

동해안 서식 동해코끼리조개(*Panopea* sp.)의 세로토닌 주사에 따른 산란 유발과 다정수정 방지를 위한 정자밀도에 따른 유생발달

박진철 · 권오남^{1*}

강원특별자치도 한해성수산자원센터, ¹어업회사법인 가비(주)

Effects of Serotonin Injection on Spawning and Modulation of Sperm Densities for Preventing Polyspermy to Achieve Larval Development in Eastern Gooyduck Clam *Panopea* sp. Distributed on the East Coast of Korea

Jin-Chul Park and O-Nam Kwon^{1*}

Gangwon State Cold Water Fisheries Research Center, Gosung 24747, Republic of Korea

¹GABI Co. Ltd., Gangneung 25451, Republic of Korea

We examined the effects of serotonin on the spawning response, sperm motility, and D-shaped larva production in Eastern Gooyduck clam *Panopea* sp. based on the sperm densities at fertilization and washing after mixing the eggs and sperm. The highest spawning induction was found showed in females and males injected with 1 mL of 2 mM serotonin. The spawning responses in females and males were higher at concentrations greater than 1 mM and 0.75 mM, respectively. Regarding the activities of sperm in sea water after serotonin injection, the sperm showed activity at >90.0% until 120 mins. We also examined the effects of sperm concentration at the fertilization and washing times after mixing the eggs and sperm. We confirmed that washing within 1 minute at a concentration of 1,500 sperms/mL or less can prevent egg destruction by polyspermy and secure a large number of D-phase larvae. These results should be useful for developing the aquaculture process for Eastern Gooyduck clam, *Panopea* sp.

Keywords: Eastern Gooyduck clam, Serotonin, Spawning, D-shape larvae, Polyspermy

서론

동해코끼리조개(*Panopea* sp.)는 한해성 이매패류 종으로 일본 홋카이도, 러시아 연해주, 사할린 및 캄차카 연안 등에 분포하며(Nam et al., 2014), 남해안 거제, 여수 등을 비롯한 일본 큐슈지역에 서식하는 코끼리조개(*Panopea japonica*)와 구별된다. 동해코끼리조개는 파도의 영향이 적은 수심 10 m 이심의 고운 사니질에 서식하는 잠입성 이매패류이다. 상업적으로는 식용 가용부위(55%)가 많고 맛과 향이 좋아 아시아(중국, 홍콩, 일본 등) 시장에서 이미 고가로 거래되고 있어 부가가치가 매우 큰 종이다(You et al., 1993; Morsan et al., 2010). 하지만 국내의 경우, 1980-90년대에 분사식 고압 분사기를 장착한 잠수기

에 의한 남획으로 자원이 급감하였고, 2005, 2007년도 강원도 분사기 사용에 대해 고시에서 코끼리조개를 제외시키면서 더 이상의 상업적 포획은 하지 못하고 있다. 코끼리조개는 이동성이 거의 없고 성패까지 성장기간이 긴 잠입성 이매패류로 효율적인 양식을 통한 지속적인 생산관리가 필요한 양식대상종이다. 어촌계 협동양식어장면허나 바닥식패류양식면허 구역에서의 양식이 시도되며, 2018년도부터 해양수산부에서는 “코끼리조개 양식산업화 기술개발” 과제를 수행하면서 동해안 양식품종으로써의 개발에 박차를 가하고 있다. 동해코끼리조개의 양식기술개발을 위해서는 우선적으로 우량 모패의 확보, 산란유발, 유생 사육과 환경 조건의 규명 등이 필요하다. 특히 양질의 수정란을 다량으로 확보하기 위한 모패의 최적 산란유발 방법

*Corresponding author: Tel: +82. 33. 644. 1040 Fax: +82. 33. 644. 1041

E-mail address: onkwon@gab-i.net



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2023.0644>

Korean J Fish Aquat Sci 56(5), 644-650, October 2023

Received 16 March 2023; Revised 19 June 2023; Accepted 12 August 2023

저자 직위: 박진철(해양수산연구원), 권오남(연구소장)

을 규명하는 것은 인공종묘생산에 있어 반드시 필요한 선결과제라 할 수 있다. 현재까지 이매패류의 최적 산란유발을 위한 방법으로는 생물학적 자극(신경절 현탁액, 난·정자현탁액, 식물플랑크톤 첨가 등), 화학적 자극(NH_4OH , KCl , K_2SO_4 등) 및 물리적 자극(수온, 간출, 자외선 조사 등) 등이 시도되어 왔다 (Loosanoff and Davis, 1963; Gibbons and Castagna, 1984; Matsutani and Nomura, 1987; Lee, 2001; Reuter and Levitan, 2010). 하지만 생물학적 자극에 의한 방법에서는 산란 효과가 다른 방법에 비해 효율이 떨어지며, 화학적 자극에서는 화학물질의 독성으로 수정란의 정상적인 수정과 부화에 부정적인 영향을 미치는 경우가 많고, 물리적 자극에 의한 방법은 산란 유발률이 불규칙해서 계획적인 채란이 쉽지 않다(Lee et al., 1996). 이에 비해 신경전달물질인 세로토닌(serotonin, 5-hydroxytryptamine)은 기존의 다른 화학물질보다 안전하며 패류에 있어 원활한 채란/채정이 가능하여 산란유발 효과가 우수한 것으로 다수의 연구가 보고되고 있다(Gibbons and Castagna, 1984; Alcazar et al., 1987; Matsutani and Nomura, 1987; Vélez et al., 1990; O'Connor and Heasman, 1995; Fong et al., 1996; Velasco et al., 2007). 이 세로토닌은 Fiji의 giant clam의 자원 관리에 이용되다가 최근 전복 등 다른 종들의 양식기술에 활용되고 있다(Sharker et al., 2020). 이처럼 세로토닌에 대한 산란유발 효과가 보고는 되고 있지만 코끼리조개에 대한 적용 사례는 없다.

