

제주연안 아열대 굴의 번식, 면역 생리 및 분자생물학적 분류

Studies on the reproduction, immunology and molecular phylogenetics of subtropical oysters in Jeju Island

주관연구기관	제주대학교
연구책임자	최광식
발행년월	2013-04
주관부처	교육과학기술부
사업관리기관	한국연구재단
NDSL URL	http://www.ndsl.kr/ndsl/search/detail/report/reportSearchResultDetail.do?cn=TRKO201300034750
IP/ID	14.49.138.138
이용시간	2017/11/02 17:21:10

저작권 안내

- ① NDSL에서 제공하는 모든 저작물의 저작권은 원저작자에게 있으며, KISTI는 복제/배포/전송권을 확보하고 있습니다.
- ② NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 상업적 및 기타 영리목적으로 복제/배포/전송할 경우 사전에 KISTI의 허락을 받아야 합니다.
- ③ NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 보도, 비평, 교육, 연구 등을 위하여 정당한 범위 안에서 공정한 관행에 합치되게 인용할 수 있습니다.
- ④ NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 무단 복제, 전송, 배포 기타 저작권법에 위반되는 방법으로 이용할 경우 저작권법 제136조에 따라 5년 이하의 징역 또는 5천만 원 이하의 벌금에 처해질 수 있습니다.

중견연구자지원사업(핵심연구) 최종보고서

양식A101

① 부처사업명(대)	기초연구사업			보안등급(보안, 일반)	일반
② 사업 명(중)	중견연구자지원사업			공개가능여부(공개, 비공개)	공개
③ 세부사업명(소)	핵심연구(개인)				
④ 과제성격(기초, 응용, 개발)	기초		④-1 실용화 대상여부(실용화, 비실용화)	비실용화	
⑤ 과제명	국문	제주연안 아열대 굴의 번식, 면역 생리 및 분자생물학적 분류			
	영문	Studies on the reproduction, immunology and molecular phylogenetics of subtropical oysters in Jeju Island			
⑥ 주관연구기관	제주대학교				
⑦ 협동연구기관					
⑧ 주관연구책임자	성명	최광식		직급(직위)	
	소속부서	제주대학교 해양과학대학		전공	

⑨ 연구개발비 및 참여연구원수 (단위: 천원, M·Y)

년도	정부출연금 (A)	기업체부담금			정부외 출연금 (B)	상대국 부담금 (F)	합계 $G=(A+B+E)$	참여 연구원수
		현금 (C)	현물 (D)	소계 $E=(C+D)$				
1차년도	97,000			0			97,000	8
2차년도	97,000			0			97,000	8
3차년도	97,000			0			97,000	6
4차년도				0			0	
5차년도				0			0	
합계	291,000	0	0	0	0	0	291,000	22

⑩ 총연구기간	2010. 05. 01 – 2013. 04. 30 (36 개월)							
⑪ 다년도협약연구기간	2010. 05. 01 – 2013. 04. 30 (36 개월)							
⑫ 당해연도연구기간	2012. 05. 01 – 2013. 04. 30 (12 개월)							
⑬ 참여기업	중소기업수	대기업수	기타	계	0			
⑭ 국제공동연구	상대국연구기관수	상대국연구개발비	상대국연구책임자수					

관계규정과 모든 지시사항을 준수하면서 이 연구개발사업을 성실히 수행하였으며 아래와 같이 최종보고서를 제출합니다.

2013년 4월 16일

주관연구책임자 : 최광식 (인)

주관연구기관장 : 제주대학교 산학협력단장 이남호 (직인)

교육과학기술부장관

〈 목 차 〉

I . 연구계획 요약문

- | | |
|----------------|---|
| 1. 국문요약문 | 3 |
|----------------|---|

II . 연구결과 요약문

- | | |
|----------------|---|
| 1. 국문요약문 | 4 |
| 2. 영문요약문 | 5 |

III. 연구내용

- | | |
|------------------------------|----|
| 1. 연구개발과제의 개요 | 6 |
| 2. 국내외 기술개발 현황 | 8 |
| 3. 연구수행 내용 및 결과 | 10 |
| 4. 목표달성을 및 관련분야에의 기여도 | 80 |
| 5. 연구결과의 활용계획 | 81 |
| 6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 | 84 |
| 7. 주관연구책임자 대표적 연구실적 | 85 |
| 8. 참고문헌 | 85 |
| 9. 연구성과 | 90 |
| 10. 기타성과 | 94 |

〈 연구계획 요약문 〉

양식 A 201

연구의 목적 및 내용	제주연안의 암반 조하대는 연중 14~25°C의 높은 수온으로 인하여 다양한 저서생물이 분포하고 있으며, 최근 들어 다양한 아열대 외래종이 유입되고 있다. 특히 과거 20년간 제주연안에서 다양한 아열대성 굴이 분포하고 있음이 확인되고 있으나 이들에 관한 연구는 미진한 실정이다. 이 연구는 제주 연안에 서식하고 있는 아열대 굴의 성장 및 번식과 해양환경 인자와의 관계를 조사하며, 수온상승으로 인한 아열대성 외래저서생물의 제주도 유입 기작을 구명한다. 또한 유세포 분석기를 이용하여 제주연안에 분포하는 굴의 면역학적 특성을 조사, 해산이매패류의 혈액학적/면역학적 특성을 연구하며, DNA marker를 이용하여 우리나라에 분포하는 굴류의 분류학적 관계를 재정립하여, 향후 종 다양성 보존 및 산업화에 활용한다. 또한 이 연구의 결과물을 국제 저명학술지에 발표하여, 향후 해산이매패류의 기초생물학적 연구에 있어 국가적 학문 우위를 선점하고자 한다.									
연구결과	<p>■ 굴의 면역력 측정 및 혈구 유형분석</p> <ul style="list-style-type: none"> - 유세포 분석기 (flow cytometer)를 이용한 굴 혈구의 집단 구조 특성, 식세포작용, 혈구수의 변화, 활성산소생산량, 혈구 사망률 및 DNA 손상도 등을 계절적으로 분석하여 아열대 굴의 면역 요소 및 특징 분석. <p>■ 굴의 유전학적 유연관계 분석 및 gene marker 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 제주연안에 서식하는 아열대성 굴 류의 형태적 특징 관찰 (꽤틀 및 육질관찰). 우리나라 굴 (제주도 포함)의 분자생물학적 분류를 위한 gene marker (small subunit RNA, internal transcribed spacer, histone 3, cytochrome oxidase I) 개발 - DNA marker를 이용한 우리나라 연안 (제주도 포함)에 분포하는 굴류의 분류학적 유연관계 구명. <p>■ 제주연안에 서식하는 굴들의 성 성숙 및 산란시기 규명</p> <ul style="list-style-type: none"> - 조직학적/생화학적 방법을 이용한 제주연안에 분포하는 아열대성 굴과 생물들의 연중생식주기 구명, 건강도 (Condition Index) 및 유생 관찰과 이들 발생 및 성장에 미치는 수온, 먹이 및 염분 등의 환경인자의 영향 관찰 									
연구결과의 활용계획	<p>■ 제주연안에 서식하고 있는 굴의 산업적 응용</p> <ul style="list-style-type: none"> - 지구온난화로 인한 아열대종 (아열대분포 굴류)의 우리나라 연안유입에 대한 기초자료 확보 및 이들의 생태적 특성 구명 - 대형종인 겹지붕굴, 태생굴 및 중국굴의 번식주기를 바탕으로 이들 굴 유생의 출현시기파악 및 자연체묘를 통한 종폐확보 - 서귀포 또는 위미 항 내에 Pilot Scale의 수하양성시설 설치 및 채묘된 종굴 육성을 통한 산업화 가능성 타진 (3차년도 및 그 이후). <p>■ 연구성과물의 국제저명학술지 발표: 3년간 연구결과를 SCI급 학술지에 4편 이상 발표</p>									
중심어	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">굴</td><td style="text-align: center; padding: 2px;">분자생물학적 분류</td><td style="text-align: center; padding: 2px;">면역생리</td></tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">번식</td><td style="text-align: center; padding: 2px;">DNA marker</td><td style="text-align: center; padding: 2px;">유세포분석기</td></tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">생태</td><td style="text-align: center; padding: 2px;">성장</td><td style="text-align: center; padding: 2px;">혈구</td></tr> </table>	굴	분자생물학적 분류	면역생리	번식	DNA marker	유세포분석기	생태	성장	혈구
굴	분자생물학적 분류	면역생리								
번식	DNA marker	유세포분석기								
생태	성장	혈구								

〈 연구결과 요약문 〉

〈한글요약문〉

양식 A 202

연구의 목적 및 내용	<p>제주연안의 암반 조하대는 연중 14–25°C의 높은 수온으로 인하여 다양한 저서생물이 분포하고 있으며, 최근 들어 다양한 아열대 외래종이 유입되고 있다. 특히 과거 20년간 제주연안에서 다양한 아열대성 굴이 분포하고 있음이 확인되고 있으나 이들에 관한 연구는 미진한 실정이다. 이 연구는 제주 연안에 서식하고 있는 아열대 굴의 성장 및 번식과 해양환경 인자와의 관계를 조사하며, 수온상승으로 인한 아열대성 외래저서생물의 제주도 유입 기작을 구명한다. 또한 유세포 분석기를 이용하여 제주연안에 분포하는 굴의 면역학적 특성을 조사, 해산이매패류의 혈액학적/면역학적 특성을 연구하며, DNA marker를 이용하여 우리나라에 분포하는 굴류의 분류학적 관계를 재정립하여, 향후 종 다양성 보존 및 산업화에 활용한다. 또한 이 연구의 결과물을 국제 저명학술지에 발표하여, 향후 해산이매패류의 기초생물학적 연구에 있어 국가적 학문 우위를 선점하고자 한다.</p>		
연구결과	<ul style="list-style-type: none"> ■ 굴의 면역력 측정 및 혈구 유형분석 <ul style="list-style-type: none"> - 제주연안 서식 굴 (중국굴, 가시굴, 태생굴)의 혈구내 세포 집단 및 면역학적 특성 구명 - 계절에 따른 제주 연안 굴 (중국굴, 가시굴) 성장, 번식에 의한 혈구의 세포면역기능의 계절적 변화 구명 ■ 굴의 유전학적 유연관계 분석 및 gene marker 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 우리나라 굴 (제주도 포함)의 분자생물학적 분류를 위한 small subunit RNA, internal transcribed spacer, histone 3, cytochrome oxidase I 유전자 클로닝 및 유전정보 확보 - DNA marker를 이용한 우리나라 연안 (제주도포함)에 분포하는 굴류의 분류학적 유연관계 구명. ■ 제주연안에 서식하는 굴들의 성 성숙 및 산란시기 규명 <ul style="list-style-type: none"> - 조직학적/생화학적 방법을 이용한 제주연안에 분포하는 아열대성 굴과 생물들의 연중생식주기 구명 - 아열대 굴의 건강도 (Condition Index) 및 초기 배 발생 (early embryogenesis) 관찰 ■ 제주연안에 서식하는 굴의 식품영양학적 특성 규명 <ul style="list-style-type: none"> - 제주 연안 서식 굴 (중국굴)의 식품 영양학적 특성 (아미노산, 지방산) 구명 ■ 연구 성과 <ul style="list-style-type: none"> - 국제 저명학술지 3편 발표, 국내·외 학술발표 9회 		
연구결과의 활용계획	<ul style="list-style-type: none"> ■ 제주연안에 서식하고 있는 굴의 산업적 응용 <ul style="list-style-type: none"> - 지구온난화로 인한 아열대종 (아열대분포 굴류)의 우리나라 연안유입에 대한 기초자료 확보 및 이들의 생태적 특성 구명 - 가시굴 및 중국굴의 번식주기를 바탕으로 이들 굴 유생의 출현시기파악 및 자연채묘를 통한 종재화보 - 서귀포 또는 위미 항 내에 Pilot Scale의 수하양성시설 설치 및 채묘된 종굴 육성을 통한 산업화 가능성 타진 (3차년도 및 그 이 후). ■ 연구성과물의 국제저명학술지 발표: 연구결과를 SCI급 학술지에 1편 투고 및 3편 이상 투고 예정 		
중심어	굴	분자생물학적 분류	면역생리
	번식	DNA marker	유세포분석기
	생태	성장	혈구

< SUMMARY >

양식 A203

Purpose& contents		<p>Previous studies have reported on the occurrence of subtropical oysters in shallow subtidal in Jeju Island where benthic animal diversity is recorded to be the highest in Korea. These subtropical oysters are believed to be extending their distribution range from southern Asia to Jeju due to the global seawater temperature increase. The objective of this study is to investigate effects of environmental factors (water temperature, salinity and food availability) on growth and reproduction of the subtropical oysters in an attempt to understand the range extension of those warm water oysters to Jeju. The present study also develops gene markers such as 18S, ITS histone 3 and COI to investigate phylogenetic relationship among different species of oysters in Korea. Blood types and immune parameters of the subtropical oysters are also evaluated in this study using flow cytometry.</p>	
Result		<ul style="list-style-type: none"> Flow cytometric assessment of immune parameters of Korean oysters <ul style="list-style-type: none"> - Evaluation of immune parameters (hemocyte cell populations, phagocytosis and oxidative rates) of the tropical oysters (<i>Hyotissa hyotis</i>, <i>Saccostrea kegaki</i> and <i>Ostrea circumpecta</i>) collected from Jeju island at cellular level using flow cytometry. - Seasonal variations of immune parameters of the tropical oyster's hemocytes (<i>H. hyotis</i> and <i>S. kegaki</i>) due to growth and reproduction effect. Genetic relationship analysis and gene marker development of Korean oyster species <ul style="list-style-type: none"> - Establishment of the genetic information (SSU rDNA, ITS, H3 and COI genes) of Korean oysters collected from Korean water including Jeju Island - Investigation of phylogenetic affiliations of Korean oysters using DNA markers Understanding life history of the subtropical oysters, <i>Hyotissa hyotis</i> and <i>Saccostrea Kegaki</i> in coastal Jeju <ul style="list-style-type: none"> - Investigation on annual gametogenesis of the tropical oysters using histology and biochemical assay - Investigation on the condition index and early embryogenesis of the tropical oysters Primary study of food and nutritional characteristics of the subtropical oysters (<i>Hyotissa hyotis</i>) in coastal Jeju <ul style="list-style-type: none"> - Investigation on food and nutritional characteristics (amino acid and lipid) of the subtropical oyster Output <ul style="list-style-type: none"> - Publications: 3 papers (SCI Journal), Presentation: 9 (domestic/international conference) 	
Expected Contribution		<ul style="list-style-type: none"> Understanding effect of global climate changes in Jeju water <ul style="list-style-type: none"> - Effects of water temperature on reproduction and growth of the oysters in Jeju helps to understand progression of global warming in Jeju coast. Aquaculture development of subtropical oysters in Jeju Island <ul style="list-style-type: none"> - Information on annual gametogenesis and somatic/shell growth of those subtropical oysters will be utilized in aquaculture development of those species in Jeju water, such as timing of natural spat collection. - A pilot scale of suspended culture system will be installed in the Weimi or Seogwipo Harbor to culture subtropical oysters after the completion of this study. Publication of the output from this study <ul style="list-style-type: none"> - Data obtained from the proposed study will be published as articles in Science Citation Indexed (SCI) journals (1 submitted or 3 more articles). 	
Keywords			
Oyster		Molecular phylogeny	Immunology
Annual gametogenesis		DNA marker	Flow cytometry
Ecology		Reproduction	Hemocyte

< 연구내용 및 결과 >

양식A301

- ◎ 1. 연구개발과제의 개요 ~ 10. 기타사항을 항목에 따라 작성함
- ◎ 제목 14point, 소제목 12point, 본문내용은 10point로 작성하며, 줄 간 간격은 조정 가능함
- ◎ **연구내용 및 결과(1번부터 10번까지)는 100페이지 이내로 작성함**
- ◎ 내용 작성과 관련한 설명내용(**청색 박스로 표시된 부분**)은 내용 작성 시 제거하고 기술함

1. 연구개발과제의 개요

굴 (oyster)은 전 세계 연안의 조간대 및 조하대에 분포하는 저서동물로 해양생태계에 있어 식물 플랑크톤에 의한 1차 생산을 소비하는 역할을 한다. 굴은 수산 양식업 종으로서 높은 경제적 가치와 더불어 고착생물로서 해양환경 변화를 모니터링 함에 있어 지표 종으로도 널리 활용되고 있다 (Damiensa et al. 2006). 현재까지 세계적으로 학계에 보고된 굴은 200여 종이 되지만, 상업적으로 활용되고 있는 굴은 굴과 (Family: Osteridae)에 속하는 *Crassostrea gigas*, *C. virginica*, *C. rhizophorae*, *Ostrea edulis*, *Saccostrea cucullata*, *S. echina* 를 포함한 10종 미만인 것으로 알려지고 있다 (Gosling, 2003).

민 (2004)에 의하면 우리나라 연안에는 총 14종의 굴이 분포하고 있으며, 이 중 참굴 (*C. gigas*)은 우리나라 수산양식의 대표 어종이며 세계적으로 가장 널리 양식종으로 활용되고 있는 종이다. 최근 들어 남해안에 분포하고 있는 바위굴 (*C. nippona*), 강굴 (*C. ariakensis*), 벗굴 (*O. denselamellosa*) 또한 양식어종으로 그 가치를 인정받아 이들 종의 생태에 관한 연구가 이루어진 바 있다. 특히 민 (2004)과 Noseworthy et al (2002, 2007)은 제주연안에 분포하고 있는 패류에 관한 보고를 통하여 제주 연안에 총 8종의 굴, 즉 중국굴 (*Hyotissa hyotis*), 겹지붕굴 (*Parahyotissa inermis*), 주홍굴 (*P. chemnitzi*), 악어굴 (*Dendostrea folia*), 톱니턱굴 (*D. crenulifera*), 주름가시굴 (*C. nigromarginata*), 가시굴 (*S. kegaki*), 태생굴 (*Striostrea circumpicta*)이 분포한다고 보고한 바 있다. 제주도 연안의 연중 수온은 14~25°C 범위이며, 특히 겨울철 최저 수온은 14~16°C 범위로 우리나라의 서해안 (4~7°C), 남해안 (7~11°C), 동해안 (4~6°C)에 비해 월등이 높다. 현재 제주도에 서식하는 굴 류는 대부분 그 지리적 분포가 동남아시아, 중국 남부와 같은 아열대 및 열대지역이다. 이들 아열대성 굴이 제주에 언제부터 서식하였는지는 정확히 알 수 없으나, 지구온난화와 관련된 해수면의 수온상승이 이들 종의 제주도 출현과 관련이 있는 것으로 생각된다.

제주연안에 서식하는 굴에 대한 보고는, 유 (1976), 민 (2004) 및 Noseworthy 등 (2002, 2007)이 있으며, 이중 1995년 이전의 보고서에는 3~4종의 굴 만이 제주에서 확인되었으나, 2000년 이후 보고에서는 다수의 아열대 기원 종이 제주 연안, 특히 남부 서귀포 연안에 분포하고 있는 것으로 확인되었다. 제주연안의 굴에 관한 연구는 태생굴 (*O. circumpicta*)의 유생관찰 및 생식소 발달에 관한 연구 (Kang et al. 2004)가 있으나, 태생굴의 생식주기, 성장 및 환경인자와의 상관관계에 대한 연구는 아직 이루어지지 않은 실정이다. 또한, 제주도 서식 굴 중 태생굴, 겹지붕굴, 가시굴, 톱니턱굴은 연안 방파제, 항만 구조물 및 문섬이나 범섬과 같은 해양공원의 천해 암반 조하대에서 쉽게 관찰되며, 특히 범섬, 문섬 및 숲섬과 같은 서귀포 해양공원 내 무인도에 높은 밀도로 분포하고 있다. 중국굴 및 겹지붕굴은 그 크기 및 생체량 (somatic tissue weight)이

참굴이나 벗굴 보다 월등하여, 향후 제주지역에서 양식어종으로서의 잠재적 가치가 높게 평가된다. 그러나 현재 이들 아열대기원 굴에 대한 연구는 형태학적 분류에 그치고 있으며, 이들 아열대 굴의 개체 생태 및 유전학적 연구는 부재한 실정이다.

Cheng (1981)은 해산 이매패의 혈구를 형태-기능적 특성에 따라 granulocyte와 hyalinocyte로 구분하였다. 이매패의 혈구를 형태와 기능을 분석하는데 일반적인 현미경이 사용되었으나, 이는 분석 속도가 느리고 혈구의 면역기능을 측정하고 정량적으로 분석하기에 부적합하다. 반면에 유세포 분석기 (Flow cytometer)는 신속·정확한 방법으로 다양한 세포의 기능들을 정량적으로 측정할 수 있어 해산 이매패 혈구의 세포성 면역기작을 측정에 매우 유용하다. 유세포분석기는 대서양굴 (*C. virginica*)과 참굴 (*C. gigas*)의 혈구 크기와 밀도 등을 분석하는데 있어 널리 활용되어 왔으며, 혈구 집단의 특징이 종에 따라 상이한 것으로 보고되고 있다 (Lambert et al., 2003; Hégaret et al., 2003a and b; Goedken and Guise, 2004; Donaghy et al., 2009a, b). 이는 이매패류의 종에 따라 granulocyte, hyalinocyte 등 주요 혈구 세포의 크기와 그 밀도가 다를 수 있어 각 종의 특성이 될 수 있음을 의미한다. 또한 해산이매패류의 면역기능은 환경인자의 영향에 따라 다양히 변화하는 것으로 보고되고 있으며 (Donaghy et al. 2009a) 최근 들어 해양환경변화 모니터링 및 저서생물의 건강도 측정 등에도 활발히 이용되고 있다 (Donaghy et al., 2009b)

굴의 분류학적 분석은 외형적 특징을 바탕으로 패각의 형태 및 색, 육질부의 해부학적 특징 연구가 주를 이루고 있으나, 이들 외형적 특징은 환경적 인자에 매우 가변적이고 민감하여 분류학적 정보를 제공하는데 한계점이 있다. 최근에는 분자생물학적 방법의 응용으로 굴을 포함한 이매패류의 형태분류학적 문제점을 극복하기 위해 핵 또는 미토콘드리아에 존재하는 유전자의 염기서열 분석에 기초한 분자적 계통 분류 및 종 분류를 위한 gene marker 개발에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다 (Ó Foighil and Taylor, 2000; Park and Ó Foighil, 2000; Wang and Guo, 2008). 대표적인 gene marker로는 핵내 단백질 합성기관인 ribosome의 구성 단위의 하나인 ribosomal RNAs (rRNAs; 18S, 5.8S, 28S), 진핵세포내 염색체를 구성하는 chromatin (DNA와 단백질 복합체)의 구성원의 하나인 histone 3, 18S rDNA와 28S rDNA 사이에 위치하여 전사가 일어나지만 기능을 갖지 않는 영역으로 종간 또는 strain간의 낮은 상동성을 보이는 internal transcribed spacer (ITS)와 세포 호흡에 관여하는 세포질내 소기관의 하나인 미토콘드리아 유전체 구성원의 하나인 cytochrome oxidase I (COI)이 있다. 지금까지 수행된 우리나라 굴의 분자생물학적 분류 연구는 일부 산업으로 가치가 높은 참굴, 강굴과 벗굴 등의 미토콘드리아 16S rDNA, COI과 ITS 서열 분석을 통한 이들의 분류학적 유연관계에 관한 고찰 (김, 1998; 박, 2004)이 있었으나, 가장 많은 종류의 굴이 분포하고 있는 제주지역에 서식하고 있는 굴의 분자생물학적 분류 연구는 이루어져 있지 않다.

