
- Billard R (1992) Reproduction in rainbow trout: Sex differentiation. dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes. Aquaculture 100:263-298.
- Chang YJ, Kim YS, Choi YH, Lee JY (2001) Survival rates of frozen-thawed surf clam, *Spisula sachalinensis* larvae in five developmental stages. Dev Reprod 5: 35-38.
- 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.
- Choi YH, Chang YJ (1999) Survival rates of trochophores from pearl oyster, *Pinctada fucata martensii* and Pacific oyster, *Crassostrea gigas* immersed in four kinds of cryoprotectant. J Kor Fish Soc 32:476-480.
- Choi YH, Jo PG, Kim T, Bai CB, Chang YJ (2007) The effects of cryopreservation on fine structures of pearl oyster (*Pinctada fucata martensii*) larvae. Dev Reprod 11:79-84.
- Cseh S, Corselli J, Nehlsin-Cannarella SL, Bailey LL, Szalay

- AA (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.
- Jo PG, Choi YH, Kang KH, Kho KH, Go CS, Kim BH, Lim HK, Choi CY, Chang YJ (2002) Comparison of cryopreservation effects on D-shaped larvae of arkshell, *Scapharca broughtonii* by the kinds of additive and the concentrations of cryoprotectant. *Kor J Malacol* 18:77-82.
- Kasai M, Niwa K, Iritani A (1981) Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen mouse embryos. *J Reprod Fertil* 63:175-180.
- Lim HK (1998) Physiological properties of sperm and gamete preservation in black seabream, *Acanthopagrus schlegeli*. PhD Thesis, Pukyong National University Pusan Korea. pp. 130.
- Paniagua-Chavez CG, Tiersch TR (2001) Laboratory studies of cryopreservation of sperm and trochophore larvae of the Eastern oyster. *Cryobiology* 43:211-223.
- Renard P, Cochard JC (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, Sandenbergh L, Roodt-Wilding R (2008) Preliminary investigation to determine the cryotoxicity of various cryoprotectants on southern African abalone *Haliotis midae* embryos. *Cryobiology* 57:308-311.
- Suzuki T, Komada H, Takai R, Arai K, Kozima T (1995) Relation between toxicity of cryoprotectant DMSO and its concentration in several fish embryos. *Fish Sci* 61:193-197.
- Zhang L, Liu X, Lu D, Chen S, Fang J (1992) Effects of several factors on the survival rate of fish embryo before it cryopreserved. *Freshwat Fish Danshui Yuye* 1:20-24.

(Received 19 October 2011, Received in revised form 10 November 2011, Accepted 13 November 2011)