이에 본 연구에서는 동해코끼리조개의 원활한 양식산업화를 위한 일환으로 채란효율을 높이기 위해 세로토닌을 이용한 산란유발의 효과와 최적의 방법을 규명해 보고자 한다.

재료 및 방법

실험생물

본 실험에 사용한 동해코끼리조개(*Panopea* sp.)는 2019년 4월에 강원도 양양군 인구어촌계 협동양식어장을 대상으로 포획·채취금지의 해제허가증(강원도 제2019-22호)를 받은 후 인구어촌계 자원관리채취선에 장착된 분사기를 사용해서 잠수사가 포획한 것 중 4-9세의 개체들을 사용하였다. 산란기는 Nam et al. (2014)에서 확인하였으며, 암수 구분은 외관상되지 않기 때문에 무작위로 사용하였다. 본 실험에 사용된 총 60마리 동해코끼리조개의 각장, 각고, 전중 및 연령은 각각 10.9 ± 1.25 cm (최대 13.4 cm, 최소 6.5 cm), 7.0 ± 0.78 cm (최대 8.6 cm, 최소 5.0 cm), 390.3 ± 128.47 g (최대 680 g, 최소 84 g), 6.5 ± 1.14 세 (최대 9세, 최소 4세)이었으며, 각폭은 육질부가 껍질 밖으로 나와 있어서 절개하지 않는 한 오차가 크기 때문에 생략하였다. 포획된 어미들은 50 cm 모래가 깔려 있는 6톤 원형수조에 심어서 유수식 환경에서 관리하였으며, 해수 유수식으로 해수온과 염분은 각각 $10.5-16.2^\circ\text{C}$, $31.1-32.5$ psu이었다. 먹이는 1일 1회 냉동농축미세조류(Shellfish diet 1800®; Reed Mariculture

Inc., Campbell, CA, USA)를 100 mL 공급하였다.

동해코끼리조개 개별 채란을 위한 세로토닌 주사 효과와 정자 활력

산란반응을 확인하기 위하여 사용한 방법은 절개법(gonadal incision), 1시간 공기 중 간출(그늘) 후 18°C 해수온 자극(air exposure), hCG (human chorionic gonadotropin; Daesung Microbiological Labs Co., Ltd, Uiwang, Korea)를 500 IU/ind., LHRH (luteinizing hormone releasing hormone analogue; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 0.05 mg/ind. 및 2 mM 세로토닌(serotonin creatinine sulfate monohydrate, 99%, ACROS ORGANICS, USA)를 1 mL/ind.이었으며, 각 방법별로 20마리를 무작위로 골라서 채란/채정을 하였다. 호르몬적 방법 3가지는 복강 주사 후 1시간 동안 10 L 통에 한 마리씩 수용하여 산란유발 실험을 실시하면서 암수를 구분하였으며, 암컷의 경우 마리 당 채란양을 개수하여 나타내었다.

세로토닌 주사 농도에 따른 방란과 방정 비율을 확인하기 위해 세로토닌 농도별 3마리씩의 암컷과 수컷을 구분해서 30 L 수조에 주사 후 30분간 수용하여 방란과 방정을 확인하였다. 상기 실험을 3회 반복 실험하여 세로토닌 주사 실험생물의 산란유발율은 산란 개체수를 관찰하여 백분율로 계산하였다. 그리고 세로토닌 주사로 방정된 정자의 활력은 방정된 정자를 3,000 sperms/mL의 농도로 여과 해수에 희석 한 후 방정 직후를 기준으로 0, 1, 10, 30, 60, 120, 180 및 240분 경과한 뒤 다음의 방법으로 정자의 활력을 비율로 확인하였다. 정자의 활력은 촬영된 영상에서 움직이지 않고 있는 정자의 수와 영상의 정지화면에서 보이는 전체 정자수를 고려해서 백분율로 활주운동을 하고 있는 정자의 비율로 나타내었다.

동해코끼리조개 수정 시 정자의 적정 농도 및 세란 시간에 따른 D상 유생 생산

정자 농도에 따른 다정수정 방지와 D상 유생 확보

실험에 사용된 동해코끼리조개는 2 mM 세로토닌 1 mL를 10마리의 코끼리조개에 주사를 하여 암컷과 수컷 개체 각각 3마리와 4마리에에서 알과 정자를 확보하여 실험에 사용하였다. 확보된 알은 mL 당 12.1 ± 0.51 개(총 사육수 량 1 L)를 사용하였으며, 정자의 밀도는 6,000 sperms/mL의 농도를 맞춘 후 희석 배율에 따라서 1 L 용기를 기준으로 375, 750, 1,500, 3,000 및 6,000 sperms/mL로 알과 수정시켰다. 수정시간은 1분으로 한정하였으며, 모든 정자 농도 실험구에서 수정 후 1분 경과 시 $40 \mu\text{m}$ 물리거름을 사용해서 깨끗한 18°C 여과 해수로 난 세척을 해주었다. 난 세척 종료 후 깨끗한 해수에 담긴 수정란을 정상 수정란 및 다정수정란으로 구분하여 계수하였으며, 18°C 항온실에 폭기 없이 방치하여 24시간 후 포배기로 부화하여 움직이는 유생의 수를 부화율로 계산하였다. 부화 유생을 별도의 5 L (사육수 3 L) 투명플라스틱 용기에 담고, 이후 3일 동안 0.1 L/