굴의 생리학적 연구는 국내외적으로 주요 양식 산업종 (*C. gigas*, *C. virginica*, *C. ariakensis*)에 대한 번식 생리, 유전자 분석 및 외부 자극 (병원체, 환경인자, 화학물질)에 대한 면역력 측정 등에 관한 연구가 주를 이루고 있다. 특히 번식생리에 관한 연구는 조직학적 방법에 의한 번식주기 구명등이 주를 이루고 있으나 이들 굴의 번식주기 및 번식량에 영향을 미치는 환경인자의 영향에 관한 연구는 미미한 실정이다. 수온과 함께 먹이생물은 굴의 성장과 번식을 결정하는 가장 중요한 환경인자로 꼽을 수 있다. 우리나라 남해안과 달리 제주 연안은 기초생산력이 낮고 식물 플랑크톤의 현준량도 다른 해역에 비해 낮은 반면, 이를 먹이로 삼는 다양한 이매패류가 분포하고 있다. Kang et al. (2007)는 제주연안에 서식하는 퇴조개 (Chinese anapella clam)의 연중생식주기 분석 연구를 통하여 상대적으로 수온조건이 좋은 제주 연안의 패류가 수온이 제주보다 더 낮은 서해안이나 남해안의 패류보다 늦게 산란하는 이유를 상대적으로 낮은 기초생산력과 해수중에 분포하는 먹이생물의 biomass에 있음을 지적한 바 있다. 제주연안에 서식하는 굴류의 연중번식주기는 아직 알려지지 않고 있

으나, 본 연구를 통하여 이들의 정확한 산란주기와 이들의 성성숙과 성장에 영향을 미치는 물리화학적 환경요인의 구명될 것으로 예측된다.

2. 국내외 기술개발 현황

가. 국내·외 연구현황 및 기존연구의 문제점

(1) 국내기술동향

굴의 유전적 특성에 관한 연구: 김(1998)은 한국산 참굴 (*Crassostrea gigas*)과 바위굴 (*C. nippona*)의 마이토콘드리아 16S rDNA를 염기서열 분석하여 유전적 차이를 분석한 결과, 한국산 굴과 바위굴의 16S rDNA 간 12개의 염기서열 차이가 있음을 보고하였다. 박 (2004)은 참굴 (*C.gigas*), 바윗굴 (*C. nippona*), 강굴 (*C. ariakensis*)과 벗굴 (*O. denselamellosa*)의 mitochondrial COI과 nuclear ITS 유전자 염기서열 분석결과, COI 유전자의 굴 집단간의 유전적 차이는 관찰되지 않은 반면, ITS 염기서열 분석에서는 종간 뚜렷한 차이가 있다고 보고하였다. 현재 우리나라 연안에는 14종의 굴이 분포하고 있는 것으로 알려져 있으나 (민, 2004; Noseworthy et al., 2007) 이들 4종을 제외한 다른 굴류의 분자생물학적 분류는 전무한 실정이다. 또한 굴의 분자생물학적 분류를 위한 gene marker의 개발도 다른 생물과 비교시 미진한 실정이다.

이매폐류의 면역학적 특성에 관한 연구: 해산 이매폐류의 생체 방어 기작을 이해하기 위한 연구는 일부 연구자들에 의해서만 이루어졌다. 강 등(2000)은 한국산 바지락의 혈구를 수집하여 형태학적 특징 및 식세포 기능을 확인한 결과, 바지락내의 혈구에는 4종류의 세포 (basophil granulocyte, eosinophil granulocyte, fibrocyte, agranulocytes)가 존재하며 basophil granulocyte가 높은 비율로 혈구내 존재함을 확인하였다. 그러나 이러한 연구는 방법론적으로 현미경분석에만 의존하며, 따라서 혈구의 면역학적 기능을 정량적으로 밝힐 데 있어 한계가 있는 것으로 사료된다. 현미경적 분석의 한계는 유세포 분석기 (flow cytometer)를 이용한 면역인자 (예, 식세포작용, 혈구 사망률 및 혈구 DNA 손상도 등)의 정량적 분석으로 그 방법론적인 문제가 개선되고 있다. 최근 들어 본 연구진은 유세포 분석기(flow cytometer)를 이용하여 바지락 (*Ruditapes philippinarum*), 강굴 (*C. ariakensis*), 등근전복 (*Haliotis discus discus*), 소라 (*Turbo cornutus*)의 혈구집단 구조를 분류하고 이들의 면역력을 정량적으로 측정 보고한 바 있다 (박 등, 2006; Donaghy et al., 2009; Donaghy et al., 2010a). 또한, 2007년 기름 유출 사고가 일어난 태안 지역의 참굴 (*C. gigas*)을 대상으로 유류 오염지역과 비 오염지역 참굴의 혈구 면역력을 비교한 결과, 유류 노출 지역의 참굴 혈액 집단내 과립구(granulocyte) 집단, 식세포 작용, 활성 산소 생성 능이 감소됨을 보고한 바 있다 (Donaghy et al., 2010b).

굴의 번식생태학적 특성에 관한 연구: Ngo et al. (2002)는 우리나라 고성만에서 채집된 굴을 대상으로 수온 변화에 따른 생식소 발달 및 성장 등에 관한 연구를 수행하였고, Kang et al. (2000)은 참굴의 체조성 성분 (단백질, 탄수화물, 지질, Ash) 등을 연중 생식주기와 함께 측정함으로써, 연중 번식주기와 체조성 성분이 먹이 및 수온 변화에 따라 변화하는 것을 보고한 바 있다. Kang et al. (2003)은 세계 최초로 참굴 알에 특이적으로 반응하는 다클론 항체를 개발하여 ELISA (효소면역측정법)을 이용, 참굴의 번식량 (reproductive effort, biomass of gamete)을 정량적으로 분석하는 기술을 개발하였으며, Ngo et al. (2006)은 경남 고성만에서 수하 양식된 굴의 연간 수심별 성장, 체조성 성분, 생식주기 및 번식량을 측정한 바 있다. Kang et al. (2004)은 제주도에 서식하는 태생굴의 생식소에 관

한 조직 관찰 및 체내에서의 성숙 단계별 유생의 특징을 분석하여 보고한 바 있다.

(2) 국외기술동향

굴의 유전적 특성 분석에 관한 연구: Klinbunga et al. (2003)은 태국산 양식종 굴 3종 분류를 위해 18S ribosomal DNA와 COI 유전자의 제한효소 절단 단편 양상 분석을 통해 3종에 대한 종 특이적 다양성을 관찰하였다. Varela et al. (2007)은 브라질 연안에 이식된 참굴 (Pacific cupped oyster)의 형태학적 분류의 어려움을 극복하기 위해 분자생물학적 분류방법을 이용 하였으며, 9개 지역에서 채집된 120개의 개체로부터 mitochondrial 16S rDNA를 추출, 분석함으로써 외래종인 참굴 (*C. gigas*)과 지역 종인 *C. rhizophorae*의 분류학적 차이를 구명하였다. Wang and Guo (2008)는 굴류의 분자생물학적 동정을 위한 DNA marker 개발을 위해 굴과 (Family Ostreidae)에 속하는 12종의 굴에 대한 ITS1과 ITS2의 유전자 염기서열 분석하였다. 그 결과, ITS1과 2 사이의 염기서열의 길이는 종간 차이가 있음을 확인 하였으며, 이들 영역의 염기서열 차이로 8종의 굴을 종 차원에서 구별할 수 있음을 보고하였다. 또한, Wang and Guo. (2008)은 중국 북부 해안에 서식하는 굴의 분류학적 위치를 확립하기 위해 양쯔강 북부의 9개 지역으로부터 수집한 6종의 굴에 대한 mitochondrial 16S rDNA, COI과 nuclear 28S rDNA 유전자들의 염기서열을 결정하고 분자계통학적 분석을 통해 중국 북부에 서식하는 굴은 *C. gigas*임을 확인 보고하였다.

굴의 면역학적 특성에 관한 연구: 프랑스와 미국에서는 국내보다 앞서 유세포 분석기를 이용하여 대서양굴 (*C. virginica*)과 참굴 (*C. gigas*)을 대상으로 혈구집단 구조를 분류하고 이들의 세포성 면역 기작인 혈구응집, 혈구 사망률, 혈구 수 변화, 식세포작용, 활성산소발생 등을 분석 보고한 바 있다 (Lambert et al., 2003; Hégaret et al., 2003a and b; Goedken and Guise, 2004). 이와 더불어 환경, 질병, 번식 등의 여러 스트레스에 대한 해산 이매폐류 혈구의 방어 기작 변화를 flow cytometer를 이용하여 monitoring 하였다 (Delaporte et al., 2007; Hégaret et al., 2007; Lambert et al., 2007; da Silva et al., 2008; Hégaret et al., 2009). 이러한 혈구의 특이적 면역능을 이용하여 프랑스에서는 해양환경 감시를 위해 DNA 손상도, 세포 수준의 혈구 손상 및 식세포 능을 측정하여 해양환경 변화를 진단하는 Bio-marker로 이용하고 있다 (Soudant et al. 2004; Flye-Sainte-Marie et al., 2009).

굴의 번식생태학적 특성에 관한 연구: Soniat and Ray (1985)는 먹이 및 수온에 따라 대서양굴 (*C. virginica*)의 번식 특성 및 단백질, 탄수화물 그리고 지질의 함량 또한 변화한다는 연구를 발표하였으며, Chávez-Villalba et al. (2007)은 고수온기와 저수온기의 먹이 부족 등으로 인한 참굴의 대량폐사를 인한 참굴의 대. 프랑스의 경우 Kang et al. (2003) 등이 한-불 국제공동연구의 일환으로 Kang et al. (2003)에 의하여 개발된 참굴 알 항체를 이용하여 프랑스 노르망디 지방에 분포하는 참굴의 번식량과 여름철 참굴 대량폐사특성과의 상관관계를 규명하였고 (Royer et al. 2007), Choi et al. (1993, 1994)은 미국 북부 멕시코만에 분포하는 대서양굴 알에 대한 특이적 항체를 개발, ELISA를 이용하여 이를 대서양굴의 연중 생식주기와 번식량 (reproductive effort)에 미치는 환경인자의 영향을 보고한 바 있다.

(3) 기존연구의 문제점 및 전망

유용 이매폐류의 생태적 번식생태학적 연구는 세계적으로 양식 산업의 자원 관리 및 종 보존 차원뿐 만 아니라 연안의 환경오염 및 수온상승 등의 장기적 모니터링 연구에도 널리 활용되고 있다. 실제 미국의 경우 연안의 해양환경모니

터링 프로그램인 NOAA의 STATUS&TREND (1986-현재) 에서는 멕시코만 및 대서양 연안에 분포하는 굴의 번식유형을 조직학적 방법으로 장기간 관찰하고 있다. 우리나라는 외국과 대조적으로 연안의 환경오염감시 및 생태적 연구에 주로 저서생물의 군집구조변화 분석 등을 적용하고 있는 실정이다. 그러나 군집구조의 변화는 수년간 또는 수십년간에 걸친 생태 변화를 반영하므로 단기적 해양환경 변화를 분석하는데 있어 한계가 있는 것으로 알려지고 있다. 외국의 경우 해양 환경의 단기적 변화 모니터링 연구에서는 군집 차원의 연구보다 개체군의 생리 및 생태를 지표로 이용하는 연구가 주를 이루고 있으며, 이에 따라 저서생물의 번식, 면역 및 질병 등과 같은 기능적 특성을 분석할 수 있는 다양한 분석기법을 개발하고 있는 실정이다. 특히 수온상승으로 인한 외래종의 유입 및 정착과정 등을 연구함에 있어 특정 분류군의 번식생 물학적 연구는 필수적인 것으로 사료된다. 수온상승으로 인한 외래종의 유입은 해양생물의 경우 겨울철 최저 수온이 가장 높은 제주지역에서부터 시작되고 있으나, 이에 대한 본격적인 연구는 아직 수행되지 않고 있다.

3. 연구수행 내용 및 결과

가. 연구수행 방법

I. 제주연안에 서식하는 굴류의 혈구의 형태와 면역학적 특성 분석

1. 굴 시료 채집

제주 연안에 분포하고 있는 아열대 굴들의 혈구 면역학적 특성 분석을 위하여 굴의 분포 지역이 일정하고 분석에 필요한 개체수가 충분한지를 고려하여 가시굴 (*Saccostrea kegaki*), 태생굴 (*Ostrea circumpecta*) 및 중국굴 (*Hyotissa hyotis*)을 조사 대상 종으로 선정하여 (Fig. 1), 이들 세종간의 혈구 세포의 면역학적 특성을 비교하였다. 번식활동이나 산란이 혈구 형태와 기능에 미치는 영향을 최소화하기 위하여 산란 후 미분화기인 겨울철 (2011년 1월, 2012년 1월)에 굴들을 채집하였다. 가시굴은 서귀포 예래동의 암반 조간대에 부착되어 있는 개체들을 채집하였으며, 중국굴과 태생굴은 서귀포 숲섬의 수심 5-15 m에서 스쿠버다이빙을 통해 채집하였다 (Fig. 2). 채집된 굴들은 즉시 실험실로 옮겨와 채집과 운송 도중에 발생할 수 있는 스트레스를 최소화하기 위하여 수온 15-16 °C, 염분 32-33 psu의 해수에 48시간 이상 순치시켰다.

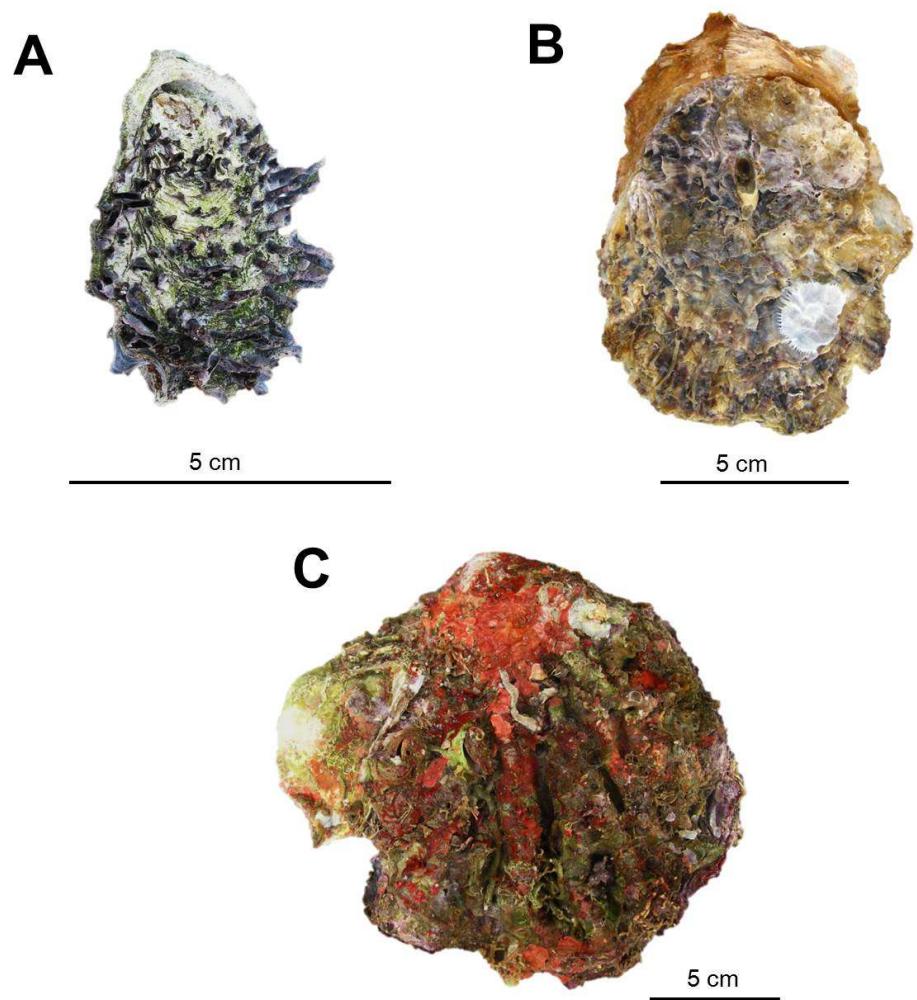


Fig. 1. External view of *Saccostrea kegaki* (A), *Ostrea circum picta* (B), and *Hyotissa hyotis* (C).

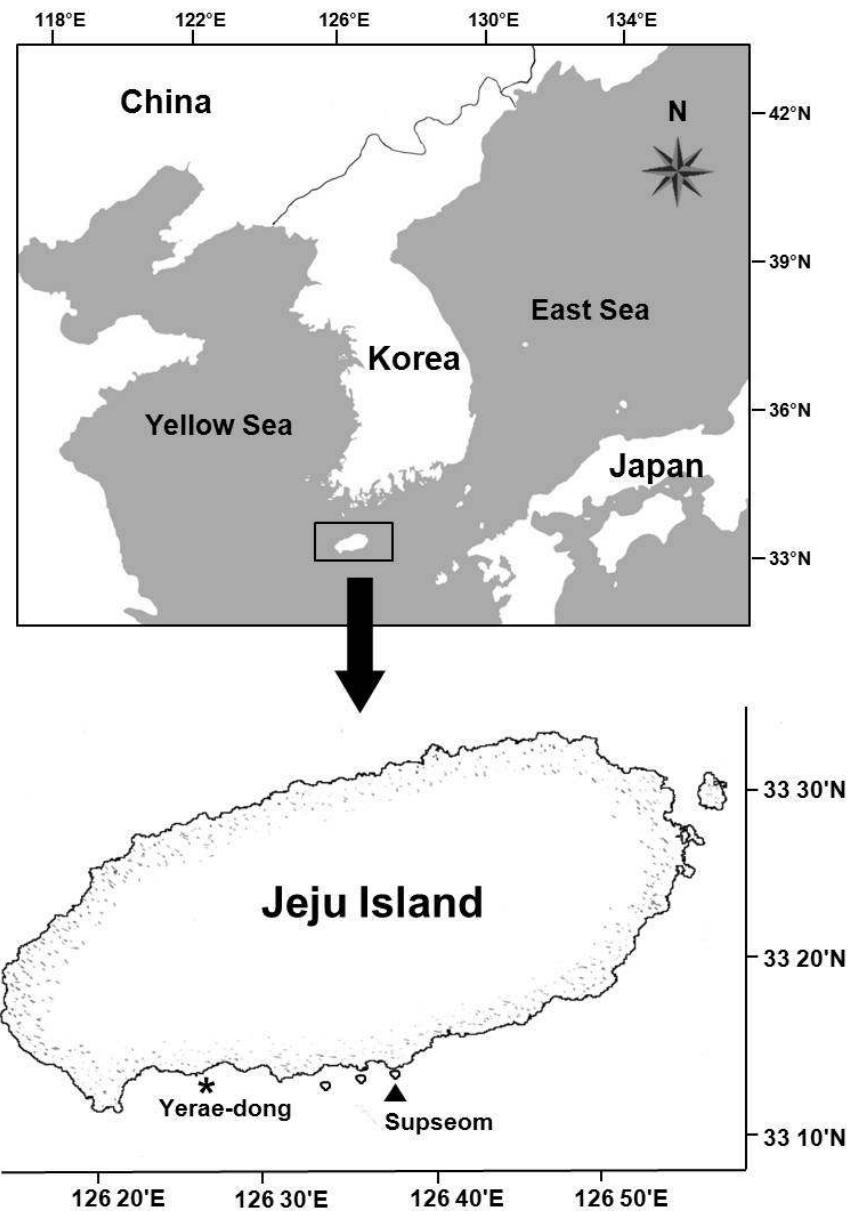


Fig. 2. Location map of the sampling sites. *Saccostrea kegaki* was collected from the inter-tidal area of Yerae-dong (*). *Ostrea circumpicta* and *Hyotissa hyotis* were collected from Supseom (▲) at depth of 5–15 m by SCUBA diving.

2. 혈립프액 채집

굴의 혈립프액을 채집하기 위하여 굴의 폐각 가장자리를 주사바늘이 들어갈 수 있을 정도의 홈을 만들었다. 22Gx1 1/4" 크기의 주사바늘이 장착된 주사기를 이용하여 굴의 폐각근으로부터 혈립프액을 채혈하였다. 혈구세포의 응집을 방지하기 위하여 얼음에 보관된 1.5 ml tube로 즉시 옮겼다. 혈구 특성 분석에 필요한 충분한 양의 혈립프액의 확보를 위하여 3–5개의 굴에서 채집된 혈립프액을 혼합하여 분석에 이용하였다.