min으로 폭기해 주었다. 먹이는 D상 유생으로의 변태가 진행되는 부화 후 24시간째부터 한국해양과학기술원에서 분양받은 *Isochrysis galbana* (LIMS-PS-0012)와 *Chaetoceros gracilis* (P_PS_00000513)을 배양해서 혼합먹이로 10,000 cells/mL의 농도로 2일 동안 4회에 걸쳐서 무환수 공급해 주었다. D상으로의 발달이 90% 이상 진행되는 부화 후 3일째에 정상 D상 유생의 수를 확인하여 수용된 알의 밀도와 부화한 유생의 수를 바탕으로 D상 유생 발달률과 부화 후 D상 유생 발달률을 계산하였으며, 최종 1 L 용기에 남아 있는 유생의 총 수를 광학현미경 (CH40; Olympus, Tokyo, Japan)으로 확인하였다. 그리고 모든 실험은 3회 반복하여 평균값으로 나타내었다.

다정수정을 방지하기 위한 세란 시간의 최적화

수정란의 세란시간에 따른 실험은 1,500 sperms/mL의 정자 농도로 섞고 수정을 시킨 직후부터 0, 0.5, 1, 5, 10 및 30분 경과했을 때 세란을 하였으며, 세란 시간에 따른 수정률, 다정수정률, 부화율, D상 유생 발생률 및 최종 D상 유생 마리수는 실험 3.1과 동일한 방법으로 실시하였다.

통계처리

동해코끼리조개 마리 당 방란 개수, 암수 산란유도율, 정자활성 그리고 정자밀도와 세란시간에 따른 유생 발달 상황에 대한

평균값은 one-way ANOVA test를 실시하고, Duncan (1955)의 다중 검정으로 처리평균 간의 유의성을 검정하였다. 모든 통계 처리는 유의확률 95% 범위에서 IBM SPSS Statistics 프로그램 (ver. 20)을 이용하여 분석하였다.

결 과

동해코끼리조개 개별 채란을 위한 세로토닌 주사 효과

코끼리조개 어미의 산란유발을 위해, 절개법, 간출, hCG, LHRH 및 세로토닌 주사를 하여 방란/방정반응에 대한 반응을 살펴 마리 당 방란한 알 개수의 평균은 Table 1에 나타내었다. 절개법과 세로토닌 실험구에서는 모든 개체에서 산란반응을 보였으며, 간출 실험구는 암수에서 각각 25%와 15%만 반응을 보였다. 절개법과 세로토닌 실험구에서 채란량은 각각 $1,383.3 \pm 236.29 \times 10^4$ ea./ind.과 $1,373.3 \pm 155.35 \times 10^4$ ea./ind.이었던 반면, 간출자극의 경우 $766.7 \pm 305.51 \times 10^4$ ea./ind.로 유의적으로 낮게 나타났다($P < 0.05$). 한편 hCG에서는 수컷 1마리만 반응을 보였다.

세로토닌 주사 농도에 따른 암수의 산란 반응 결과를 Table 2에 나타내었다. 암컷은 2 mM 주사를 했을 때 $93.3 \pm 5.77\%$ 가 방란을 했으며, 수컷의 경우는 0.75 mM 이상에서 86.7% 이상

Table 1. No. of responding clam, responding rate and No. of fertilized eggs ($\times 10^4$) with Eastern goeeyduck clam *Panopea* sp. by various stimulation methods*

Stimulation methods	n		Response		Spawning eggs (10^4 ea./ind.)
	M/F	M/F	%	M/F	
Gonadal incision	12/8	12/8	100/100		$1,383.3 \pm 236.29^c$
Air exposure	20/20	5/3	25.0 / 15.0		766.7 ± 305.51^b
hCG (500 IU/ind.)	20/20	1/0	5.0 / 0.0		0 ^a
LHRH (0.05 mg/ind.)	20/20	0/0	0.0 / 0.0		0 ^a
Serotonin (2 mM, 1 mL/ind.)	20/20	11/7	55.0 / 35.0		$1,373.3 \pm 155.35^c$

n, M and F was meant a number, male and female, respectively. *Different superscripts in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$).

Table 2. Spawning response rate (%) into 30 mins after 1 mL on the different serotonin concentration (mM/mL) with Eastern goeeyduck clam *Panopea* sp.

Serotonin concentration (mM / mL)	Female		Male	
	Response (%)	n	Response (%)	n
0.25	10.0 ± 10.00^a	9	10.0 ± 0.00^a	9
0.5	40.0 ± 10.00^b	9	60.0 ± 17.30^b	9
0.75	56.6 ± 11.55^{bc}	9	86.7 ± 11.55^{bc}	9
1	63.3 ± 15.28^{bc}	9	90.0 ± 10.00^{bc}	9
2	93.3 ± 5.77^c	9	96.7 ± 5.77^c	9

Different superscripts in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$). The double superscripts (like ab, bc) indicate no significant difference with either component: ab is not significantly different from either a or b, etc.

으로 유의적인 차이 없이 어미의 방정이 확인되었다($P>0.05$).

동해코끼리조개 정자의 활력, 수정 시 정자 적정 밀도 및 세란 시간에 따른 D상 유생 생산

세로토닌 주사로 얻은 정자의 해수 노출시간에 따른 활력은 Table 3에 나타내었다. 동해코끼리조개의 정자는 해수에 노출 30분까지 97.3%의 활력을 보였으며($P<0.05$), 이후 감소하여 180분 경과 시 $47.7\pm 21.13\%$ 로 유의적으로 낮아졌다($P<0.05$). 하지만, 240분 경과 시에도 실험구간 중에서 유의적으로 가장 낮았지만, $2.0\pm 2.65\%$ 의 활력을 나타냈다($P<0.05$).

세로토닌 주사로 얻어진 정자의 밀도별 성숙란의 수정률, 다정수정률, 부화율, D상 유생 발생률 및 최종 D상 유생 마리수는 Table 4에 나타내었다. 코끼리조개 알의 수정률은 정자밀도 3,000 sperms/mL에서 $98.3\pm 0.40\%$ 로 유의적으로 높게 나타났지만($P<0.05$), 750 sperms/mL 농도 이상에서는 유의적인 차이가 없었다($P>0.05$). 이중 정상 수정란은 750 sperms/mL 농도구에서 유의적으로 높은 $92.3\pm 0.97\%$ 를 보였으나($P<0.05$), 이 농도보다 낮고 높은 실험구에서는 오히려 낮아지는 경향을 보였다. 다정수정률은 정자 농도가 높아질수록 증가하여 6,000 sperms/mL에서 $57.5\pm 3.52\%$ 로 유의적으로 높게 나타났다($P<0.05$), 이에 따른 정상 수정란에서의 부화율은 모든 정자 농

도구에서 53.5–67.4%로 유의적인 차이는 없었다($P>0.05$). 부화 이후 D상 유생까지의 발생률은 $49.2\pm 6.17\%$ 로 375 sperms/mL 농도구에서 유의적으로 높았지만($P<0.05$), 750 sperms/mL 실험구의 발생률과 유의적인 차이를 보이지 않았다($P>0.05$). 그리고 농도가 높아질수록 유의적으로 낮아지는 발생률을 보여서 6,000 sperms/mL 정자농도구에서는 $8.9\pm 3.40\%$ 로 발생률이 낮았다($P<0.05$). 부화에서 D상 유생 발생률과 최종 D상 유생의 수는 375, 750 sperms/mL 정자 농도구에서 유의적으로 높았고($P<0.05$) 농도가 높아질수록 비율과 마리수는 유의적으로 감소하였다($P<0.05$).

동해코끼리조개의 수정 시 정자 농도를 1,500 sperms/mL로 하고 수정 후 세란 시간에 따른 알의 수정률, 다정수정률, 부화율, D상 유생 발생률 및 최종 D상 유생 마리수는 Table 5에 나타내었다. 동해코끼리조개 알의 수정률은 수정 10분 후 세란 하는 것이 $99.5\pm 0.78\%$ 로 유의적으로 높게 나타났지만($P<0.05$), 1분 이상에서는 유의적인 차이가 없었다($P>0.05$). 세란 시간에 따른 정상 수정란 비율은 0.5–1분 경과 시 유의적으로 높은 $91.7\text{--}93.6\%$ 를 보였으며, 세란 시간이 짧고 길어질수록 정상 수정란 비율은 낮아지는 경향을 보였다. 다정수정은 세란 대기 시간이 길어질수록 증가하여 세란을 30분에 실시하는 경우 $95.3\pm 1.90\%$ 의 높은 다정수정률을 나타냈다($P<0.05$). 또한 세란 시간에 따른 정상 수정란에서의 부화율은 0분에서 가장 높은 $95.8\pm 1.47\%$ 로 높았지만, 0–5분에서의 유의적인 차이는 없었다($P>0.05$). 부화 이후 D상 유생까지의 발생률은 0–0.5분에서 $39.0\text{--}42.2\%$ 로 유의적으로 높았으며($P<0.05$), 부화에서 D상 유생까지의 발생 비율은 0–5분 사이에 41.5–57.6%로 유의적으로 높았다($P<0.05$). 그리고 최종 D상 유생의 생산량은 0–1분 경과 시 세란하는 경우, 6,833–7,833 larvae/L의 유의적으로 높은 생산량을 보였다($P<0.05$).

고 찰

패류의 산란유도는 인공종묘생산에 있어서 원활한 종자생산을 위해 반드시 갖춰야만 하는 기술이다. 또한 양질의 수정란을 대량으로 얻을 수 있다면 양식에 있어 동일 발달 단계 및 균일

Table 3. The motility (%) of Eastern goeeyduck clam *Panopea* sp. sperm emitted on the different exposed time into the seawater*

Exposed time (min.)	Motilities (%)
0	97.3 ± 2.08^d
1	99.0 ± 1.73^d
10	97.3 ± 2.08^d
30	97.3 ± 2.08^d
60	92.0 ± 3.00^c
120	90.0 ± 4.36^c
180	47.7 ± 21.13^b
240	2.0 ± 2.65^a

*Different superscripts in the same column indicate significant differences ($P<0.05$).