3. 광학현미경 (Light microscope)을 이용한 혈구의 형태 관찰

채집된 혈립프액을 poly L-lysine이 코팅된 슬라이드에 얇게 도말하고 습윤 chamber를 이용하여 상온에서 30분 동안 부착시켰다. 혈구가 부착된 슬라이드를 100% methanol에 5분간 고정시킨 후, hemacolor로 5분간 염색하였다. 염색된 슬라이드는 광학현미경 하에서 혈구 세포의 형태에 따른 특징을 관찰하고 이미지분석 프로그램 (imageJ 1.43u)를 이용하여 세포의 위족(pseudopodia), 세포질 (cytoplasm) 및 핵 (nucleus)의 크기 를 측정하였다 (Fig. 3).

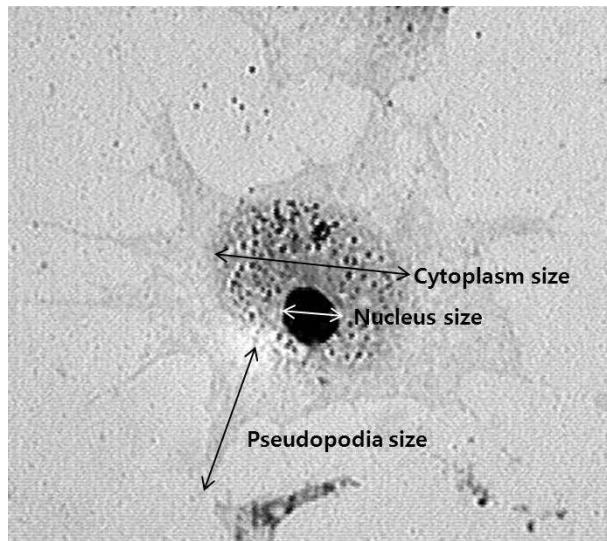


Fig. 3. Measurement of pseudopodia, cytoplasm, and nucleus size in oyster hemocytes.

4. 전자현미경 (Electron microscope)을 이용한 혈구의 형태 관찰

혈립프액을 poly L-lysine이 코팅된 슬라이드에 얇게 도말하고 습윤 chamber를 이용하여 상온에서 1시간 동안 방치하였다. 1시간 후 슬라이드를 2.5% glutaraldehyde 용액에서 1시간 동안 전고정 (pre-fixation)을 실시하였다. 전고정이 끝난 슬라이드는 1X PBS (phosphate buffered saline) 용액에 15분간 3회 수세하고, 에탄올 (50, 70, 90, 95, 100% 2회)을 이용하여 탈수 과정을 실시하였다. 탈수가 끝난 시료는 30, 50, 70, 100%의 isoamyl acetate로 치환하고, freeze dryer를 이용하여 슬라이드를 건조하였다. 건조된 슬라이드는 aluminum stub에 고정하고 sputter coater를 이용하여 gold 입자로 코팅하였다. 코팅된 시료를 장방출주사전자현미경 (Field Emission Scanning electron microscope, JSM-6700F)를 이용하여 혈구세포의 미세구조를 관찰하였다.

5. 유세포 분석기를 이용한 굴 집단의 혈구 집단 구조 및 면역력 측정

5-1. 혈구 집단 구조 분류와 혈구 수 (hemocyte count)

혈립프액을 동일량의 3% 포르말린을 혼합하여 혈구를 고정하였다. 여기에 double strand DNA에 결합하는 형광성 염색시약인 SYBR green I을 첨가 후 상온의 암실에서 1시간 동안 반응시켰다. 유세포 분석기를 이용하여 형광 염색된 세포들 (R1)만을 선택한 후, 세포의 크기와 내부밀도에 따라 혈구 집단 구조를 분류하고

혈구 집단별 세포수를 측정하였다 (Fig. 4).

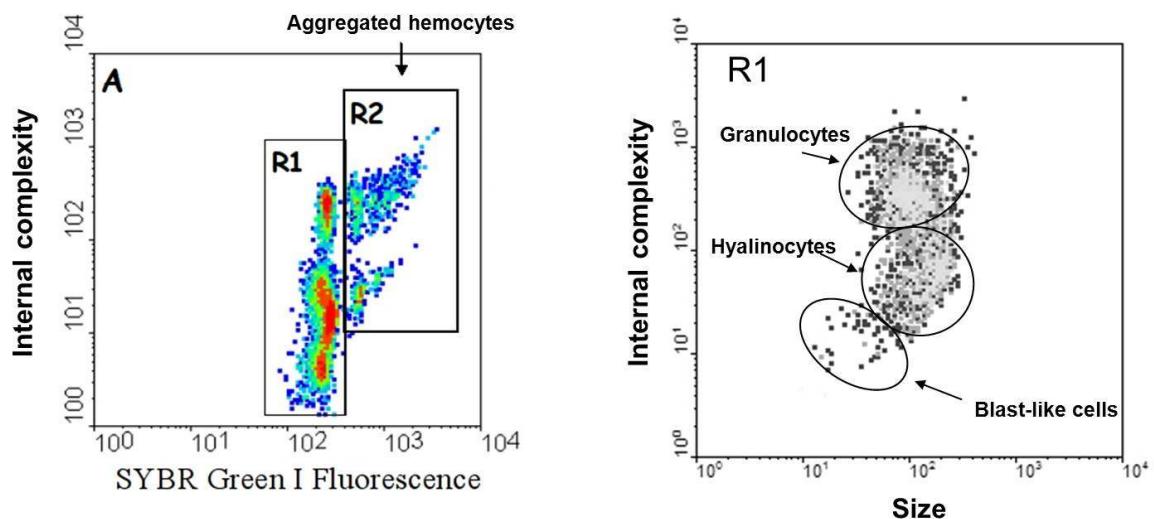


Fig. 4. Classification of hemocyte population of marine bivalves using flow cytometer. R1. hemocytes stained with SYBR green I. R2. aggregated hemocytes.

5-2. 혈구 사망률 (hemocyte mortality)

채집된 혈립프액에 동일량의 항응고제를 첨가한 후, 혈구 사망률을 관찰하기 위해 세포내 apoptosis 관찰에 사용되는 marker의 하나인 형광 색소 propidium iodide (PI)를 혼합하여 암실에서 10분간 반응시켰다. 혈구세포 사망률은 혈구 핵에 분포하는 double strand DNA 또는 RNA에 결합된 PI정도를 유세포 분석기를 이용하여 분석하며, 총 혈구 중 PI에 과하게 염색된 집단 (M1)이 전체 혈구 중 차지하는 비율로 나타내었다 (Fig. 5).

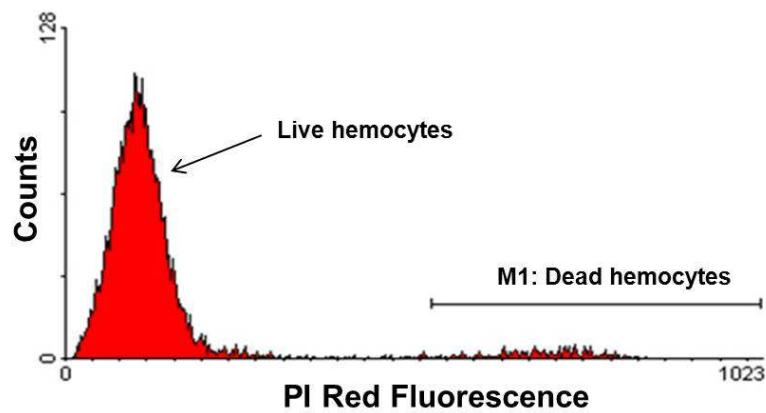


Fig. 5. Measurement of hemocyte mortality using flow cytometer. M1, hemocytes stained with propodium iodide

5-3. 리소좀 정량 (lysosome quantification)

리소좀은 세포질 내에 존재하며 다양한 가수분해 효소를 함유하고 있어 불필요한 물질들을 소화하고 분해하는 기관으로 해양 생물에서 lysosome은 해독작용 (detoxification)과 방어 작용에 중요한 역할을 한다. 이러한 리소좀이 혈구 세포 내에 존재하는지 확인하기 위하여 혈립프액을 동일량의 항응고제와 첨가한 후, lysosome을 염색할 수 있는 형광 색소 LysoTracker Red 와 혼합하여 실온에서 1시간동안 반응시켰다. 유세포 분석기를 이용하여 혈구 세포만을 선택하고 LysoTracker Red의 형광정도를 측정하여 arbitrary unit (A.U.)으로 나타내었다 (Fig. 6).

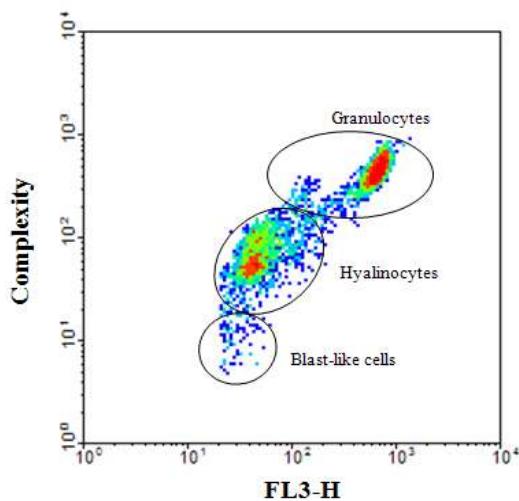


Fig. 6. Measurement of lysosome contents in hemocytes of marine bivalves using flow cytometer.

5-4. 식세포율 (phagocytosis rate) 측정

시료의 혈립프액에 동량의 여과 해수를 혼합하고 형광 bead를 첨가하여 실온에서 식세포 작용을 유도하였다. 반응시작 10, 30, 60, 120, 180분 후, 3개 이상의 bead를 식작용한 혈구 (M1)를 선택하여 전체 혈구 중 차지하는 비율로 나타내었다 (Fig. 7).

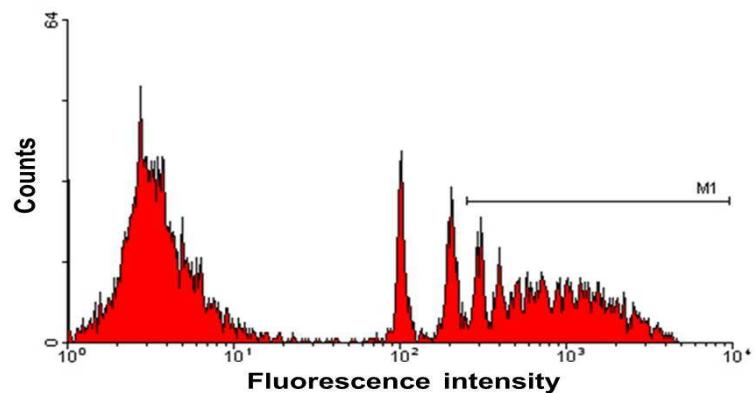


Fig. 7. Measuring hemocyte phagocytosis using flow cytometer. M1, phagocytozed hemocytes with over 3 beads

5-5. 세포산화 능력 (oxidative activity) 측정

혈구 세포내 비 유동성 활성 산소 (reactive oxygen species, ROS)와 활성 질소 (reactive nitrogen species, RNS)의 생산력 (production rate)을 확인하기 위해 채집된 혈립프액에 2'7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)를 첨가하고 실온의 암실에서 반응시켰다. 세포의 활성 산소 발생에 관여를 하는 효소 protein kinase C (PKC)를 자극시키는 phorbol 1,2-myristate 1,3-acetate (PMA)를 첨가한 실험구와 첨가하지 않은 실험구를 나누어 비교하였다. 반응 시작 10, 30, 60, 120, 180분 후, 혈구 세포내 산화 활성 정도는 활성산소에 의해 발생하는 DCFH-DA의 반응산물인 DCF의 형광도를 유세포 분석기를 이용하여 측정하고 이를 arbitrary unit (A.U.)으로 나타내었다 (Fig. 8).

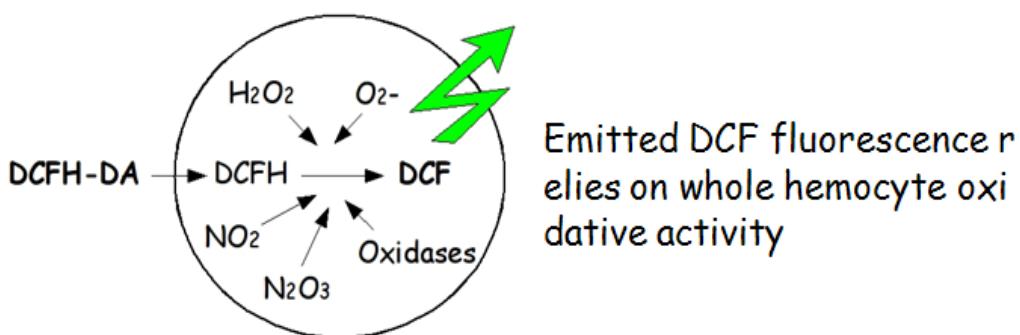


Fig. 8. Schematic illustration of Reactive Oxygen Species (ROS) and Reactive Nitrogen Species (RNS) production measurement using DCFH-DA and a flow cytometer.

II. 제주연안에 서식하는 굴들의 생식주기 규명과 계절별 혈구 면역학적 특성 변화

1. 시료채집

가시굴과 중국굴의 연중 생식주기를 규명하고 혈구 면역학적 특성 변화를 조사하기 위하여 2011년 2월부터 2012년 1월까지 매월 채집하였다. 채집된 굴들은 혈구 분석을 위해 패각근으로부터 혈립프액을 채혈한 후 비만도 (condition index ,CI)를 측정하고 생식주기와 소화맹낭위축도 (digestive gland atrophy) 조사를 위한 조직 슬라이드를 제작하였다. 잔여 조직은 동결건조 후 생화학 조성분 (biochemical composition) 분석에 사용하였다.

2. 비만도 조사

월별로 채집된 굴들의 전반적인 생리적 상태를 파악하기 위하여 비만도를 측정하였다. 가시굴과 중국굴의 비만도 계산법은 다음과 같다.

$$\text{가시굴의 비만도} = \frac{\text{조직 건중량 (g)}}{\text{패각 내 부피 (ml)}} \times 100$$
$$\text{중국굴의 비만도} = \frac{\text{조직 건중량 (g)}}{\text{패각 무게 (g)}} \times 100$$

3. 굴의 생식주기 관찰

조직학적 관찰을 통해서 생식소 발달 단계를 파악하여 간접적으로 산란시기를 파악할 수 있으므로 제주도 연안에서 채집된 굴의 생식소 부분이 포함된 조직을 Fig. 9과 같이 5 mm를 절취하여 Davidson's solution에 48시간 고정시켰다. 고정이 완료된 시료는 각기 다른 농도의 에탄올 탈수과정을 거쳐 파라핀으로 포매하고 포매된 블록은 마이크로톱을 이용하여 6 μm 절편을 제작하였다. 준비된 슬라이드 절편을 hematoxylin과 eosin Y로 비교 염색하고, 광학현미경으로 생식소의 발달 정도를 관찰하였다. 중국굴과 가시굴은 각각 Duprat-Bertazzi and García-Domínguez (2005)와 Kim et al. (2010)에서 분류한 생식소 발달단계를 참조하였다.

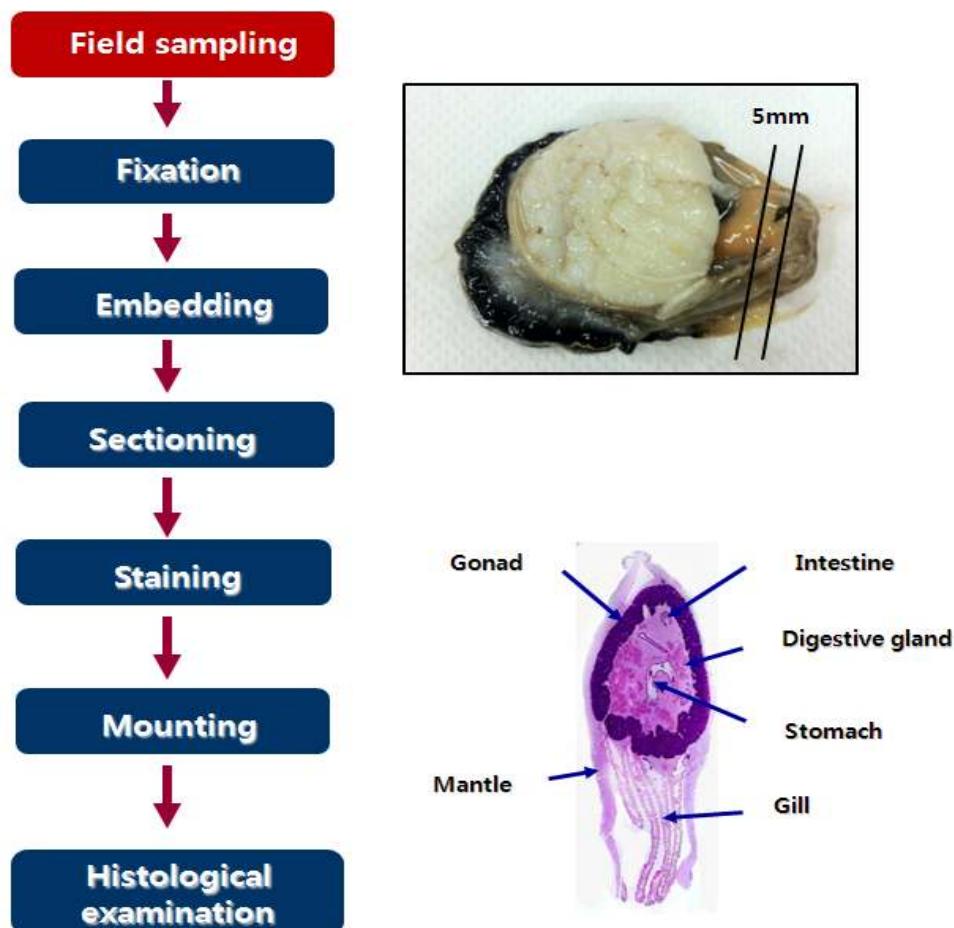


Fig. 9. Procedures involved in histological slide preparation.

4. 소화맹낭위축도 조사

소화맹낭위축도 (digestive tubule atrophy, DTA)는 물리화학적 해양환경 스트레스가 패류의 먹이섭취에 미치는 영향을 파악하는데 이용되는 지수로, 이는 조직학적 시료에 나타난 패류 소화선 (digestive tubule)의 내벽과 외벽의 두께, 소화선 내의 공간 정도를 관찰하고, 0~4 단계 등급으로 구분하여 분석함으로써 이매패류의 영양 상태를 파악할 수 있다. Kang et al. (2010)에서 참굴의 소화맹낭위축도를 측정한 방법을 참조하였다.

5. 체조성분 조사

굴 조직 내 생화학 조성분의 연중 변화를 확인하기 위하여 단백질, 탄수화물, glycogen 및 지질 함량을 측정하였다. 총 단백질 분석은 동결건조된 시료를 2M NaOH로 균질화 후, 원심분리하여 상등액을 취하고 BCA protein assay kit (Pierce, 23227)와 spectrophotometer를 사용하여 562 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 bovine serum albumin을 사용하여 총 조직건중량 (tissue dry weight) 내 총 단백질 함량 (mg/g tissue dry weight)을 구하였다.

총 탄수화물과 글리코겐 분석은 Dubois et al. (1956)의 방법을 사용하였다. 동결건조된 시료에 15% trichloroacetic acid를 첨가하여 4 °C에서 1시간동안 총 탄수화물을 추출하였고, 추출된 총 탄수화물에 에탄올을 첨가하여 글리코겐을 침전시켰다. 총 탄수화물과 글리코겐 시료에 10% phenol과 황산을 첨가 반응 후 492 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 dextrose anhydrous을 사용하였여 조직건중량 내 총 탄수화물 함량 (mg/g tissue dry weight)과 글리코겐 함량 (mg/g tissue dry weight)을 구하였다.

총 지질 분석은 Bligh and Dyer (1959)의 chloroform-methanol 분석법을 사용하여 지질을 추출하였다. 추출된 지질은 미리 무게를 측정한 알루미늄 디쉬에 옮겨 60°C에서 건조 후, 다시 무게를 측정하여 총 지질의 무게를 산정하였다. 총 지질 함량은 조직건중량 내 지질 함량 (mg/g tissue dry weight)으로 표현하였다.

6. 혈구 면역학적 특성 변화 조사

채집된 혈림프액을 이용하여 혈구 집단별 크기와 내부밀도, 혈구 수, 혈구 사망률 및 혈구 식세포율을 월별로 측정하였다. 분석에 필요한 400 μL의 혈림프액의 확보를 위하여 4-6개체의 혈림프액을 혼합하여 분석에 이용하였다.

III. 중국굴 패각근 (adductor muscle)의 식품영양학적 특성 파악

1. 패각근 지수 (Adductor Muscle Index, AMI)

중국굴은 패각을 제외한 전체 조직중 패각근 (adductor muscle)이 차지하는 비중이 Fig. 10과 같이 전 조직의 50% 이상을 차지한다. 이 패각근의 식품으로써의 이용가능성을 확인하기 위해 생식주기 관찰에 사용한 개체를 이용하여 패각근 지수 (AMI)를 다음과 같이 산출하였다.

$$\text{AMI (\%)} = \frac{\text{패각근 건중량 (g)}}{\text{전체 조직 건중량 (g)}} \times 100$$

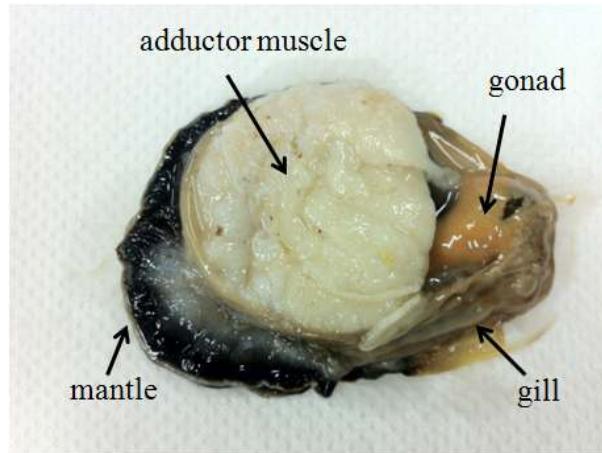


Fig. 10. Photograph of *H. hyotis* soft tissue.

2. 패각근의 일반조성분 분석 (Proximate composition of the adductor muscle)

2-1. 시료 처리

중국굴 시료는 1, 2차년도 (2010년 12월–2012년 1월) 연구기간 동안 채집된 중국굴을 이용하여 분석하였다. 중국굴의 패각근 (adductor muscle, AM)과 전체 조직 (whole tissue, WT) 내 생식주기에 따른 아미노산과 지방산 함유량 변화를 확인하기 위하여 생식주기 관찰 결과를 토대로 산란전, 산란기, 산란후의 개체들을 3개의 그룹인 A(2010년 12월–2011년 8월), B (2011년 9월–10월), C (2011년 11월–2012년 1월)로 분류하여 분석에 사용하였다. 대조구로 현재 우리나라에서 식용으로 이용되고 있는 참굴 (*Crassostrea gigas*)과 강굴 (*C. ariakensis*)을 사용하였다.

2-2. 일반조성분 (Proximate composition) 분석

패각근내 조성분은 탄수화물, 조단백질, 조지방과 조회분을 미국 공인분석화학학회 (Association of Analytical Communities, AOAC)의 방법에 따라, 조단백질은 micro-Kjeldahl법, 조지방은 soxhlet 추출법, 조회분은 550°C 직접회화법을 사용하였다. 탄수화물 성분비는 100-(조단백비+조지방비+조회분비)의 값으로 산정하였다.

2-3. 아미노산 (amino acid) 분석

아미노산 분석은 구성 아미노산과 유리 아미노산을 분석을 실시하였다. 구성 아미노산 분석을 위해, 동결건조된 시료 0.5g에 6.0N HCl을 혼합하여 110°C에서 24시간 동안 반응시켜 가수분해 하였다. 가수분해 된 시료는 회전증발농축기를 이용하여 HCl을 제거한 후, 중류수에 재용해하여 분석에 사용하였다. 유리 아미노산 분석의 경우, 동결건조된 시료 0.5g을 10% 5-sulfosalicylic acid와 혼합하여 4°C에서 한 시간 동안 반응시켜

추출하였다. 추출액은 12,000 × g에서 15분간 원심분리하여 상등액을 취하였고, 0.3M lithium hydroxide를 이용하여 pH2.2로 맞추어 분석에 사용하였다. 전처리가 완료된 시료는 아미노산 전용 분석기 (automatic amino acid analyzer ARACUS, Membrapure, Germany)를 이용하여 구성 아미노산과 유리 아미노산의 함량을 측정하였다. 이때, 표준물질로 amino acid standard solution (100 nmole/ml, Sigma, USA)을 사용하였다.

2-4. 지방산 (fatty acid) 분석

지방산 분석은 Folch et al. (1957)의 방법에 따라 클로로포름과 메탄을 혼합액 (2:1)으로 총 지질을 추출하여 14% BF3-methanol (Sigma, USA) 용액으로 지방산을 methylation 시킨 후, capillary column (SPTM-2560, 100 m × 0.25 mm I.d., film thickness 0.20 μm, USA)이 장착된 gas chromatography (HP-6890 PLUS, Hewlett-Packard, USA)로 지방산을 분석하였다. Carrier gas는 헬륨을 사용하였으며, Oven 온도는 최초 140°C에서 240°C 까지 3°C/min 증가시켰다. 이때 injector 온도는 260°C, detecor (FID) 온도는 260°C로 각각 설정하였으며, 표준 지방산으로 37개 지방산 혼합물 (FAME Mix, C4-C24 Unsaturates, Sigma, USA)을 사용하였다.

IV. 제주연안에 서식하는 굴의 초기 유생 관찰

1. 시료 채집 및 수정

가시굴의 유생 발생 후 관찰을 위하여 산란시기로 관찰되었던 2012년 8월에 제주시 김녕항 (33°33'N, 126°44'E) 암반 조간대에 서식하는 전장이 4-6 cm 크기인 가시굴 20개체를 채집하였다. 암·수 구분을 위하여 개각 후 적출된 굴 조직의 생식소 부분에서 주사바늘을 이용하여 정자 또는 난자를 소량 취하였다. 채취된 생식세포들은 유리 슬라이드에 얇게 도말한 후 광학현미경으로 정자와 난자를 구분하였다. 암·수로 구분된 가시굴은 petri dish에 놓고 생식소 부분을 면도날을 이용하여 1 mm 간격으로 세밀하게 절제하였다. 여과 해수를 절제된 부위에 흘리면서 정자와 난자를 채취하여 5 L 비이커에 따로 모았다. 채취가 완료된 생식세포들은 90 μm Sieve에서 세척한 후 정자와 난자를 섞어 수정을 시작시켰다. 수정된 난이 가라앉지 않도록 폭기 (aeration)하였다.

2. 수정란 발달 관찰

가시굴 수정란의 발달과정을 관찰하기 위해 광학 현미경과 주사전자현미경 (scanning electron microscope)을 이용하여 가시굴 정자와 난자, 각 단계별 수정란의 세포분열, 난할 및 배발생을 관찰하였다. 주사전자현미경으로 가시굴 수정란 발달 특징을 관찰하기 위해 각 단계별 수정란을 채취하여 2% glutaraldehyde에 1시간 동안 전 고정 하였다. 고정이 완료된 수정란은 시료는 50, 70, 90, 95, 100%의 에탄올의 순서대로 탈수 과정을 거쳤으며 30, 50, 70, 100% 농도로 isoamyl acetate의 순으로 치환하였다. 치환된 수정란을 여과지에 옮겨 진공건조 하였고, gold 입자로 코팅하였다. 코팅이 완료된 가시굴 수정란은 장방출 주사전자현미경 (JSM-6700F)을 이용하여 관찰하였다.

V. 굴의 유전학적 유연관계 분석 및 gene marker 개발

1. 굴 시료 채집

제주도를 포함한 우리나라 연안에 분포하는 굴류의 유전학적 유연관계를 조사하기 위해 제주연안에서 서식하는 3종의 굴 가시굴 (*Saccostrea kekaki*), 중국굴 (*Hyotissa hyotis*), 태생굴 (*Ostrea circumpecta*), 우리나라 남해안 지역의 참굴 (*Crassostrea gigas*)과 강굴 (*Crassostrea ariakensis*), 동해안 지역의 바위굴 (*Crassostrea nipponica*)을 채집하였다 (Fig. 11). 우리나라 연안외에 외래종인 베지니아 굴 (*Crassostrea virginica*) 시료를 대조구로 사용하였다. 각 시료의 패각근 (adductor muscle)을 적출하여 액체질소에 즉시 동결하고 DNA 추출 전까지 -70°C 에 보관하였다.

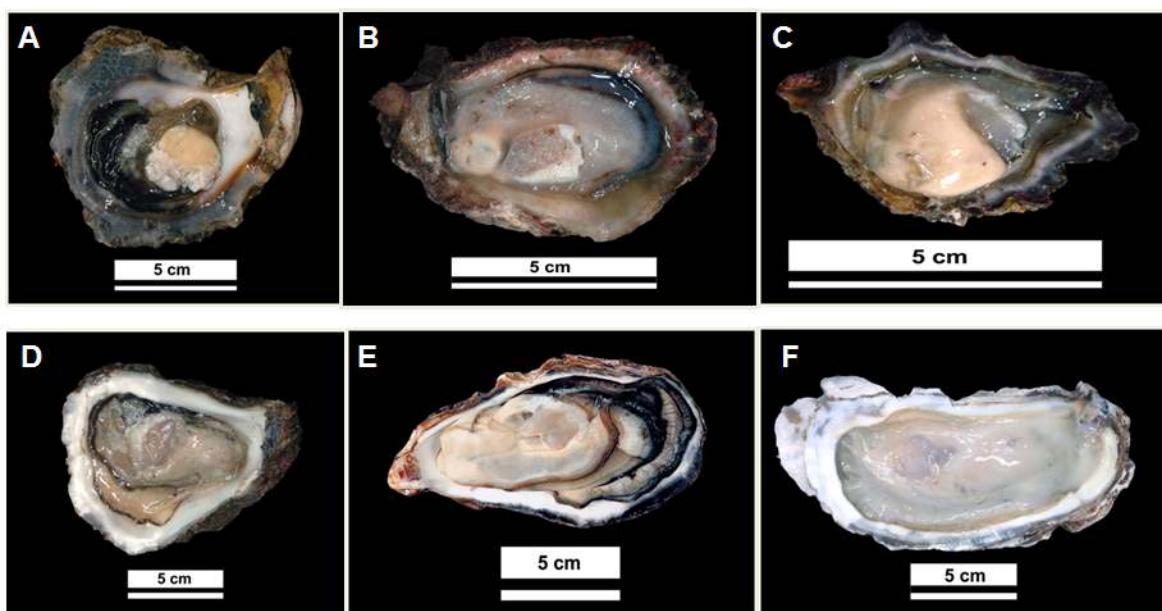


Fig. 11. Internal view of oyster species collected from Korean water. (A) *Hyotissa hyotis*, (B) *Ostrea circumpecta*, (C) *Saccostrea kekaki*, (D) *Crassostrea nipponica*, (E) *Crassostrea gigas*, (F) *Crassostrea ariakensis*.

2. Total DNA 분리 및 PCR 반응

Total DNA는 DNeasy blood and Tissue kit 25 mg의 adductor muscle을 proteinase K와 lysis buffer (Qiagen, Germany)를 혼합하여 56°C , 밤새 반응시켜 분리하였다. 기존에 밝혀진 이매폐류의 SSU rDNA, ITS, histone 3 유전자들을 이용하여 multiple alignment를 수행하고 잘 보존된 영역의 서열을 비교분석하여 nuclear gene을 증폭하기 위한 각 유전자에 대한 primer를 제작하였다 (Table 1). Thermal cycler TP600 (Takara, Japan)을 이용하여 다음의 조건으로 PCR 반응을 실시하였다. Early denaturation 94°C 에서 5분, denaturation 94°C 에서 30초, primer annealing 50 또는 55°C (Table 1의 각 유전자별 온도 참조)에서 30초, extension은 72°C 에서 25초~1분50초를 30회 반복하고, 최종 DNA extention은 72°C 에서 5분간 실시하여 반응을 종결하였다. 증폭된 각 유전자 산물은 ethidium bromide가 첨가된 1.2% agarose gel 전기영동을 실시하여 100bp DNA ladder (Bioneer, Korea)에 비교하여

그 크기를 확인하였다.

Table 1. List of oligonucleotide sequences and thermal cycle parameters used in this study

Primer	Sequence (5'→3')	Anneal temp (°C)
SSU rDNA		
OS SSU-F	GATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTG	55
OS SSU-R	GTACAGTTGCCCTTCTTCCCGG	
ITS		
OS ITS-F	CCGGGAAGAAGGGCAAACTGTAC	50
OS ITS-R	GTTAGTTCTTTCCCTGCCCTTAGT	
Histone 3		
OS H3-F	ATGGCTCGTACMAAGCAGACYGC	55
OS H3-R	ATATCCTTRGGCATRATRGTGAC	
COI		
LCO 1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	48
HCO 2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAACA	
COIF	ATYGGNGGNTTYGGNAAYTG	50
COIR	ATNGCRAANACNGCNCCYAT	

2. 유전자 클로닝 및 염기서열 결정

증폭 산물을 agarose gel 전기영동을 실시하여 각 유전자의 DNA 단편을 절단하고, Accu prep Gel extraction kit (bioneer, Korea)을 이용하여 정제하였다. 정제된 DNA산물을 pGEM-T easy vector (Promega, USA)에 T4 DNA ligase를 이용해 4°C에 밤새 ligation 시켰다. 다음날, ligation된 DNA 산물을 *E. coli* (DH5α) cell에 heat shock 방법을 이용하여 transformation 시켰다. 항생제와 color indicator인 X-gal을 포함하는 선택배지에 transformation 된 cell을 도말하고 37°C에서 밤새 배양한 후 원하는 유전자가 삽입된 clone (alpha complementation)을 선택하였다. 선택된 재조합 clone을 ampicillin이 포함된 LB broth에 밤새 배양하고, 다음날 배양액을 원심분리하여 cell pellet을 수집하였다. 수집된 cell pellet을 bioneer사의 plasmid extraction kit을 이용하여 plasmid DNA를 분리하였다. 분리된 plasmid DNA의 염기서열을 분석하기 위해 (주) 마크로젠에 의뢰하여 BigDye terminator Cycle Sequence kit과 ABI 377 DNA sequencer를 사용하여 염기서열을 결정하였다.

3. 염기서열 결정 및 분자계통학적 분석

염기서열이 결정된 쿨 종별 각 유전자들을 이용하여 GenBank의 BLAST-N 또는 BLAST-P 프로그램을 이용하여 데이터베이스내 등록되어 있는 유전자들과의 상동성을 검색하였다. Clustal W 1.81 프로그램을 이용하여 8종 쿨류의 SSU rDNA, ITS, COI과 H3 유전자의 뉴클레오타이드 또는 단백질 서열을 다중 정렬하였다. 다중 정렬된 염기서열을 MEGA 4.0 프로그램을 이용하여 Neighbor joining 방법을 이용하여, 1,000번의 염기서열 치환수를 계산하여 계통학적 유연관계를 분석하였다 (Tamura et al. 2007).

나. 연구수행 결과

I. 제주연안에 서식하는 굴류의 혈구면역학적 특성

1. 광학현미경을 이용한 굴 혈구의 집단 구조 파악

Hemacolor에 염색된 가시굴 (*S. kegaki*), 중국굴 (*H. hyotis*), 태생굴 (*O. circumpecta*)의 혈구들은 형태적 특징에 따라 granulocytes, vacuolated granulocytes, hyalinocytes 및 blast-like cells의 네 가지 집단으로 분류되었다 (Fig. 12). Granulocytes는 세포질 내에 많은 과립 (granule)들이 있으며 위족 (Pseudopodia)들을 형성하고 있다. Vacuolated granulocytes는 granulocytes의 형태와 비슷하며 세포질 내에 크기가 큰 공포 (vacuole)들이 있는 것이다. Hyalinocytes는 세포질내 소수의 과립 또는 과립의 거의 없으며, 긴 위족을 가지고 있다. Blast-like cells은 세포질이 매우 얇고 크기가 작은 구형으로 소수의 얇은 위족을 형성하고 있다.

각 혈구 세포 집단들의 pseudopodia (위족), 세포질(cytoplasm, C) 및 핵 (nucleus, N)의 크기와 세포질에 대한 핵의 비율 (N/C ratio)을 정리하여 Table 2에 나타내었다. 세 종 굴류의 혈구내 blast-like cells은 모두 위족이 없으며 매우 얇은 세포질 (가시굴 6.33 μm , 태생굴 6.50 μm , 중국굴 7.05 μm)을 갖고 있는 특징을 보였다. 3 종 굴류 혈구의 blast-like cells의 N/C ratio는 평균 0.76–0.78으로 다른 혈구 세포 집단들보다 유의적으로 컸다 ($P<0.05$).

위족, 세포질 및 핵의 크기는 종 (species)과 세포 종류 간에 상이하였다 (Table 2). 가시굴과 태생굴은 hyalinocytes의 위족 크기가 granulocytes보다 큰 반면 ($P<0.05$), 중국굴은 hyalinocytes와 granulocytes 간의 위족 크기의 차이가 없었다. 세포질의 크기는 태생굴과 중국굴은 granulocytes가 hyalinocytes보다 큰 반면 ($P<0.05$), 가시굴은 두 세포 간의 차이가 없었다. 3종 굴류의 혈구 세포 형태의 비교 시에는 가시굴의 granulocytes의 세포질 크기가 태생굴과 중국굴의 granulocytes보다 유의적으로 작았다 ($P<0.05$).

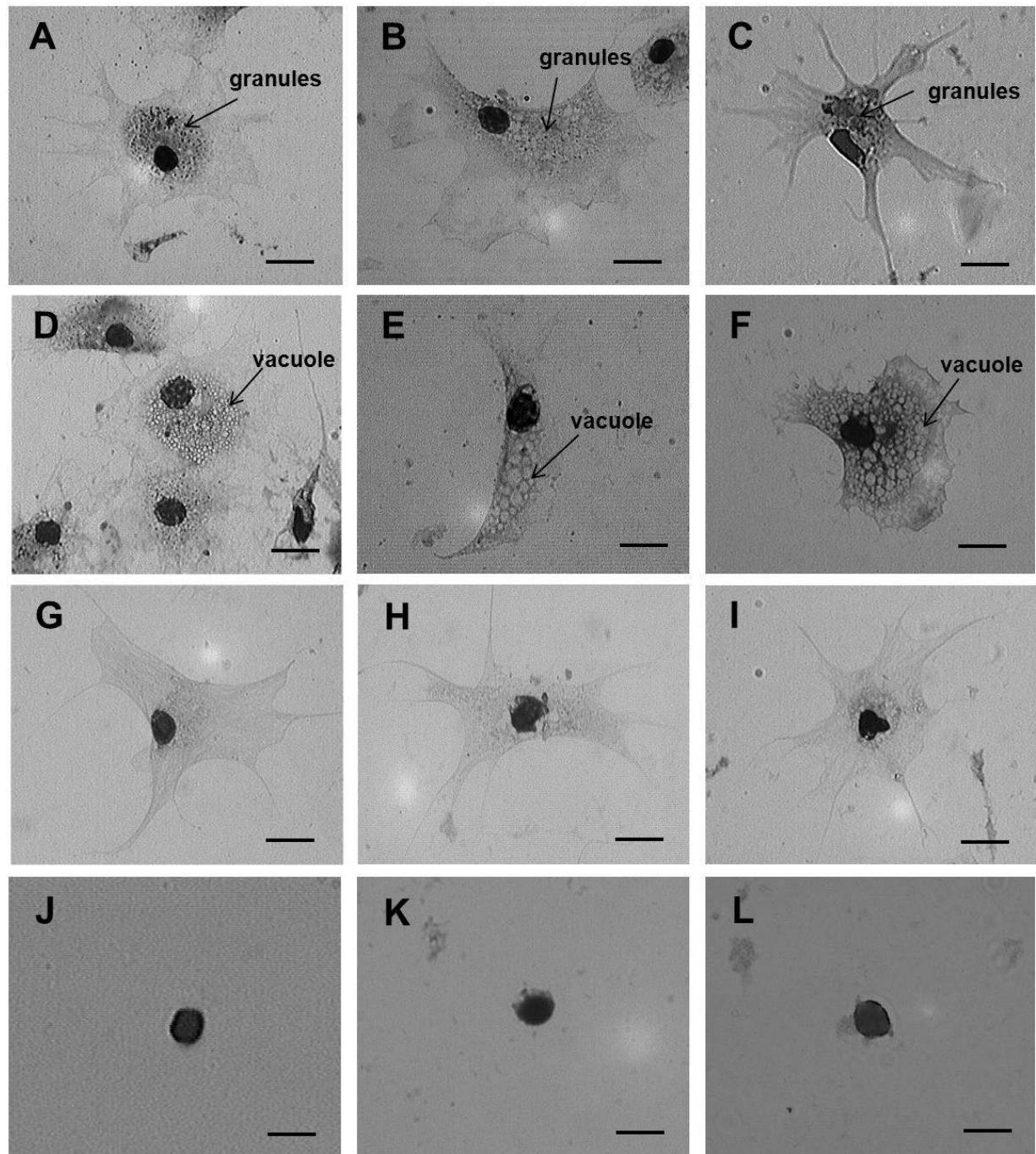


Fig. 12. Light micrographs of hemocytes of *Saccostrea kegaki*, *Ostrea circumpecta*, and *Hyotissa hyotis* stained with Hemacolor. Granulocytes in *S. kegaki* (A), *O. circumpecta* (B), and *H. hyotis* (C). Vacuolated granulocytes in *S. kegaki* (D), *O. circumpecta* (E), and *H. hyotis* (F). Hyalinocytes in *S. kegaki* (G), *O. circumpecta* (H), and *H. hyotis* (I). Blast-like cells in *S. kegaki* (J), *O. circumpecta* (K), and *H. hyotis* (L). Bar = 10 μ m

Table 2 Microscopic characterization of the hemocyte populations of *Saccostrea kegaki*, *Ostrea circumpecta*, and *Hyotissa hyotis* stained with Hemacolor. Values are presented as mean \pm standard error. n=number of analyzed cells. Different letters (a-f) in rows indicate significant (ANOVA, $P<0.05$) differences among hemocyte populations.

<i>S. kegaki</i>				<i>O. circumpecta</i>				<i>H. hyotis</i>				
	Granulocytes n=30	Vacuolated n=10	Hyalinocytes n=30	Blast-like n=20	Granulocytes n=30	Vacuolated n=10	Hyalinocytes n=30	Blast-like n=20	Granulocytes n=30	Vacuolated n=10	Hyalinocytes n=30	Blast-like n=20
Pseudopodia size (μm)	9.16 ^c \pm 0.43	8.09 ^e \pm 0.33	17.58 ^{bc} \pm 0.76	-	12.21 ^d \pm 0.41	4.43 ^f \pm 0.55	16.43 ^c \pm 0.57	-	19.42 ^{ab} \pm 1.08	4.89 ^f \pm 0.34	20.15 ^a \pm 0.83	-
Cytoplasm size (C; μm)	14.79 ^c \pm 0.52	16.95 ^{abc} \pm 0.72	16.81 ^{abc} \pm 0.56	6.33 ^d \pm 0.25	18.83 ^a \pm 0.55	16.75 ^{abc} \pm 0.41	15.20 ^c \pm 0.73	6.50 ^d \pm 0.16	17.85 ^a \pm 0.71	17.61 ^{ab} \pm 0.45	15.53 ^{bc} \pm 0.74	7.05 ^d \pm 0.20
Nucleus size (N; μm)	5.29 ^{abc} \pm 0.12	5.70 ^{ab} \pm 0.25	5.45 ^{abc} \pm 0.21	4.82 ^e \pm 0.17	5.20 ^{abc} \pm 0.28	5.17 ^{abc} \pm 0.15	5.46 ^{abc} \pm 0.14	5.08 ^{bc} \pm 0.18	5.84 ^a \pm 0.21	4.88 ^c \pm 0.27	5.29 ^{abc} \pm 0.25	5.32 ^{abc} \pm 0.16
N/C ratio	0.37 ^{bc} \pm 0.02	0.34 ^{bc} \pm 0.01	0.34 ^{bc} \pm 0.02	0.77 ^a \pm 0.01	0.28 ^c \pm 0.01	0.31 ^{bc} \pm 0.01	0.40 ^b \pm 0.03	0.78 ^a \pm 0.02	0.33 ^{bc} \pm 0.01	0.28 ^c \pm 0.02	0.40 ^{bc} \pm 0.07	0.76 ^a \pm 0.02

2. 주사전자현미경을 이용한 굴 혈구의 집단 구조 파악

주사전자현미경을 이용한 3종 굴류의 혈구 세포 구조의 형태학적 특징 관찰시, 세포의 표면적 특징만 관찰할 수 있었다. 광학현미경 관찰시 혈구 세포질내 과립이 분포하는 granulocytes와 과립이 없는 hyalinocytes를 전자현미경 관찰에서는 구분할 수 없었다. 혈구의 외형적 특징에 따라, 세 종 굴류의 혈구 세포는 크기가 크고 많은 위족들을 보유하고 있는 세포들과 크기가 10 μm 이하로 작은 구형 세포의 두 집단으로 나뉘어졌다 (Fig. 13). 크기가 작은 구형의 세포는 대부분이 핵으로 구성되어 있는 점으로 보아 광학현미경에서 분류된 blast-like cells인 것으로 사료된다.