Table 4. Changes of fertilizing rate (%), polyspermy rate (%), hatching rate (%) and final number of D-shape larvae of Eastern goeeyduck clam *Panopea* sp. eggs fertilized on the different sperm densities*

Sperms (sperms/mL)	Fertilizing rate (%)	Normal fertilized eggs (%)	Polyspermy rate (%)	Hatching rate (%)	Rate of up to D-shape larvae (%)	Rate of hatching to D-shape larvae (%)	No. of final D-shape larvae (larvae/L)
375	85.0 ± 5.46^a	84.8 ± 5.85^d	0.2 ± 0.39^a	67.4 ± 6.56	49.2 ± 6.17^d	86.2 ± 5.23^{cd}	$5,813\pm 855.4^d$
750	92.6 ± 0.78^{ab}	92.3 ± 0.97^d	0.2 ± 0.40^a	53.5 ± 10.14	46.1 ± 8.85^d	93.3 ± 3.27^d	$5,573\pm 884.8^d$
1,500	96.3 ± 3.47^b	69.1 ± 5.15^c	27.3 ± 2.27^b	64.5 ± 5.69	35.9 ± 2.50^c	80.9 ± 5.06^c	$4,373\pm 369.5^c$
3,000	98.3 ± 0.40^b	56.0 ± 4.85^b	42.2 ± 4.72^c	58.7 ± 1.34	19.2 ± 0.93^b	58.7 ± 5.64^b	$2,373\pm 166.5^b$
6,000	98.2 ± 0.35^b	40.8 ± 3.57^a	57.5 ± 3.52^d	54.5 ± 21.49	8.9 ± 3.40^a	40.8 ± 6.84^a	$1,067\pm 378.1^a$

*Different superscripts in the same column indicate significant differences ($P<0.05$).

Table 5. Changes of fertilizing rate (%), polyspermy rate (%), hatching rate (%) and final number of D-shape larvae of Eastern goosyduck clam *Panopea* sp. eggs washed on the different washing time after the fertilization*

Washing time (min.)	Fertilizing rate (%)	Normal fertilized eggs (%)	Polyspermy rate (%)	Hatching rate (%)	Rate of up to D-shape larvae (%)	Rate of hatching to D-shape larvae (%)	No. of final D-shape larvae (larvae/L)
0	77.0±5.42 ^a	76.6±4.99 ^d	0.5±0.79 ^a	95.8± 1.47 ^c	42.2±3.80 ^d	57.6± 5.14 ^b	7,833±629.2 ^d
0.5	92.1±2.79 ^b	91.7±3.51 ^e	0.5±0.78 ^a	93.3± 1.08 ^c	39.0±4.55 ^{cd}	45.7± 6.95 ^b	7,417±629.2 ^{cd}
1	96.1±3.37 ^{bc}	93.6±3.76 ^e	2.6±1.19 ^a	91.7± 6.39 ^c	35.5±2.09 ^c	41.5± 3.37 ^b	6,833±577.4 ^{cd}
5	98.7±0.04 ^c	37.7±6.92 ^c	61.0±6.90 ^b	69.3±19.63 ^{bc}	11.7±4.60 ^b	44.9±10.13 ^b	2,250±901.4 ^b
10	99.5±0.78 ^c	15.6±4.46 ^b	84.0±5.00 ^c	15.1±19.81 ^b	0.0±0.00 ^a	0.0±0.00 ^a	0.0±0.00 ^a
30	99.1±0.75 ^c	3.9±1.22 ^a	95.3±1.90 ^d	0.0±0.00 ^a	0.0±0.00 ^a	0.0±0.00 ^a	0.0±0.00 ^a

*Different superscripts in the same column indicate significant differences ($P<0.05$). The double superscripts (like ab, bc) indicate no significant difference with either component: ab is not significantly different from either a or b, etc.

한 크기의 종패 생산과 유생 사육 시 먹이생물의 관리 등과 같이 원활하면서 계획적인 양식이 가능해지기 때문에 산란유발 방법의 올바른 선택은 매우 중요하다(Alagarwami et al., 1982).

일반적으로 패류의 산란은 외부 및 내부의 자극 요인에 의해 조절되는데, 현재까지 주로 이용되고 있는 산란유발 방법에는 물리적 자극(간출 작용, 수온, 전기 및 자외선 조사 등), 화학적 자극(NH_4OH , H_2O_2 등) 및 생물학적 자극(정자현탁액, 신경절 현탁액, 세로토닌 주사 등)에 대한 연구들이 보고되고 있다(Loosanoff and Davis, 1963; Gibbons and Castagna, 1984; Matsutani and Nomura, 1987; Lee, 2001; Reuter and Levitan, 2010).

이중 Gibbons and Castagna (1984)는 패류의 산란유발을 위해 세로토닌이 간단하면서 가장 빠른 방법이라 하였다. 또한 일반적인 화학적 자극은 부화율이 낮아지는 부정적인 영향들이 있지만 세로토닌은 암컷의 산란양이 늘어나는 등의 효과가 있는 것으로 보고되었다(Matsutani and Nomura, 1987; Fong et al., 1996). 세로토닌에 대한 패류 산란 효과는 여러 문헌에서 보고되고 있다(Gibbons and Castagna, 1984; Alcazar et al., 1987; Vélez et al., 1990; Fong et al., 1996; Velasco et al., 2007). 하지만, 아직까지 동해코끼리조개는 산업화되지 않은 종이기 때문에 세로토닌의 적용사례는 찾아볼 수 없다.