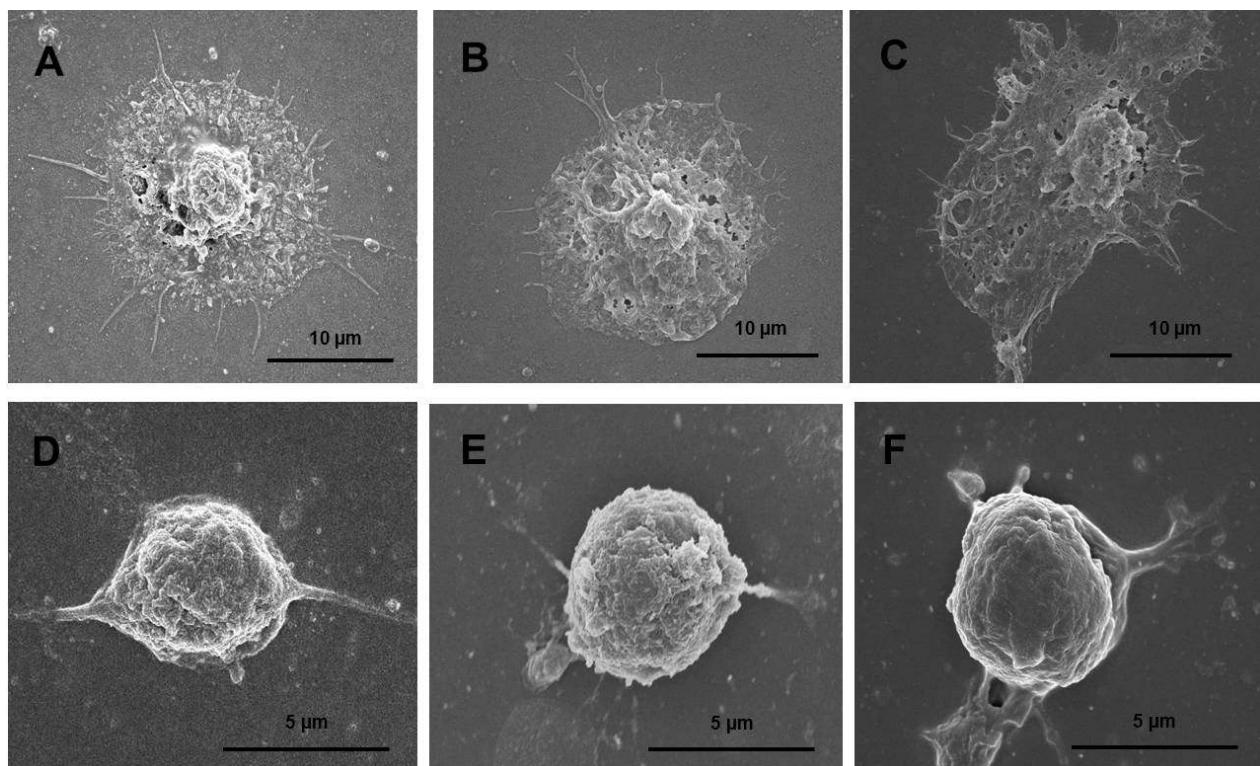
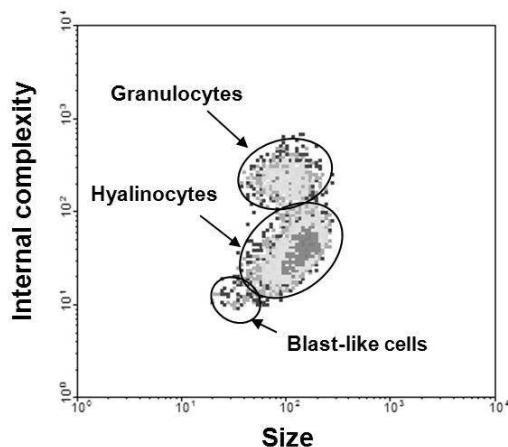


Fig. 13. Scanning electron micrographs of hemocytes of *Saccostrea kegaki*, *Hyotissa hyotis*, and *Ostrea circumpecta*. Large hemocytes in *S. kegaki* (A), *O. circumpecta* (B), and *H. hyotis* (C). Small hemocytes in *S. kegaki* (D), *O. circumpecta* (E), and *H. hyotis* (F).

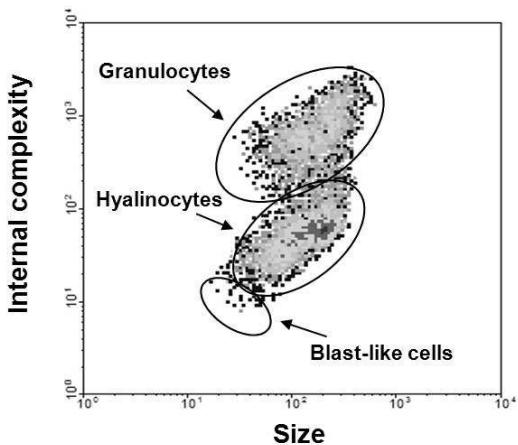
3. 유세포분석기를 이용한 굴 혈구의 집단 구조 파악

유세포 분석기를 이용하여 혈구 세포의 상대적인 크기와 내부밀도에 따라 분류한 결과, 세 종 굴류의 혈구집단은 모두 granulocytes, hyalinocytes 및 blast-like cells의 세 가지 집단으로 분류되었다 (Fig. 14). 혈립프액 내 총 혈구 수는 가시굴과 중국굴이 각각 491,861 cells/mL와 685,592 cells/mL으로 중국굴의 264,299 cells/mL보다 유의적으로 많았다 ($P<0.05$).

Saccostrea kegaki



Ostrea circum picta



Hyotissa hyotis

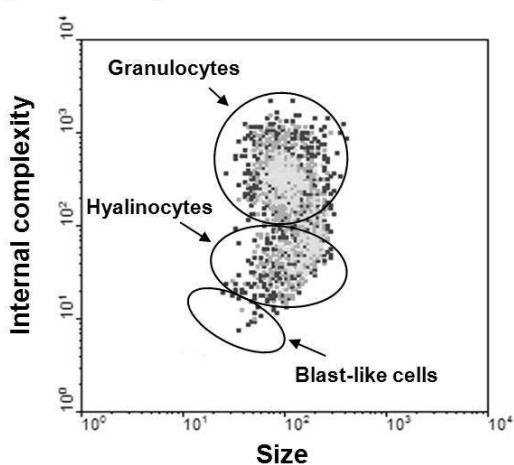


Fig. 14. Flow cytometric determination of the hemocyte population of *Saccostrea kegaki*, *Ostrea circum picta*, and *Hyotissa hyotis*. Hemocytes were identically classified into three populations; granulocytes, hyalinocytes, and blast-like cells.

유세포분석기에서 측정된 혈구 집단 별 구성비율, 크기 및 내부밀도는 Table 3와 같다. 세 종 굴류의 혈구 집단에서의 구성 비율은 hyalinocytes가 총 혈구 중 59%이상 (가시굴 61.7%, 태상굴 65.9%, 중국굴 59.0%)으로 가장 많은 비중을 차지하였다. 두 번째로 많은 혈구 세포는 hyalinocytes로 가시굴이 29.2%, 태생굴이 23.1%, 중국굴이 30.5%의 비율을 보였다. 크기와 내부밀도가 가장 작은 blast-like cells은 5% 미만 (가시굴 2.7%, 태생굴 3.0%, 중국굴 4.5%)으로 가장 적은 분포 비율을 보였다. 혈구 집단내 혈구 세포별 크기는 태생굴과 중국굴이 granulocytes의 크기가 각각 154.4 A.U.와 140.4 A.U.로 가장 큰 반면 ($P<0.05$), 가시굴은 granulocytes (113.2 A.U.)와 hyalinocytes (123.6 A.U.)의 크기 사이에는 차이가 없었다. 혈구 세포의 내부밀도는 세 종 모두 granulocytes가 hyalinocytes와 blast-like cells 보다 높았으며

($P<0.05$), 이는 granulocytes 세포질 내 수많은 과립들 때문이다. 세 종간의 granulocytes의 내부밀도는 태생굴 (720.4 A.U.)이 가장 컸으며 가시굴 (224.7 A.U.)이 가장 작았다 ($P<0.05$).

Table 3 Flow cytometric characterization of the hemocyte populations of *Saccostrea kegaki*, *Ostrea circumpecta*, and *Hyotissa hyotis*. The percentage, size, and internal complexity of each hemocyte population from oysters were determined on SYBR green I positive cells fixed with 3% formalin. Size and internal complexity are expressed in flow cytometric arbitrary units (A.U.). Values are presented as mean \pm standard error. n=number of analyzed cells. Different letters (a-d) in rows indicate significant (ANOVA, $P<0.05$) differences among hemocyte populations.

	<i>S. kegaki</i>			<i>O. circumpecta</i>			<i>H. hyotis</i>		
	Granulocytes n=15	Hyalinocytes n=15	Blast-like n=15	Granulocytes n=15	Hyalinocytes n=15	Blast-like n=15	Granulocytes n=15	Hyalinocytes n=15	Blast-like n=15
Percentage	29.2	61.7	2.7	23.1	65.9	3.0	30.5	59.0	4.5
Size (A.U.)	113.2 ^c \pm 3.3	123.6 ^{bc} \pm 1.9	37.2 ^e \pm 0.5	154.4 ^a \pm 10.7	118.4 ^c \pm 5.6	27.6 ^e \pm 3.2	140.4 ^{ab} \pm 7.5	119.0 ^c \pm 4.9	55.9 ^d \pm 5.3
Complexity (A.U.)	224.7 ^c \pm 5.6	38.4 ^d \pm 0.8	13.4 ^d \pm 0.1	720.4 ^a \pm 40.8	48.1 ^d \pm 4.5	12.1 ^d \pm 1.2	528.4 ^b \pm 29.6	58.7 ^d \pm 3.6	19.8 ^d \pm 1.0

Granulocytes와 hyalinocytes의 리소좀 함량은 Fig. 15와 같다. 세 종 모두 혈구 세포 내 리소좀 함량은 granulocytes가 hyalinocytes 보다 많았다 ($P<0.05$). Granulocytes내 리소좀 함량은 태생굴 (405.4 A.U.), 중국굴 (323.3 A.U.), 가시굴 (103.9 A.U.)의 순으로 세 종간의 모두 유의적인 차이를 보였다 ($P<0.05$). Hyalinocytes에서도 리소좀의 존재를 확인하였으며, 중국굴과 태생굴의 리소좀 함량이 각각 61.2 A.U.와 57.4 A.U.로 가시굴 (26.3 A.U.)보다 유의적으로 높았다 ($P<0.05$).

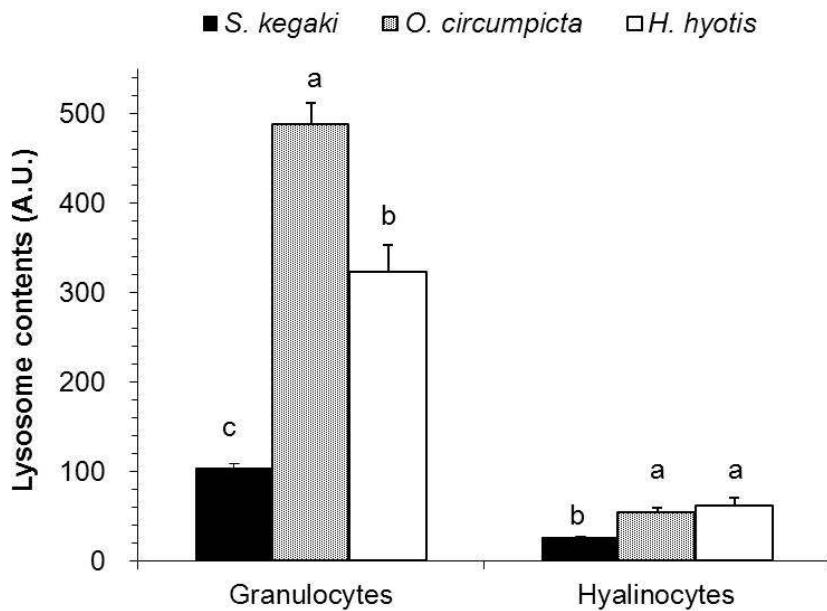
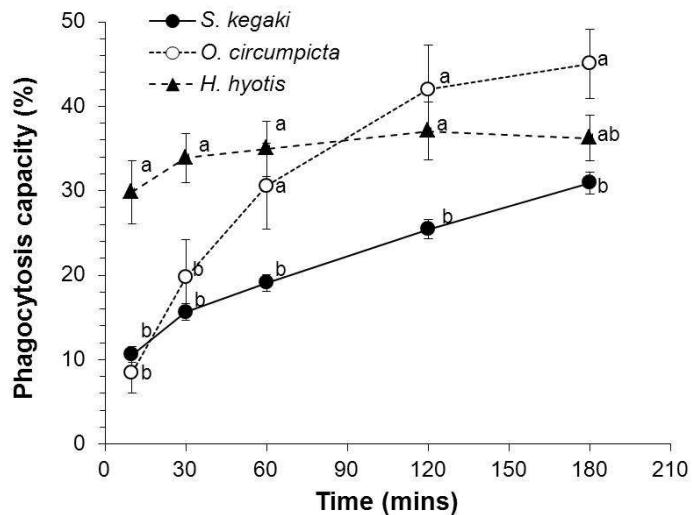


Fig. 15. Lysosome contents of *Saccostrea kegaki*, *Ostrea circumpicta*, and *Hyotissa hyotis*. Values are presented as mean \pm standard error. For each species, $n=10$. Different letters (a-c) in columns represent significant (ANOVA, $P<0.05$) difference among three species.

4. 혈구 식세포율

혈구의 식세포 작용은 세 종 모두 혈구 세포내 granulocytes가 주로 작용하는 것으로 확인되었으며, hyalinocytes는 10% 미만의 낮은 식세포율을 보였다. 이와 달리, blast-like cells은 식세포 능력이 없는 것으로 확인되었다. Granulocytes의 반응 시간별 식세포률의 변화는 종간 차이를 보였다 (Fig. 16). 중국굴의 granulocytes는 형광 bead와 반응한지 10분만에 평균 29.85%의 높은 식세포율을 보인 후 큰 증가 없이 180 분에 36.24%의 식세포율에 이르렀다. 가시굴의 granulocytes는 bead 반응 10분 후 10.57%의 식세포율을 보인 후 꾸준히 증가하여 180분에는 30.92%에 이르렀다. 태생굴은 반응 10분 후 8.43%의 식세포율을 보인 후 가시굴보다 빠르게 증가하여 180분에는 45.03%로 중국굴과 가시굴보다 높은 식세포률을 보였다. 반면, hyalinocytes의 식세포율은 가시굴이 1.06–3.12%, 중국굴이 4.82–5.44%, 태생굴이 2.29–9.27% 범위의 낮은 식세포율을 보였다 (Fig. 16).

Granulocytes



Hyalinocytes

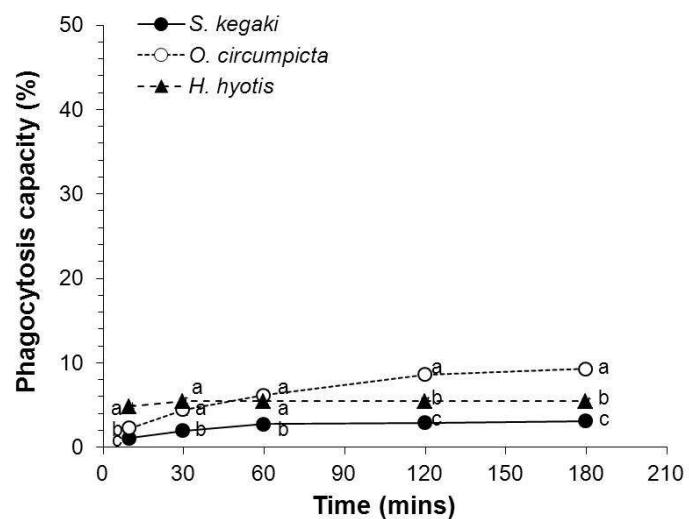


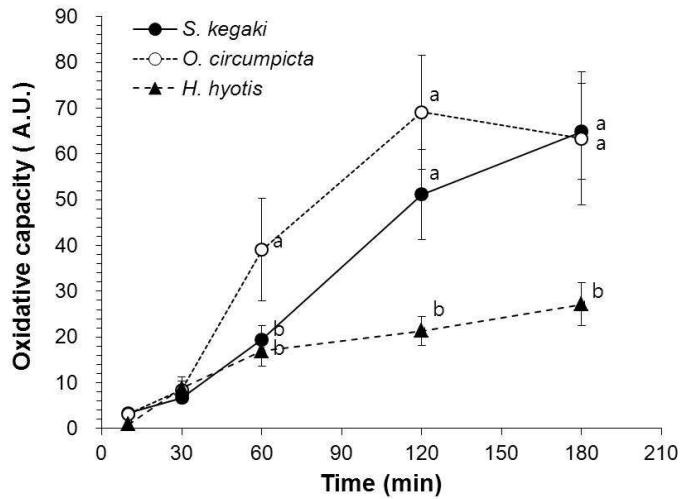
Fig. 16. Phagocytosis capacity of the granulocytes and hyalinocytes of *Saccostrea kegaki*, *Ostrea circumpicta*, and *Hyotissa hyotis*. Values are presented as mean \pm standard error. For each time and each species, n=15. Different letters (a–c) in columns represent significant (ANOVA, $P<0.05$) difference among three species.

5. 혈구 세포 산화력

유세포 분석기를 이용하여 가시굴, 중국굴, 태생굴의 혈구 세포 내에서 활성산소와 활성질소의 발생을 확인하였다. Blast-like cells도 세포 산화력을 확인하였지만 granulocytes와 hyalinocytes에 비해 그 발생량이 상

당히 낮아 시간별 세포 산화력 측정에서 배제하였다. Granulocytes가 세 종 모두 hyalinocytes보다 1.5–2배 정도 많은 세포산화력을 보였다 (Fig. 17). Granulocytes와 hyalinocytes의 활성산소와 활성질소의 발생량은 가시굴과 태생굴의 경우 60분 이후에 급격히 증가하는 반면, 중국굴은 180분까지 서서히 증가하였으며 그 발생량도 가시굴과 태생굴보다 2배 이상 낮았다 (Fig. 17). 이러한 결과는 세 종간의 면역 시스템의 차이가 있음을 시사하며, 세포 산화활동의 경로들에 대한 구체적인 연구가 필요할 것이다.

Granulocytes



Hyalinocytes

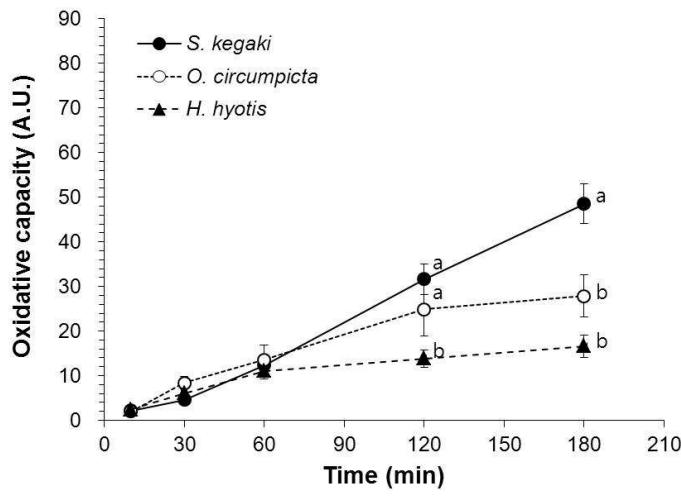


Fig. 17. Oxidative capacity of the granulocytes and hyalinocytes of *Saccostrea kegaki*, *Ostrea circumpicta*, and *Hyotissa hyotis*. Values are presented as mean \pm standard error. For each time and each species, n=15. Different letters (a, b) in columns represent significant (ANOVA, $P<0.05$) difference among the three species.

가시굴, 태생굴, 중국굴의 혈구는 형태적, 면역학적 특징에 따라 granulocytes, hyalinocytes, blast-like cells의 세 종류로 동일하게 분류되었다. 세 종 모두 혈구 세포 중 granulocytes와 hyalinocytes가 세포성 면역 작용을 하는 것으로 확인되었으며, 그 중에서도 granulocytes가 가장 주된 면역 세포인 것으로 확인되었다. 세포성 면역활동인 식작용과 세포산화 능력에 있어서 중간의 특이성이 확인되었으나, 이들의 면역 시스템 경로에 대한 보다 구체적인 연구가 요구된다. 이번 연구에서 제주 연안에 서식하는 아열대성 굴인 가시굴, 태생굴, 중국굴의 혈구 집단 구조 파악 및 면역력 측정은 최초의 연구결과이다. 이 연구결과는 제주 연안에 서식하는 아열대성 굴들의 병원성 생물 및 다양한 스트레스에 대한 면역 반응 연구 및 굴 양식에 있어 중요한 자료로 이용될 것으로 사료된다.