지금까지 동해코끼리조개(*Panopea* sp.)는 절개법을 통해 수정란 확보하는 것이 가장 효과적이었다(Kishioka, 2006). 이에 비해 본 연구에서는 세로토닌을 적용한 실험에서 암컷과 수컷 개체의 산란 유발률은 각각 55%와 35%로 조사되었고, 1회 주사를 통해 알과 정자를 얻은 개체들과 방란/방정을 하지 않았던 개체들은 절개법과 달리 다시 수정란 확보에 이용할 수도 있기 때문에 어미로의 활용도를 높일 수 있는 방법이기도 하다.

한편 본 연구에서와 같이 세로토닌을 처리한 6종의 이매패류들은 15분 이내에 27–83%의 높은 산란 반응을 보였다(Gibbons and Castagna, 1984). 또한 세로토닌이 *Spisula solidissima*와 *S. sachalinensis*의 난모세포의 성숙(Hirai et al., 1988)과 *in vitro*에서 *Patinopecten yessoensis*의 난소 조직에서 난의 방

출 효과(Matsutani and Nomura, 1987)가 확인되기도 하였다.

세로토닌은 다음의 몇 가지 기작에 의해 패류 체란에 작용하게 된다. 첫 번째로, 생식소 내 생식세포와 신경세포 내 존재하는 세로토닌 수용기를 자극해서 산란을 촉진하는 것이다(Matsutani and Nomura, 1987). 세로토닌은 근육주사뿐만 아니라 세로토닌 희석액에 침지를 해도 산란에 영향을 미치게 된다(Matsutani and Nomura, 1987; O'Connor and Heasman, 1995). 두 번째로, 세로토닌이 연체동물의 산란에서 중요한 prostaglandin (혹은 prostaglandin amine)의 생합성 및 축적에 영향을 미치게 되어 산란유도를 할 수 있다(Osada et al., 1992; Deridovich and Reunova, 1993). 세 번째로, 세로토닌에 의해 특정 이온의 농도와 효소의 활성이 증가되어 산란 기구에 반응을 유도한다(Gobet et al., 1995; Durocher and Guerrier, 1996). 마지막으로, 세로토닌이 생식소 촉진 호르몬(gonad stimulating hormone)에 직접적으로 영향을 준다(Sarojini et al., 1995).

이처럼 다수의 문헌에서 세로토닌이 다양한 대사 기작과 경로를 통해 산란유발 효과에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 보고하고 있다. 본 연구에서 세로토닌을 적용한 실험구도 상기에서 언급한 이러한 이유에 의해 산란 기구에 영향을 미쳐 높은 산란유발 효과와 양질의 수정란을 다량 확보할 수 있었다. 하지만, 본 연구에서 이용된 성숙유도 호르몬인 hCG 및 LHRH의 실험구에서는 세로토닌과 상이한 결과를 보이는 것으로 나타났다. 일반적으로 hCG는 해수 및 담수산 어류의 산란 유도에 많이 이용되어지고 있는 호르몬으로 체내에서 prostaglandin을 공급하는 효과를 가진다(Goo et al., 2015). 또한 상용화되고 있는 hCG와 LHRH의 활용 가능성도 본 연구에서 확인하였지만, 동해코끼리조개에서는 산란 유발 효과를 기대할 수 없었다. 이들 호르몬은 미숙한 생식세포를 성숙시켜 최종 산란까지 이르게 하는 것들로 결국 세로토닌의 체란 기작은 성숙을 유도하거나 촉진시키는 것보다는 성숙된 생식세포(성숙한 알과 정자)의 배출에 도움을 주는 것으로 확인되었다.

호르몬(유도제) 및 신경전달물질의 처리에 의한 산란유도 방법은 같은 종에 있어서도 처리농도에 따라 반응이 다르기(Song

et al., 2008) 때문에 우량 수정란을 대량으로 확보하기 위해서는 세로토닌 처리농도를 결정하는 것은 매우 중요한 일이다. 본 연구에서도 세로토닌의 농도별 처리에 따라 암, 수컷의 산란유발 반응이 달리 나타나는 것으로 조사되었다. 암, 수컷은 세로토닌의 농도가 증가할수록 방란, 방정의 유발률이 높아지는 경향을 보였는데, 2 mM 세로토닌의 1 mL 주사 암컷과 수컷 모두 방란/방정 효과가 극대화되었다. 하지만, *Hippopus porcellanus* 및 *Tridacna squamosa* (Alcazar et al., 1987), *P. yessoensis* (Matsutani and Nomura, 1987), *Semisulcospira gottschei* (Chang et al., 2005)에서 확인된 바와 같이 과도한 농도의 주사는 호르몬 효과를 기대할 수 없거나 효과가 낮아지는 경향을 보여서 본 연구와 같이 적정농도를 지켜서 주사하는 것이 바람직하다고 할 수 있다.

본 연구에서 방란, 방정을 위해서 수조 하나에 한 마리의 어미를 수용하여 채란/채정하였다. 이 과정에서 채정된 정자의 활력은 양질의 수정란 확보에 많은 영향을 준다(Koldras and Mejza, 1983; Lee et al., 1996). 채정된 정자의 경과시간에 따른 수정란의 수정률은 종마다 다소 다른 시간범위를 보이며(Gribben et al., 2014). 연체동물의 수정란 확보를 위해 채정 이후 1시간이 경과되면 수정률 감소가 나타난다는 보고가 있어서, 채정된 정자의 시간에 따른 활력은 중요한 요인이라 할 수 있다(Babcock and Keesing, 1999; Gribben et al., 2014). 이러한 정자 활력은 수온에도 많은 영향을 받게 되는데, 동일 종(*Chlamys asperima*)에서도 낮은 수온에서 활력을 유지하는 시간이 길었던 것으로 확인되었다(O'Connor and Heasman, 1995). 본 연구에서도 동해코끼리조개의 세로토닌에 의해 채정된 정자의 활력은 2 시간까지 높게 유지됨이 관찰되어, 2시간 이내로 채정된 정자를 이용하여 수정한 경우 수정률 저하의 영향은 미미할 것으로 사료된다.