II. 제주연안에 서식하는 굴류의 생식주기 규명과 계절별 혈구 면역학적 특성 변화

1. 가시굴 (*S. kegaki*)

1) 채집 지역의 수온과 염분

2011년 서귀포 연안의 표층 수온과 염분은 국립해양조사원의 자료를 인용하여 Fig. 18과 같이 나타내었다. 연구기간 동안 채집 지역의 수온은 14.8–22.9°C의 범위를 보였으며, 3월에 최저 수온을 기록한 후 증가하여 9월에 최고 수온으로 조사되었다. 염분은 24.7–31.2 psu의 범위로 여름 장마철인 6월부터 감소하기 시작하여 8월에 최저값을 기록한 후 다시 증가하였다.

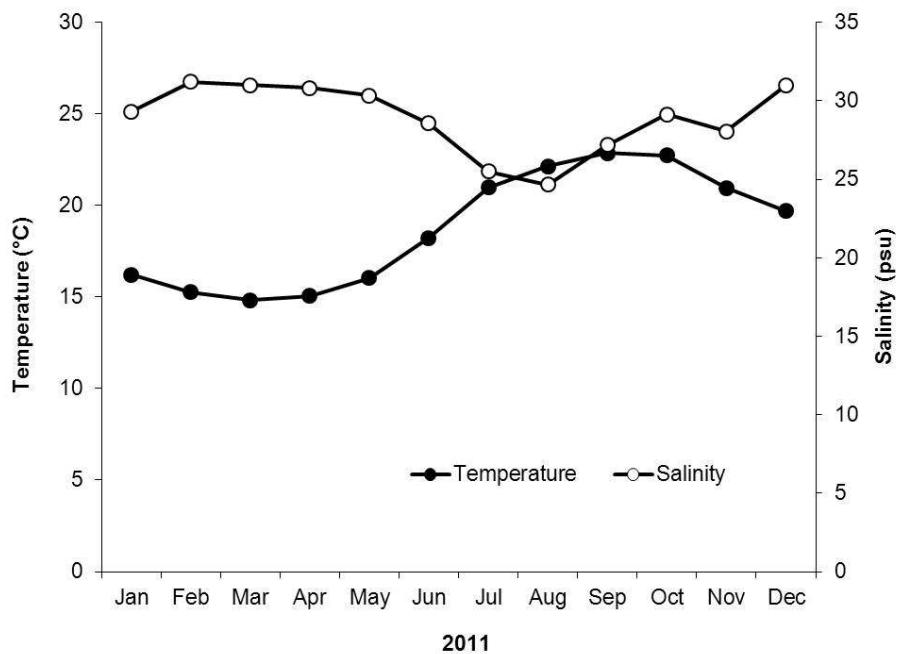


Fig. 18. Seasonal changes in the surface water temperature and salinity at the sampling site during the experiment periods.

2) 생체량과 비만도

가시굴은 매달 30개체씩 선별하여 분석에 사용하였으며, 분석에 사용된 가시굴의 각장 (shell length)는 48.7–54.0 mm, 조직 건중량 (tissue dry weight)는 0.224–0.387 g 이었다 (Table 4). 가시굴 비만도 (condition index)의 연중 변화는 Fig. 19와 같으며, 2월 (6.86)부터 증가하여 7월에 최고값 (13.97)를 기록하였다. 7월 이후 8월에는 비만도가 6.33로 절반 가량 급격히 감소한 후 1월까지 낮은값을 유지하였다. 비만도가 급감한 8월은 조직슬라이드에서 관찰된 가시굴의 산란시기와 일치하였다.

Table 4 Shell length and tissue dry weight of *Saccostrea kegaki* collected in this study. N, number of sample. Values are presented as mean \pm standard error.

Month	N	Shell length (mm)	Tissue dry weight (g)
Feb 2011	30	49.7 \pm 1.1	0.271 \pm 0.014
Mar 2011	30	45.7 \pm 0.8	0.253 \pm 0.014
Apr 2011	30	50.1 \pm 0.9	0.304 \pm 0.020
May 2011	30	54.0 \pm 1.3	0.387 \pm 0.014
Jun 2011	30	48.9 \pm 0.8	0.382 \pm 0.023
Jul 2011	30	54.0 \pm 1.0	0.330 \pm 0.015
Aug 2011	30	52.0 \pm 1.1	0.235 \pm 0.013
Sep 2011	30	50.4 \pm 1.0	0.224 \pm 0.012
Oct 2011	30	52.1 \pm 1.7	0.262 \pm 0.013
Nov 2011	30	53.0 \pm 1.0	0.240 \pm 0.011
Dec 2011	30	53.8 \pm 1.0	0.246 \pm 0.013
Jan 2012	30	50.6 \pm 0.9	0.257 \pm 0.015

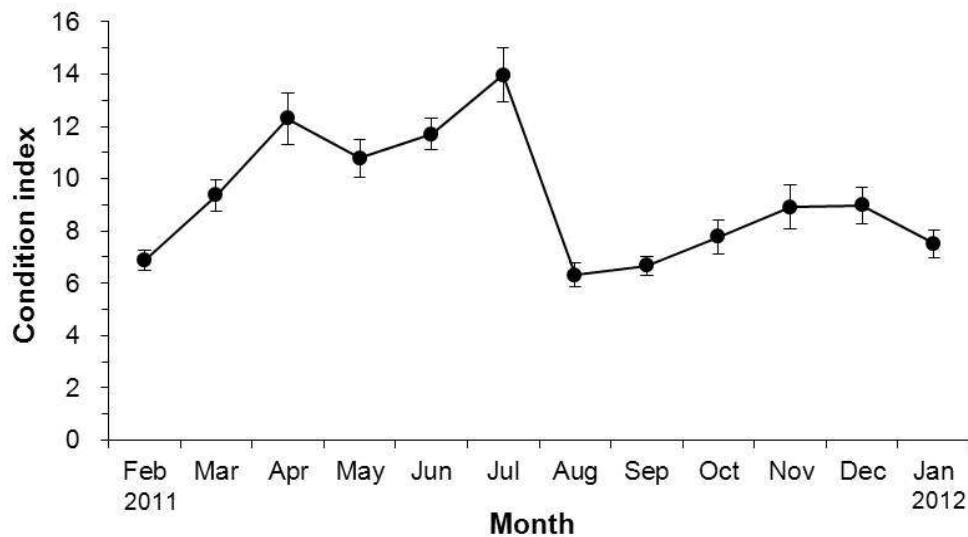


Fig. 19. Monthly changes in condition index of *Saccostrea kegaki*. Values are presented as mean with standard error.

3) 생식주기

가시굴 암컷과 수컷의 생식소 발달단계는 Fig. 20과 Fig. 21과 같이 미분화기 (indifferent stage), 초기발달기 (early development stage), 후기발달기 (late development stage), 완숙기 (ripe stage), 산란기 (spawning stage) 및 산란후기 (spent stage)의 5단계로 구분되었다. 미분화기에는 생식소 조직 내에 생식세포들이 관찰되지 않아 암,수의 구분이 불가능하였다 (Fig. 20A). 초기발달기는 여포 (follicle) 내에 암컷은 작은 난원세포 (oogonia)와 초기난황세포 (early vitellogenic oocytes)가 수컷은 정원세포 (spermatogonia)들이 관찰되었다 (Fig. 20B, Fig. 21A). 후기발달기는 여포가 확장되어 외투막 (mantle)과 소화맹낭 (digestive gland) 사이에 넓게 자리잡고 있었다. 암컷은 크기가 커진 난황세포 (vitellogenic oocyte)들이 여포벽 (follicle wall)을 따라 발달하였으며 (Fig. 20C), 수컷은 정모세포 (spermatocyte)들이 여포벽을 따라 발달하고 정충 (spermatozoa)들이 여포의 중심으로 이동하는 모습이 관찰되었다 (Fig. 21B). 완숙기에는 암컷은 여포가 완숙한 난 (mature oocyte)들로 채워져 있었으며 (Fig. 20D), 수컷은 정충들이 방사상의 모양으로 여포를 채우고 있었다 (Fig. 21C). 산란기는 여포벽의 두께가 얇아지면서 난과 정충들이 방란, 방정의 활동으로 인한 일부 빈 공간들이 관찰되었다 (Fig. 20E, Fig. 21D). 산란후기에는 대부분의 생식세포들이 산란이 되어 수축된 여포에 일부 잔여 생식세포들만이 관찰되었다 (Fig. 20F, Fig. 21E).

위와 같은 생식소 발달단계에 따라 분류된 가시굴의 연중 생식주기를 정리하여 Fig. 22에 나타내었다. 암컷 가시굴은 4월에 생식소 발달을 시작하여 6월부터 8월까지 완숙기를 거친 후, 8월부터 10월까지 산란활동이 일어나고 있다. 수컷 가시술은 암컷보다 2개월 빠른 2월부터 생식소 발달을 시작하여 6월부터 8월까지 완숙한 후 8월부터 1월까지 산란하였다. Kim et al. (2010)은 2001년도에 이 연구와 동일한 지역에 서식하는 가시굴의 생식주기를 조사하였으며, 표충 수온이 22.7°C인 7월에 산란이 일어남을 보고하였다. 그러나, 이 연구가 수행된 2011년도 가시굴 서식지역의 해수 표충 수온이 21°C를 기록한 7월에는 가시굴의 산란이 관찰되지 않았으며, 수온이 22.1°C인 8월에 산란을 시작하였다. 따라서, 가시굴의 산란은 표충 수온이 약 22°C 이상일 때 산란활동이 시작됨을 의미한다.

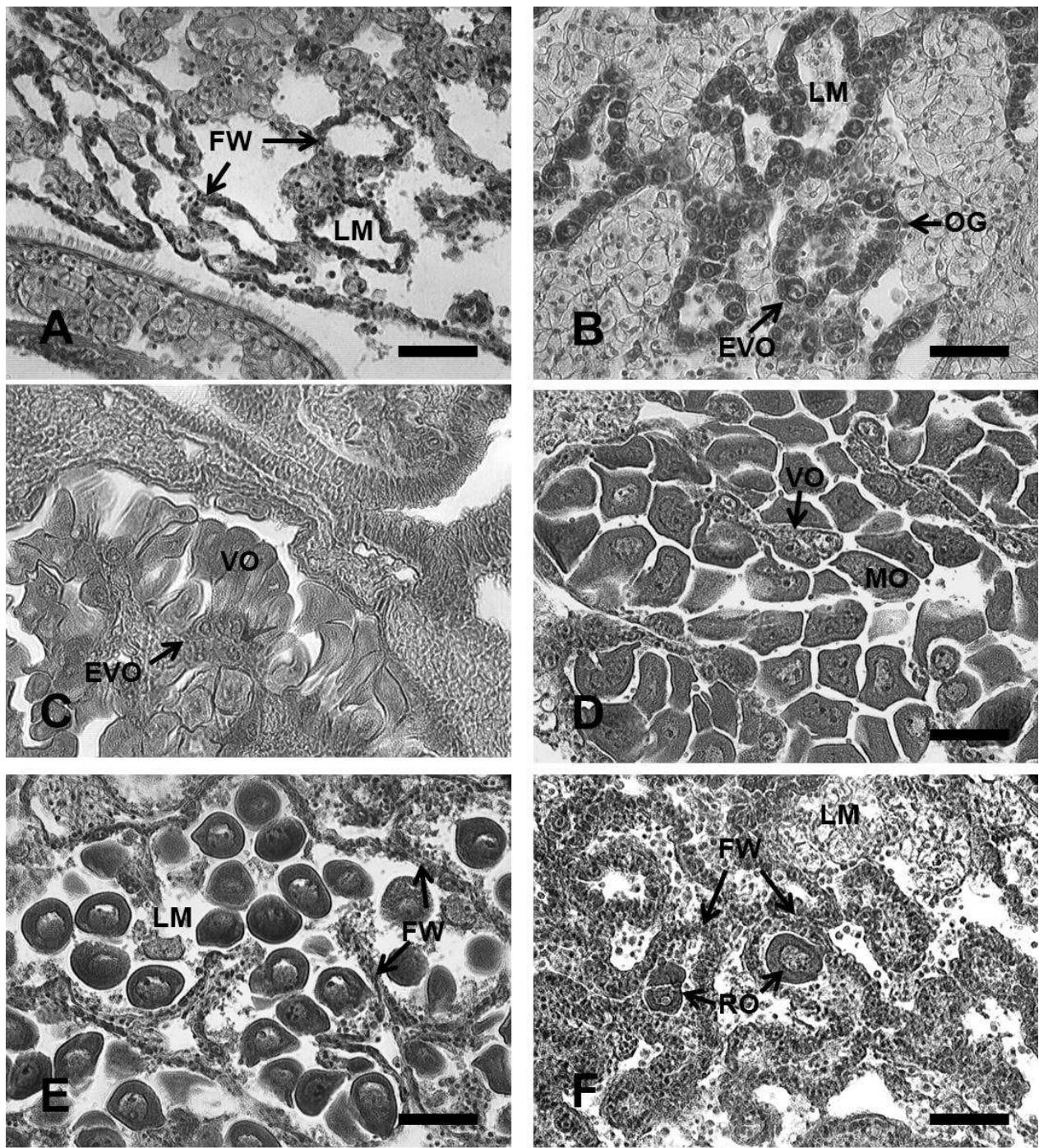


Fig. 20. Photomicrographs of ovaries of *Saccostrea kegaki*. (A) Indifferent stage: gonad with vacated lumen (LM) and thin follicle wall (FW). (B) Early developing stage: ovary containing small oogonia (OG) and early vitellogenic oocytes (EVO) occur along the follicle wall. (C) Late developing stage: growing ovary with early vitellogenic oocytes (EVO) and vitellogenic oocytes (VO). (D) Ripe stage: mature ovaries packed with ova and a thin layer along follicle wall. In germinal epithelium, very small primary oocytes are present. (E) Partially spawning stage: partly spawned ovaries with loosely packed ova and vacated space. (F) Spent stage: ovaries largely devoid of ova and growing ovary with vitellogenic oocytes and relict ova (RO). Scale bar: 50 μ m.

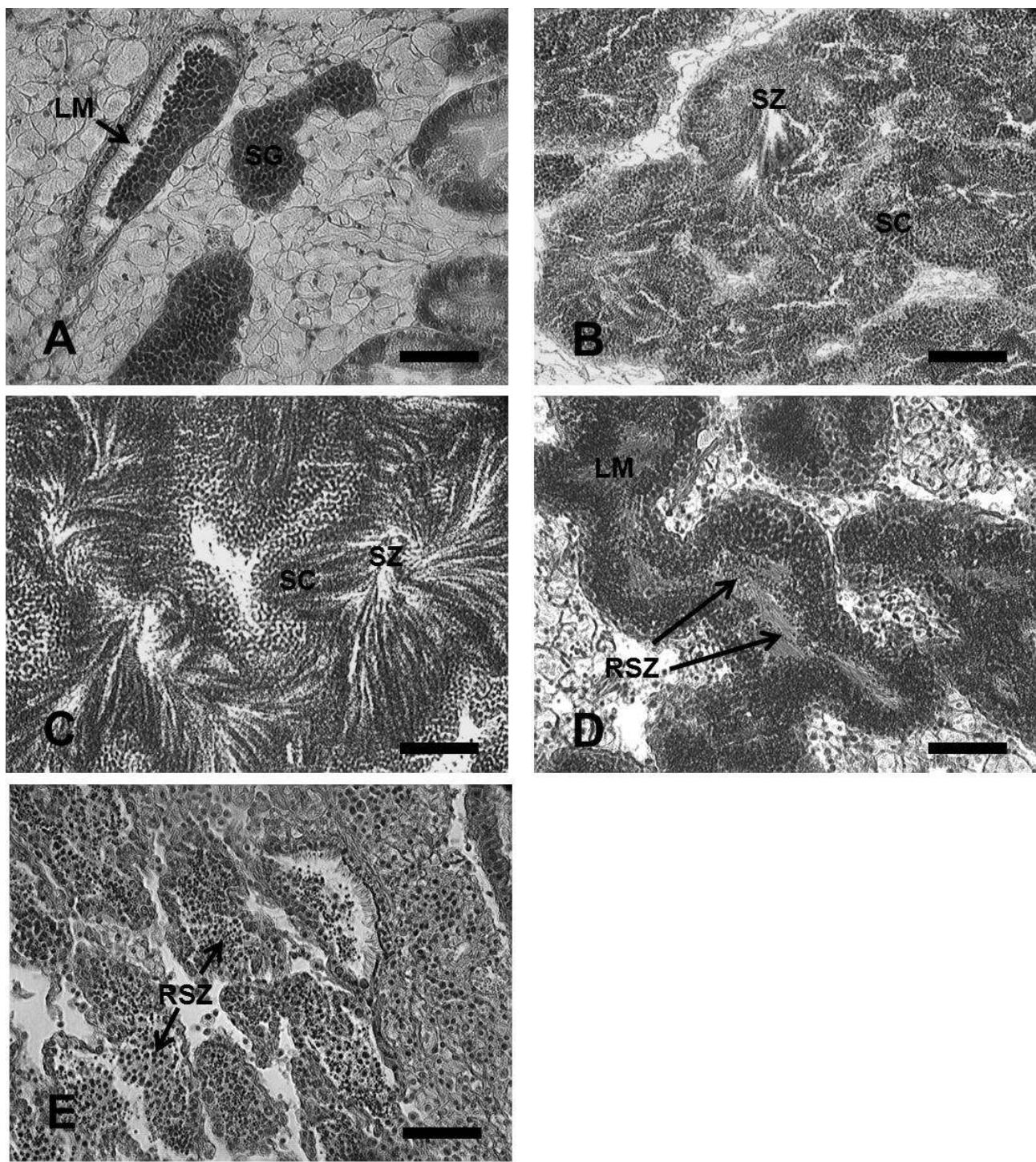


Fig. 21. Photomicrographs of testis of *Saccostrea kegaki*. (A) Early developing stage of testis exhibiting spermatogonia (SG). (B) Late developing stage: columns of SC and spermatozoa (SZ) move to the central part of growing testes. (C) Ripe stage: mature testes filled with SZ. (D) Spawning stage: partly spawned testes with vacated space. (E) Spent stage: partly devoid follicles with relict spermatozoa (RSZ). Scale bar: 50 μ m. LM: lumen, FW: follicle wall

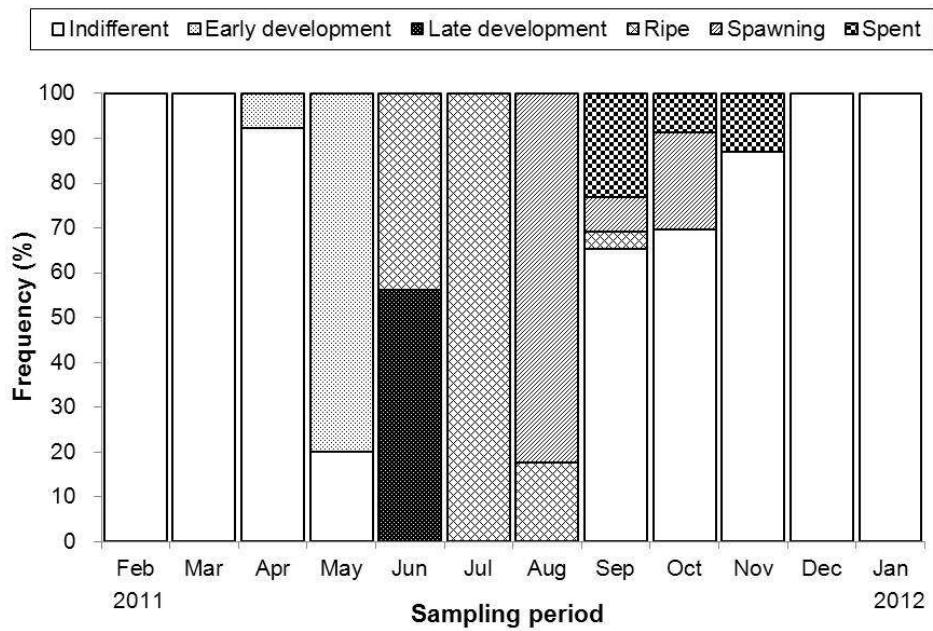
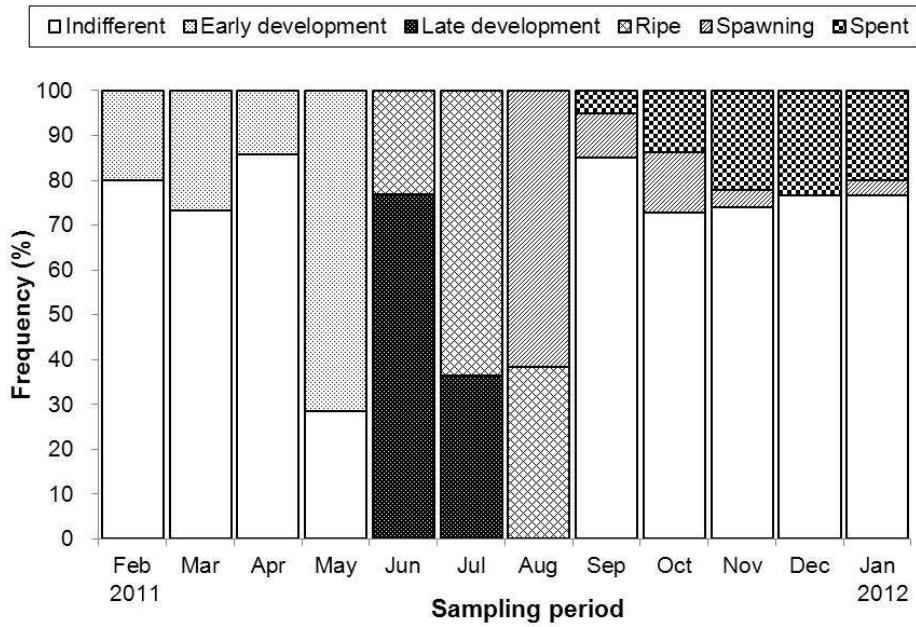
A**B**

Fig. 22. Percentage of reproductive stages of *Saccostrea kegaki*. A, female; B, male.