일반적으로 우량의 수정란을 대량 확보하기 위해서는 암컷 어미의 배란유도와 동시에 인공수정을 위한 정액 확보가 필수적이며, 이 때 확보된 정액 중 적정 농도는 정상적인 수정, 부화, 수정란의 생산 및 유생 발달을 위해 매우 중요한 요인으로 작용하게 된다(O'Connor and Heasman, 1995).

이매패류 종류별로 정자의 활력과 수정을 위한 최적 정자 농도는 종에 따라 다양함이 보고되었다(Ginzburg, 1975) 본 연구에서는 다정수정률을 예방하기 위한 동해코끼리조개 정자의 농도는 750 sperms/mL 이하 농도와 함께 1분 이내에 수정을 종료하고 세란을 하는 것이 가장 바람직한 것으로 나타났다. 또한, 정자를 현탁 후 지체하지 않고 바로 세란하는 것도 다정수정 예방에 매우 좋은 결과를 얻었기 때문에 고농도의 정자를 통한 수정을 행할 때 시간을 지체할 필요는 없는 것으로 판단된다.

왕우럭조개(*Tresus keenae*) (Kang and Kim, 2018), New Zealand geoduck (*P. zelandica*) (Gribben et al., 2014)의 다정수정을 방지하기 위한 적정 정자 밀도는 본 연구보다 100-10,000배 이상의 높은 농도를 제시하고 있다. 이들은 세란시간

이 제시되지 않았지만, 적정량 이상의 정자 농도에서는 Styan and Butler (2000)의 보고와 같이 다정수정(polyspermy)으로 인한 수정률뿐만 아니라 이후 D상 유생으로의 발달비율에 영향을 미치는 것이기 때문에 적정 정자 농도를 유지하는 것이 바람직할 것으로 판단된다.

본 연구를 종합해 보면, 본 연구에서 활용한 세로토닌은 Gibbons and Castagna (1984)에서와 같이 산란 유발 효과가 있었으며, O'Connor and Heasman (1995)과 같이 수정률과 유생의 생존율에 미치는 부정적인 영향은 없는 것으로 확인되었다. 또한 세로토닌 주사를 통해 산란을 위한 모패의 재사용부터 우수한 산란유발 반응, 계획적인 수정란 확보와 사육을 위한 좋은 결과를 얻을 수 있었다. 향후 동해코끼리조개 뿐만 아니라 타 이매패류의 종자생산에 세로토닌의 적극적인 활용이 기대된다.

사 사

이 논문은 2022년 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임(코끼리조개 양식산업화 기술개발, 2018-0377).

References

- Alagarswami K, Dharmaraj S, Velayudhan TS, Chellam A and Victor ACC. 1982. On controlled spawning of Indian pearl oyster *Pinctada fucata* (Gould). Proc Symp Coastal Aquaculture 2, 590-597.
- Alcazar SN, Solis EP and Alcalá AC. 1987. Serotonin-induced spawning and larval rearing of the China clam, *Hippopus porcellanus* Rosewater (Bivalvia: Tridacnidae). Aquaculture 66, 359-368. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(87\)90119-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90119-0).
- Babcock R and Keesing J. 1999. Fertilization biology of the abalone *Haliotis laevis*: laboratory and field studies. Can J Fish Aquatic Sci 56, 1668-1678. <https://doi.org/10.1139/f99-106>.
- Chang HJ, Min BH, Bang IC, Kim YJ and Chang YJ. 2005. Parturition induction on melania snails, *Semisulcospira libertina libertina* and *Semisulcospira gottschei*. Dev Reprod 9, 7-13.
- Deridovich II and Reunova OV. 1993. Prostaglandins: Reproduction control in bivalve molluscs. Comp Biochem Physiol A Physiol 104, 23-27. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(93\)90003-M](https://doi.org/10.1016/0300-9629(93)90003-M).
- Duncan DB. 1955. Multiple-range and multiple F tests. Biometrics 11, 1-42. <https://doi.org/10.2307/3001478>.
- Durocher Y and Guerrier P. 1996. Activation of an 85 kDa ribosomal S6 kinase during serotonin-induced oocyte maturation. Int J Dev Biol 40, 557-566.
- Fong PP, Deguchi R and Kyojuka K. 1996. Serotonergic ligands induce spawning but not oocyte maturation in the bivalve

- Maetra chinensis* from central Japan. Biol Bull 191, 27-32. <https://doi.org/10.2307/1543058>.
- Gibbons MC and Castagna M. 1984. Serotonin as an inducer of spawning in six bivalve species. Aquaculture 40, 189-191. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(84\)90356-9](https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90356-9).
- Ginzburg A. 1975. Fertilization of the eggs of bivalve mollusks with different insemination conditions. Sov J Dev Biol 5, 300-308.
- Gobet I, Lippai M, Tomkowiak M, Durocher Y, Leclerc C, Moreau M and Guerrier P. 1995. 4-Aminopyridine acts as a weak base and a Ca²⁺ mobilizing agent in triggering oocyte meiosis reinitiation and activation in the Japanese clam, *Ruditapes philippinarum*. Int J Devel Biol 39, 458-491.
- Goo IB, Park IS, Gil HW and Im JH. 2015. Stimulation of spermination by human chorionic gonadotropin and carp pituitary extract in grass puffer, *Takifugu niphobles*. Dev Reprod 19, 253-258. <https://doi.org/10.12717/DR.2015.19.4.253>.
- Gribben PE, Millar RB and Jeffs AG. 2014. Fertilization success of the New Zealand geoduck, *Panopea zelandica*: Effects of sperm concentration, gamete age and contact time. Aqua Res 45, 1380-1388. <https://doi.org/10.1111/are.12085>.
- Hirai S, Kishimoto T, Kadam AL, Kanatani H and Koide SS. 1988. Induction of spawning and oocyte maturation by 5-hydroxytryptamine in the surf clam. J Exp Zool 245, 318-321. <https://doi.org/10.1002/jez.1402450312>.
- Kang HS and Kim CW. 2018. Spawning and larval developments of the surf clam, *Tresus keenae*. Korean J Malacol 34, 9-15. <https://doi.org/10.9710/kjm.2018.34.1.9>.
- Kishioka M. 2006. Spawning season and artificial breeding of larvae using eggs gathered by incision method from Nami-gai *Panopea japonica* A. Adams in the Suo-Nada region off Yamaguchi prefecture. Bull Yamaguchi Prof Fish Res Ctr 4, 119-128.
- Koldras M and Mejza T. 1983. Effects of quantity and quality of carp sperm on egg fertilisation success. Acta Ichthyol Piscat 8, 83-92. <https://doi.org/10.3750/AIP1983.13.2.05>.
- Lee JY, Chang YJ and Park YJ. 1996. Spawning induction and egg development of surf clam, *Spisula sachalinensis*. J Aquacult 9, 419-427.
- Lee JY. 2001. Reproductive cycle and seedling production of surf clam, *Spisula sachalinensis*. Ph.D. Dissertation, Pukyong National University, Busan, Korea.
- Loosanoff VL and Davis HC. 1963. Rearing of bivalve mollusks. Adv Mar Biol 1, 1-136. [https://doi.org/10.1016/S0065-2881\(08\)60257-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2881(08)60257-6).
- Matsutani T and Nomura T. 1987. *In vitro* effects of serotonin and prostaglandins on release of eggs from the ovary of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. Gen Com Endocrinol 67, 111-118. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(87\)90210-3](https://doi.org/10.1016/0016-6480(87)90210-3).
- Morsan E, Zaidman P, Ocampo-Reinaldo M and Ciocco N. 2010. Population structure, distribution and harvesting of southern geoduck, *Panopea abbreviata*, in San Matias Gulf (Patagonia, Argentina). Sci Mar 74, 763-772. <https://doi.org/10.3989/scimar.2010.74n4763>.
- Nam MM, Lee C, Kim M, Kim JW and Kim YD. 2014. Development and growth in fertilized eggs and larvae of the Japanese geoduck, *Panopea japonica* reared in the laboratory. Korean J Malacol 30, 303-309. <https://doi.org/10.9710/kjm.2014.30.4.303>.
- O'Connor WA and Heasman MP. 1995. Spawning induction and fertilisation in the doughboy scallop *Chlamys (Mimachlamys) asperrima*. Aquaculture 136, 117-129. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01040-8](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01040-8).
- Osada M, Morim K and Nomura T. 1992. *In vitro* effects of estrogen and serotonin on release of eggs from the ovary of the scallop. Nippon Suisan Gakk 58, 223-227. <https://doi.org/10.2331/suisan.58.223>.
- Reuter KE and Levitan DR. 2010. Influence of sperm and phytoplankton on spawning in the Echinoid *Lytechinus variegatus*. Biol Bull 219, 198-206.
- Sarojini R, Nagabhusanam R and Fingerman M. 1995. *In vivo* effects of dopamine and dopaminergic antagonists on testicular maturation in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. Biol Bull 189, 340-346. <https://doi.org/10.2307/1542151>.
- Sharker MR, Kim SC, Sumi KR, Sukhan ZP, Sohn YC, Lee WK and Kho KH. 2020. Characterization and expression analysis of a GnRH-like peptide in the Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*. Agri Gene 15, 100099. <https://doi.org/10.1016/j.aggene.2019.100099>.
- Song YB, Baek HJ, Kim HB, Soyano K, Kim SJ and Lee YD. 2008. Induction of maturation and ovulation with HCG treatment in the sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*. J Aquacult 21, 96-101.
- Styan CA and Butler AJ. 2000. Fitting fertilization kinetics models for free-spawning marine invertebrates. Mar Biol 137, 943-951. <https://doi.org/10.1007/s002270000401>.
- Velasco LA, Barros J and Acosta E. 2007. Spawning induction and early development of the Caribbean scallops *Argopecten nucleus* and *Nodipecten nodosus*. Aquaculture 266, 153-165. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.02.015>.
- Vélez A, Alifá E and Azuaje O. 1990. Induction of spawning by temperature and serotonin in the hermaphroditic scallop, *Pecten ziczac*. Aquaculture 84, 307-313. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(90\)90095-5](https://doi.org/10.1016/0044-8486(90)90095-5).
- You BJ, Jeong IH, Lee KH and Choi HG. 1993. Quality and storage stability of frozen geoduck (*Panopea japonica* A. Adams). Bull Korean Fish Soc 26, 549-556.