4) 소화맹낭위축도

가시굴의 소화맹낭위축도는 소화선 (digestive tubule)의 내벽과 외벽의 두께, 소화선 내의 공간 정도에 따라 0~4 단계 등급으로 구분하였으며, 등급이 높을수록 체내 영양상태가 좋지 않음을 의미한다 (Fig. 23). 소화맹낭위축도 지수에 따라 구분한 가시술의 연중 소화맹낭위축도는 Fig. 24과 같으며, 해양환경관리공단에서 측

정한 서귀포 연안 표층의 chlorophyll a 농도 결과와 비교하였다. 표층 해수에 chlorophyll a의 농도가 적은 2 월부터 5월까지는 소화맹낭위축도 지수가 평균 2~3으로 높았다가 chlorophyll a가 급격히 증가하는 6월부터 7월까지 소화맹낭위축도 지수가 평균 1로 낮아지는 경향을 보였다. 이는 소화맹낭위축도가 먹이량에 따른 가시굴의 영양상태를 잘 나타내고 있음을 알 수 있었다. 또한, 산란이 시작되는 8월에 소화맹낭위축도 지수가 급격히 증가하는 것은, 산란 스트레스로 인한 영양상태가 저하되어 있음을 시사한다. 이러한 결과는 Kang et al. (2010) 가막만 참굴 (*C. gigas*)의 소화맹낭위축도가 산란시기에 높은 결과와 일치한다. 그러므로 소화맹낭위축도는 가시굴의 영양상태를 평가하는데 좋은 영양 지표 지수임이 확인되었다.

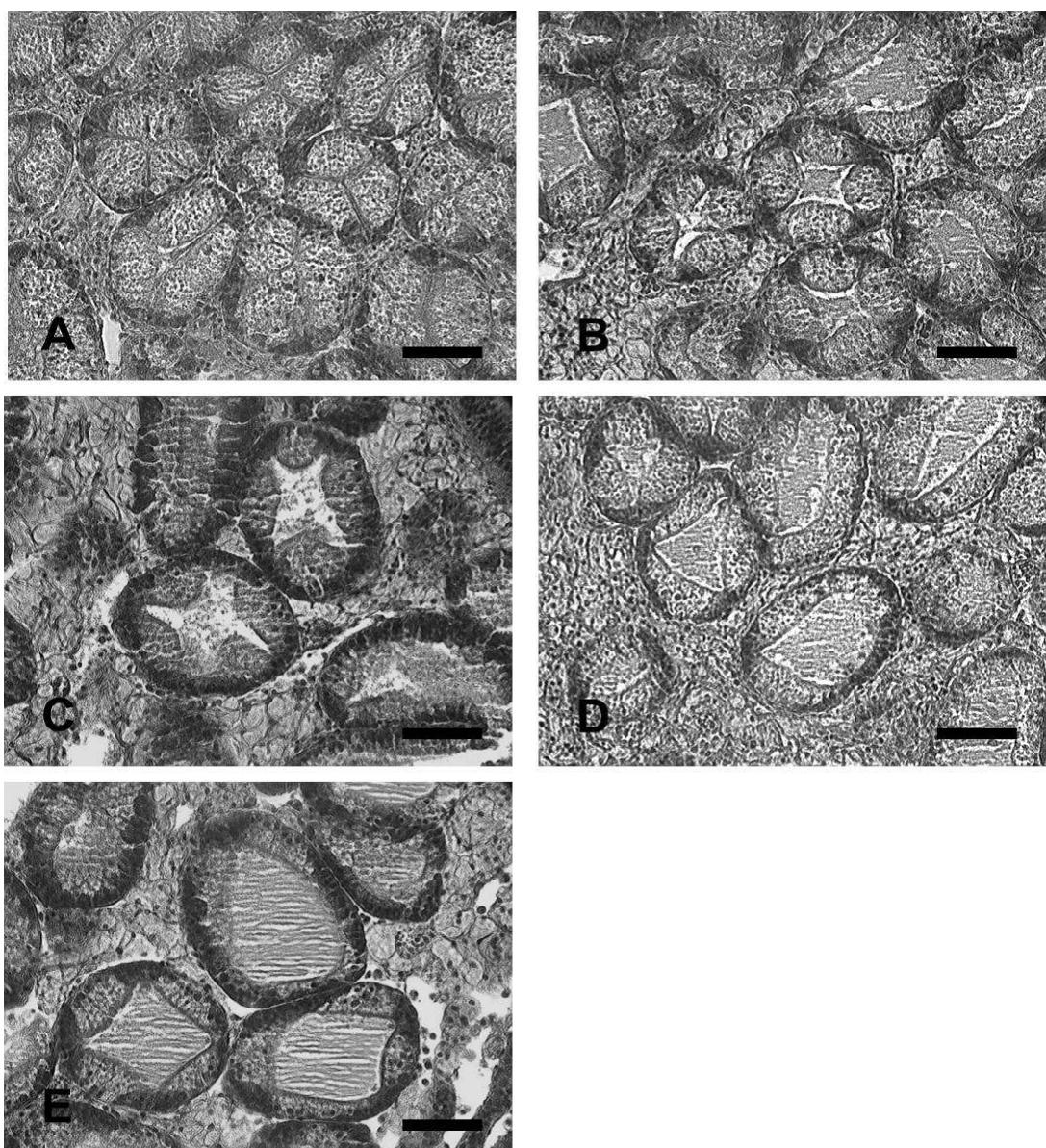


Fig. 23. Photomicrograph of digestive gland atrophy conditions of *Saccostrea kegaki*. A, absorptive stage I (Score 0); B, holding stage (Score 1); C, absorptive stage II (Score 2); D, disintegrative stage (Score 3); E, reconstituting stage (Score 4). Scale bar: 50 μm .

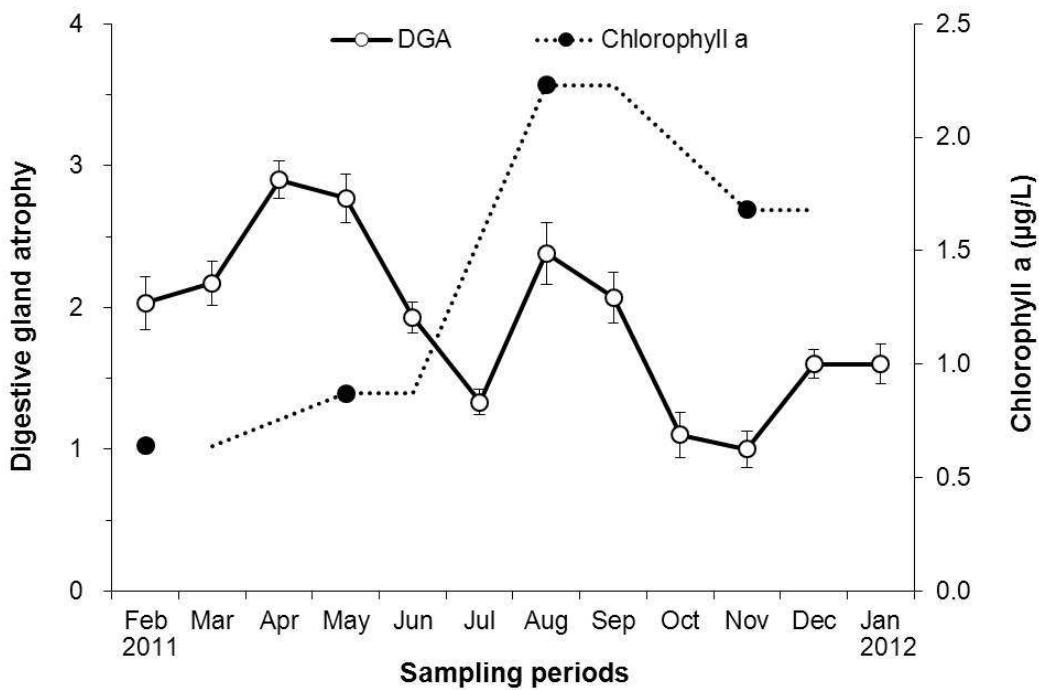


Fig. 24. Monthly changes in digestive gland atrophy (DGA, mean \pm standard error) of *Saccostrea kegaki* and chlorophyll a concentration.

5) 체조성분 변화

가시굴 체조직 내 연중 단백질 함량은 284.3–384.03 mg/g dry tissue weight 범위로 생식세포들이 발달하거나 완숙한 여름철 (6–9월)에 상대적으로 높은 값을 보였다 (Fig. 25). 해산 이매파류의 경우 알의 40–50% 정도가 단백질로 구성되어 있는 것으로 보고되었다 (Choi 1993; Kang et al. 2003; Park and Choi 2004; Ngo et al. 2006). 이 연구에서도 가시굴의 단백질 함량 변화는 생식세포 발달과 산란 활동에 밀접한 연관성이 있는 것으로 확인되었다. 가시굴의 탄수화물과 glycogen 함량은 봄철인 3월부터 5월까지 서서히 증가하다, 6월부터 60% 이상 급격히 감소하였다. 해산이매파류의 성 성숙과 산란은 에너지의 소모가 큰 시기로, 섭이한 먹이 또는 에너지로 저장된 물질을 이들 활동에 이용한다 (Ruiz et al. 1992). 따라서, 가시굴의 알 또는 정자의 완숙이 이루어지는 성 성숙기인 6월부터 탄수화물과 glycogen 함량이 급격히 감소하기 시작하여, 대부분의 개체가 산란 활동이 일어나는 8월에 가장 낮은 수치를 보였다. 따라서, 탄수화물과 glycogen이 가시굴의 생식세포 발달과 산란 활동에 주 에너지원으로 사용됨을 확인할 수 있다.

가시굴의 생식세포가 발달하기 시작하는 5월부터 지질 함량이 급증하여 산란기 이전인 7월까지 다른 시기보다 높은 함량을 유지하였다 (그림 25). 지질 함량이 급증한 6월에는 glycogen 함량이 급감하였다. 이러한 결과는 해산이매파류가 생식세포를 형성할 때 glycogen을 지질로 변환한다는 기존의 연구결과와 일치하였다 (Gabbott 1976, Kang et al. 2000).

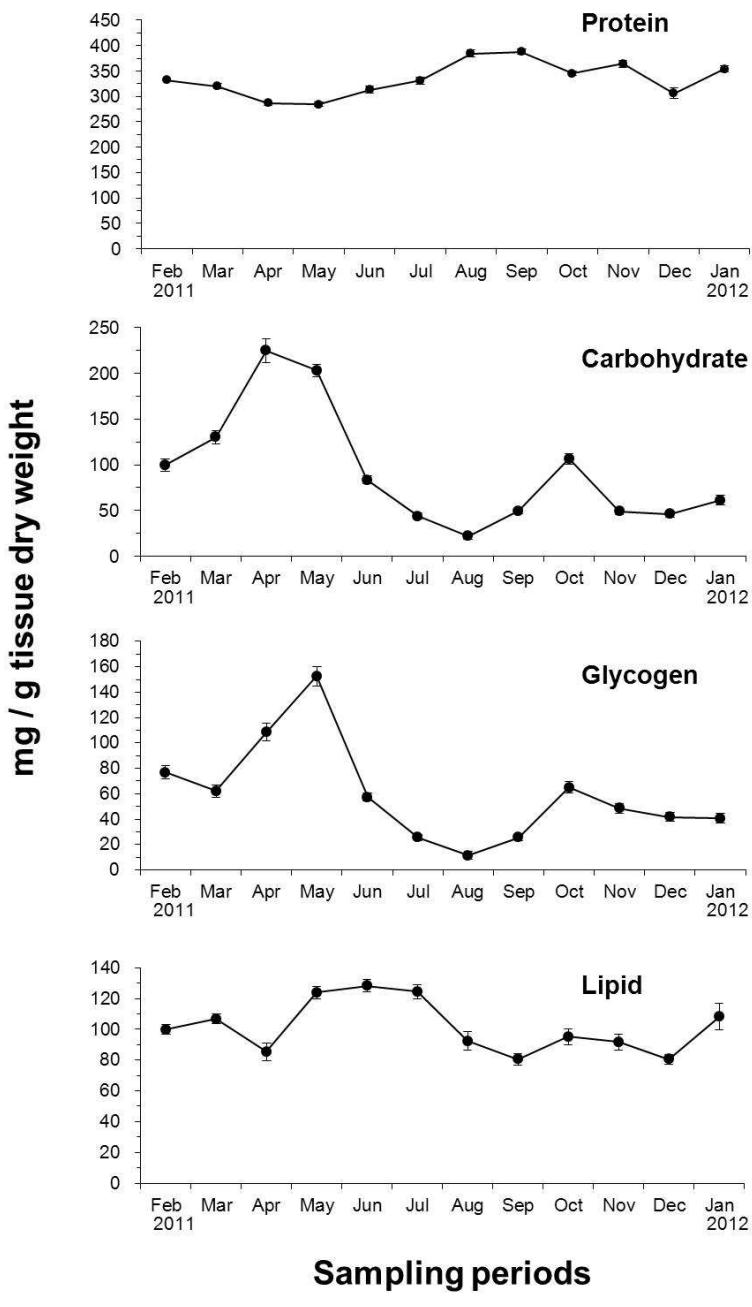


Fig. 25. Monthly variation of the biochemical components of *Saccostrea kegaki* tissue.

6) 혈구 수

가시굴의 혈구 분석에 충분한 혈립프액 ($400 \mu\text{L}$) 확보를 위하여 4–6개체의 혈립프액을 혼합하여 분석에 이용하였다. 2011년 4월에는 유세포 분석기의 고장으로 인하여 혈구 분석을 수행하지 못하여, 2012년 4월에 채집하여 분석하였다.

가시굴 혈구 집단 별 세포 수의 연중 변화는 Fig. 25와 같다. Granulocytes, hyalinocytes, blast-like cells 수의 연중 증감 패턴은 비슷하였으며, 혈구 수는 봄과 여름철이 가을과 겨울철보다 많았다 (Fig. 26). 이는 Soudant et

al. (2004)와 Flye-Saint-Marie et al. (2009)의 연구에서 바지락 (*Ruditapes philippinarum*)의 혈구 수가 수온이 높은 봄과 여름철에 증가하며 수온이 낮은 가을과 겨울철에 감소하는 결과와 일치하였다. 혈구의 수는 세포 분열 (cell division)에 따라 변화하며 세포가 분열되는 시기에 혈구의 수가 증가하게 된다. 이러한 세포 분열을 하기 위해서는 에너지원이 필요하기 때문에 수온이 낮고 먹이가 적은 겨울철보다는 먹이량이 많은 봄과 여름철에 세포 분열의 활동이 활발하다. 이 연구에서는 7월에 가시굴의 혈구 수가 급격히 증가하였으며 소화맹낭위축도에서도 볼 수 있듯이 7월의 가시굴의 영양상태가 좋은 것으로 미루어 보아, 이 시기에 가시굴의 혈구들의 활발한 세포 분열이 일어난 것으로 사료된다.

Pipe et al. (1995)와 Fisher et al. (1996)은 지중해 담치 (*Mytilus galloprovincialis*)와 대서양굴 (*C. virginica*)가 산란시기에 생식소로 많은 혈구들이 침투 (infiltration)하게 됨으로써 혈립프액 중의 총 혈구 수가 감소하였음을 확인하였다. 이 연구에서도 가시굴이 산란이 시작되는 8월에 혈구의 수가 급격히 감소함을 확인할 수 있었다.

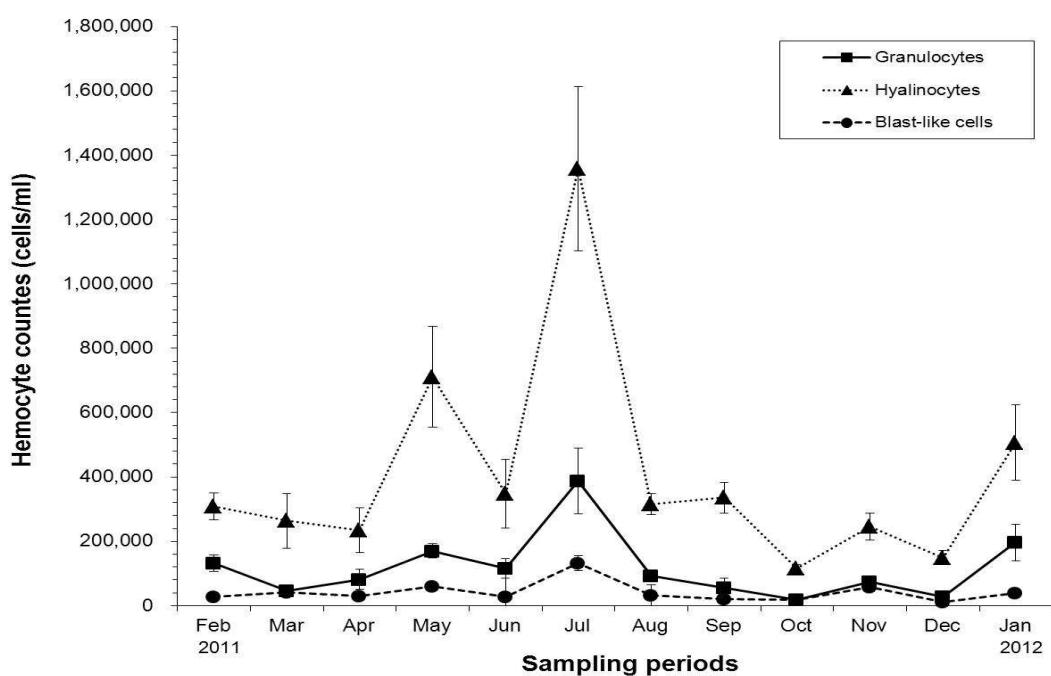


Fig. 26. Monthly variation of hemocyte counts of *Saccostrea kegaki*. Values are presented as mean \pm standard error. For each month, N=5.

7) 혈구의 형태학적 변화

유세포 분석기를 이용하여 측정된 가시굴 혈구의 크기와 내부밀도의 연중변화는 Fig. 27과 같다. Granulocytes의 크기는 8월에 절반 가량으로 급격히 감소한 뒤 11월에 다시 증가하였으며, hyalinocytes의 크기는 6월에 급감한 후 증가하였다가 8월 이후에는 granulocytes와 비슷한 패턴을 보였다. Granulocytes의 내부밀도는 3월과 11월에 증가를 하였으며, hyalinocytes와 blast-like cells은 큰 변동없이 일정하였다. 8월에 granulocytes와 hyalinocytes의 크기가 절반 가량으로 감소하는 것은 7월에 혈구의 수가 급격히 증가하는 결과에서 기인하는 것으로 사료된다. Soudant et al. (2004)와 Flye-Saint-Marie et al. (2009)는 바지락 혈구 수가 많은 시기에 혈구의 크기가 작음을 보고하였다. 이는 혈구가 세포 분열을 하게 되면 새로운 세포들의 수는 증가하게 되지만 분열 초기의 세포들은 성숙한 세포들에 비해 크기가 작기 때문이다.

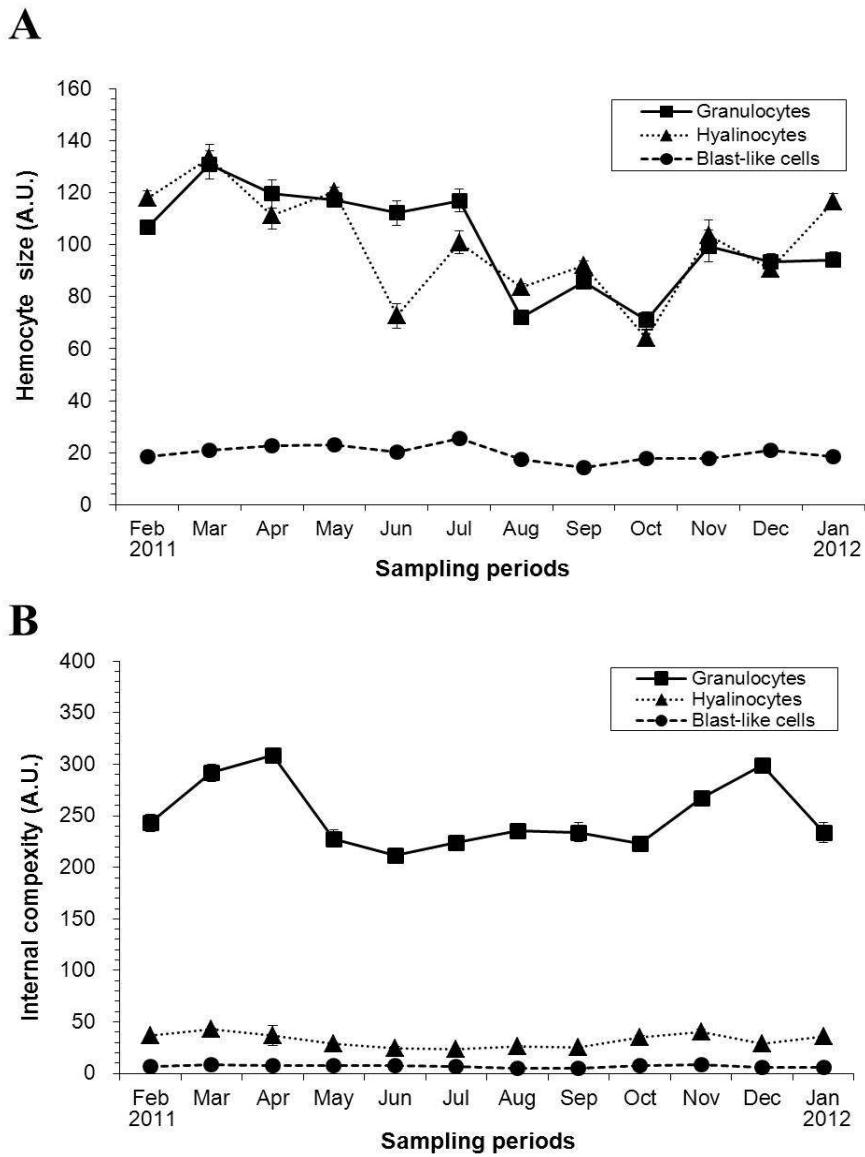


Fig. 27. Monthly variation of relative size (A) and internal complexity (B) of *Saccostrea kegaki* hemocytes. Values are presented as mean \pm standard error. For each month, N=5.

8) 혈구 사망률

가시굴 혈구 사망률의 연중 변화는 Fig. 28과 같다. 3월부터 6월까지는 2–6%의 낮은 사망률을 보이다가 7월에 15.8%로 증가하였으며 9월에는 사망률이 29.1%로 가장 높았다. 혈구의 사망률은 다양한 스트레스에 노출된 시료의 면역력의 변화를 나타내는 바이오마커 (biomarker)로 많이 사용되고 있다. Soudant et al. (2004)은 바지락의 혈구 사망률이 산란 이후에 증가함을 확인하였다. 이 연구에서도 가시굴의 산란이 일어나는 8–9월에 혈구 사망률이 높은 것으로 미루어 보아, 산란 스트레스로 인해 혈구의 사망률이 증가한 것으로 사료된다.

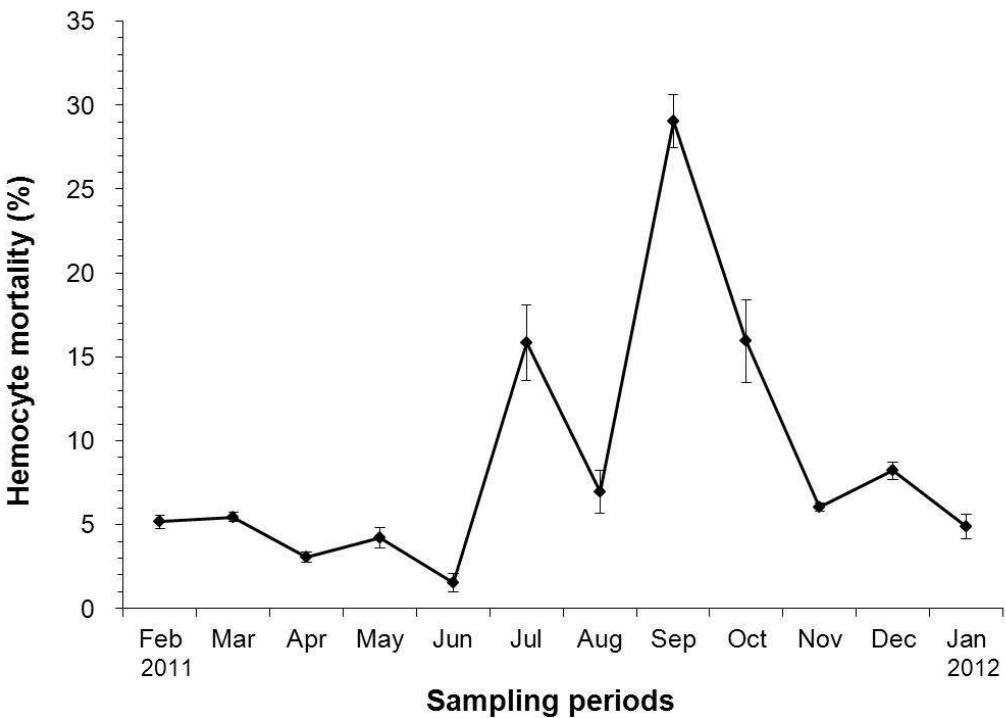


Fig. 28. Monthly variation of hemocyte mortality of *Saccostrea kegaki*. Values are presented as mean \pm standard error. For each month, N=5.

9) 혈구 식세포율

식세포 작용은 혈구의 주요 세포성 면역활동으로 조사 대상종의 면역력을 평가할 수 있는 바이오마커이다. 가시굴의 연중 식세포율은 Fig. 29와 같으며 granulocytes와 hyalinocytes 모두 식세포 작용을 하였다. 그 중에서도 granulocytes가 hyalinocytes보다 5–10배 이상 활발한 식작용을 하는 주요 면역 세포인 것으로 확인되었다. Granulocytes의 식세포율은 5월 이후 증가하여 8월에 51.5%로 가장 높았으며, 9월부터 감소하여 11월에는 26.5%로 가장 낮아졌다. 식세율이 감소하는 시기는 가시굴의 산란시기와 일치하였으며, 이는 산란 스트레스로 인해 가시굴의 면역력이 저하됨을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 Li et al. (2010)의 연구에서 참굴 (*C. gigas*)의 혈구 식세포율이 산란 이후에 감소하는 결과와도 일치한다.

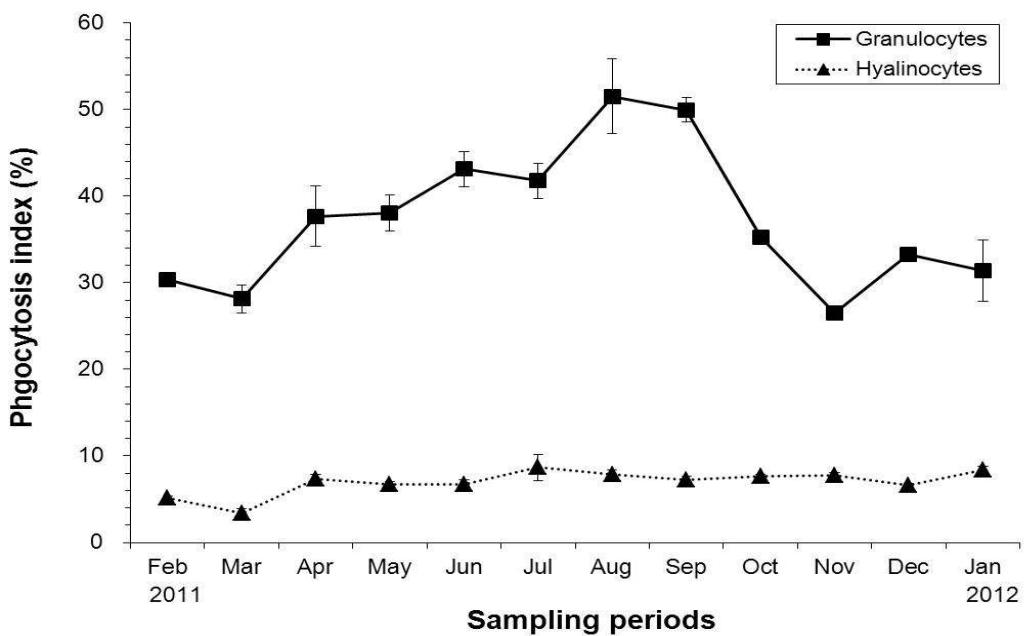


Fig. 29. Monthly variation of hemocyte phagocytosis index of *Saccostrea kegaki*. Values are presented as mean \pm standard error. For each month, N=5.

2. 중국굴 (*H. hyotis*)

1) 채집 지역의 수온과 염분

중국굴이 채집된 서귀포 연안 수심 10 m의 수온과 염분은 국립수산과학원의 자료를 인용하여 Table 5에 정리하였다. 2011년도 여름 (7~9월)에는 전년도보다 평균 2도 가량 낮은 저수온기가 발생하였다는 제주도 해양수산연구원의 보도가 있어 2010년도의 수온과 염분 자료들을 같이 인용하여 비교하였다. 수온과 염분 측정이 매달 실시되지는 않았지만 여름철인 7~9월에 2011년도의 수온이 2010년도에 비해 1~2도 가량 저해되어 있음을 확인할 수 있었다. 2010년도에는 7월에 20.8°C를 기록하여 9월에 최대 26.6°C까지 상승하였지만, 2011년도 8월의 수온은 19.3°C에 머무르고 있었다. 염분은 평균 33~34 psu를 유지하였으며 여름철인 8월에 31.3 psu로 감소하였다.

Table 5 Seasonal changes in 10m depth water temperature and salinity at the sampling site

	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec
2010	Temperature (°C)	15.1	–	14.7	–	–	20.8	–	26.6	–	–
	Salinity (psu)	34.3	–	34.3	–	–	32.1	–	29.8	–	34.5
2011	Temperature (°C)	–	14.4	–	15.5	19.5	–	19.3	–	22.0	–
	Salinity (psu)	–	34.5	–	34.5	33.3	–	31.3	–	34.3	–

2) 생체량과 비만도

이 연구에서 사용된 중국굴의 각장 (shell length)은 66.2–131.3 mm, 조직건중량 (tissue dry weight)은 0.867–4.718 g이었다 (Table 6). 2011년 3월부터 5월까지는 채집된 개체들의 수와 크기가 일정하지 않았으며, 2011년 6월은 기상악화로 scuba diving이 불가능하여 시료의 채집을 수행할 수 없었다. 그리하여 2012년 6월에 추가로 중국굴 30개체를 채집하여 분석에 이용하였다. 중국굴의 비만도는 3월로부터 7월까지 큰 변화 없이 일정하기 유지되었으며, 8월에 급격히 증가한 후 다시 이전 값의 범위로 감소하여 일정한 값을 유지하였다 (Fig. 30).

Table 6 Shell length (mm) of *Hyotissa hyotis* collected in this study. N, number of sample; SD, standard deviation

Month	N	Shell length (mm)	Tissue dry weight (g)
Mar 2011	19	66.2 ± 6.4	1.012 ± 0.204
Apr 2011	2	91.3	4.424
May 2011	9	90.8 ± 13.4	1.984 ± 0.556
Jun 2011	30	131.6 ± 4.6	4.769 ± 0.336
Jul 2011	42	80.8 ± 2.7	0.867 ± 0.074
Aug 2011	18	118.1 ± 6.8	3.472 ± 0.390
Sep 2011	30	130.5 ± 3.2	4.273 ± 0.277
Oct 2011	30	123.7 ± 2.7	3.516 ± 0.152
Nov 2011	30	130.7 ± 2.1	3.740 ± 0.248
Dec 2011	30	131.3 ± 2.7	4.699 ± 0.286
Jan 2012	30	118.1 ± 2.2	3.582 ± 0.271
Feb 2012	30	131.3 ± 2.7	4.718 ± 0.299

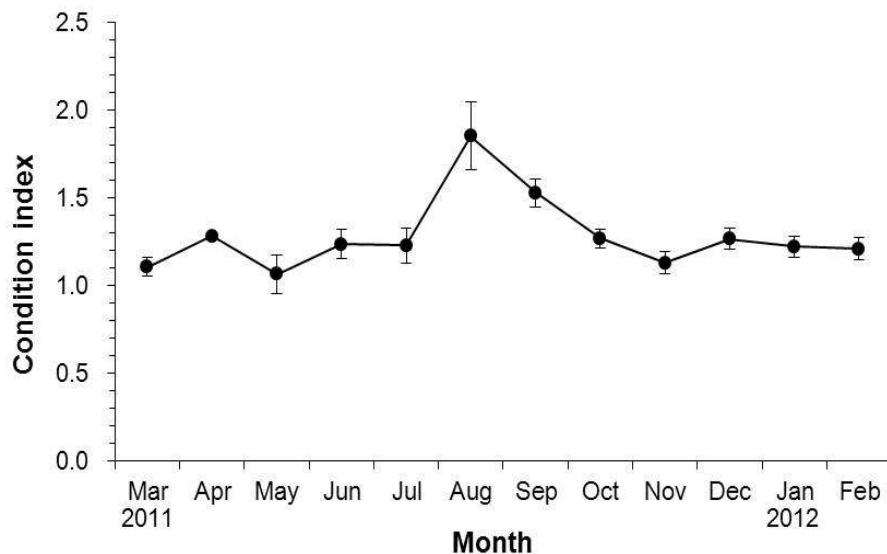


Fig. 30. Monthly changes in condition index of *Hyotissa hyotis*. Values are presented as mean with standard error.

3) 생식주기

1년 동안 채집된 중국들 중 8월과 9월에 채집된 개체들의 생식소는 완숙기로 외관상 뚜렷한 특징이 관찰되었다 (Fig. 31). 완숙한 중국굴의 암컷의 생식소는 주황색 (Fig. 31A), 수컷의 생식소는 유백색 (Fig. 31B)을 띠었다. 중국굴 암컷과 수컷의 생식소 발달단계는 Fig. 32과 Fig. 33과 같이 미분화기 (indifferent stage), 초기발달기 (early development stage), 후기발달기 (late development stage), 완숙기 (ripe stage), 산란기 (spawning stage) 및 산란후기 (spent stage)의 5단계로 구분되었다. 미분화기는 조직 내에 생식세포들이 관찰되지 않아 암, 수의 구분이 불가능하였다 (Fig. 32A). 초기발달기는 여포 내에 암컷은 작은 난원세포 (oogonia)와 초기난황세포 (early vitellogenic oocytes)가 수컷은 정원세포 (spermatogonia)가 관찰되었다 (Fig. 32B, Fig. 33A). 후기발달기는 여포가 확장되어 외투막 (mantle)과 소화맹낭 (digestive gland) 사이에 넓게 자리잡고 있었다. 암컷은 크기가 커진 난황세포 (vitellogenic oocyte)들이 여포벽을 따라 발달하였으며 (Fig. 32C), 수컷은 정모세포 (spermatocyte)들이 여포벽을 따라 발달하고 정충 (spermatozoa)들이 여포의 중심으로 이동하는 모습이 관찰되었다 (Fig. 33B). 완숙기에서 암컷은 여포가 완숙한 난 (mature oocyte)들로 채워져 있으며 (Fig. 32D), 수컷은 정충들이 방사상의 모양으로 여포를 채우고 있었다 (Fig. 33C). 산란기는 여포벽의 두께가 얇아지면서 알과 정충들이 방란, 방정되어 일부 빈 공간들이 관찰되었다 (Fig. 32E, Fig. 33D). 산란후기에는 대부분의 생식세포들이 산란이 되어 수축된 여포에 일부 잔여 생식세포들만이 관찰되었다 (Fig. 32F, Fig. 33E). 여포 내에 난세포와 정세포가 동시에 존재하는 개체들도 9월과 10월에 각각 1개체 씩 관찰이 되었다 (Fig. 32F).

중국굴의 조직학적 시료의 단면을 관찰시, 2011년 3월에 채집된 2개체에서 기생동물인 흡충 (trematode)의 감염을 확인하였다 (Fig. 34). Trematode의 감염 부위는 생식소의 여포 세포 (follicle), 아가미 (gill), 결합조직 (connective tissue)으로 다양한 충체가 관찰되었다.

생식소 발달단계에 따라 분류된 중국굴의 연중 생식주기 결과는 Fig. 35와 같다. 2011년 4월에는 2 개체만이 채집되었으며, 두 개체 모두 암컷으로 수컷의 생식소 발달단계는 조사하지 못하였다. 암컷 중국굴은 7월에 후기 발달기가 관찰이 되었으며 8월과 9월에 완숙기를 거쳐 9월부터 11월까지 산란을 하였다. 수컷 중국굴은 2월부터 생식소 발달을 시작하여 8월과 9월에 완숙기를 거쳐 9월부터 12월까지 산란을 하였다. Duprat-Bertazzi and García-Domínguez (2005)는 멕시코 걸프만에 서식하는 중국굴의 산란은 수온이 20.5°C일 때 시작함을 확인하였다. 이 연구에서 중국굴이 산란을 시작하는 9월의 수온을 측정하지 못하였지만 8월 (19.3°C)과 10월 (22.0°C)의 채집 지역 인근의 측정값으로 유추해보았을 때 20°C 이상에 이르렀을 것으로 추정된다. 또한, 2011년도 여름철 제주 연안의 저수온 현상으로 2010년도에 비해 1~2달 정도 산란시기가 늦어졌을 것으로 사료된다.

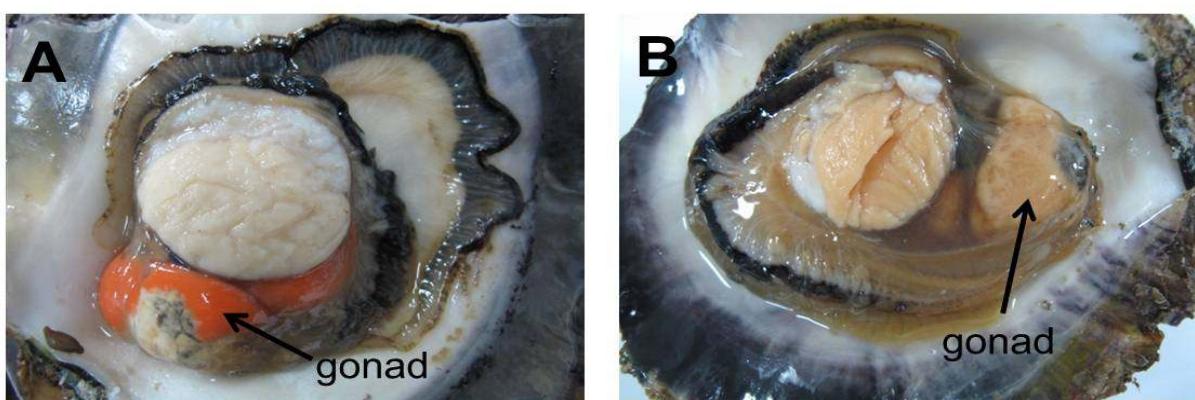


Fig. 31. Photograph of *Hyotissa hyotis* gonad tissue. Female (A), Male (B).

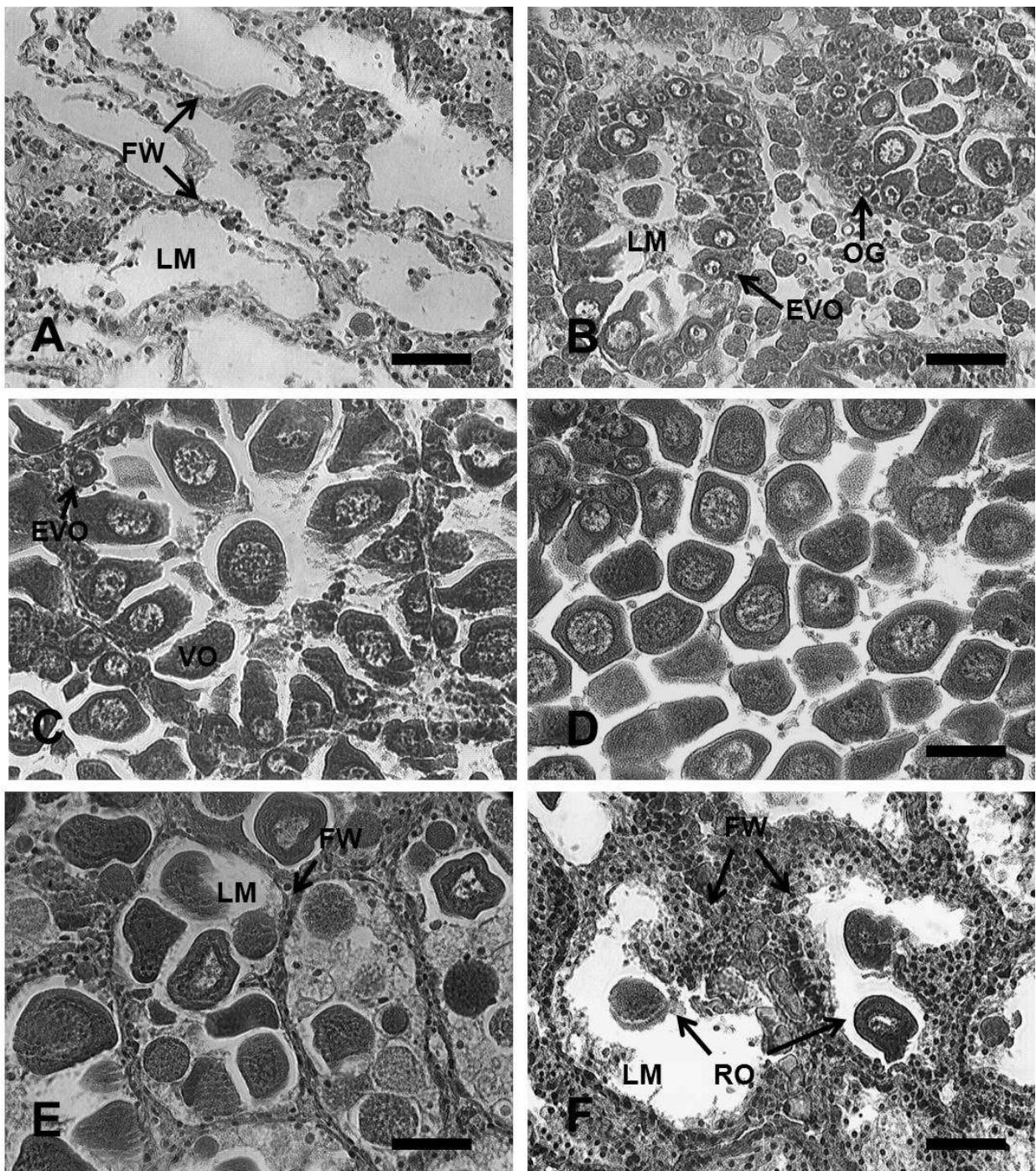


Fig. 32. Photomicrographs of ovaries of *Hyotissa hyotis*. (A) Indifferent stage: gonad with vacated lumen (LM) and thin follicle wall (FW). (B) Early developing stage: ovary containing small oogonia (OG) and early vitellogenic oocytes (EVO) occur along the follicle wall. (C) Late developing stage: growing ovary with early vitellogenic oocytes (EVO) and vitellogenic oocytes (VO). (D) Ripe stage: mature ovaries packed with ova and a thin layer along follicle wall. In germinal epithelium, very small primary oocytes are present. (E) Partially spawning stage: partly spawned ovaries with loosely packed ova and vacated space. (F) Spent stage: ovaries largely devoid of ova and growing ovary with vitellogenic oocytes and relict ova (RO). Scale bar: 50 μ m.

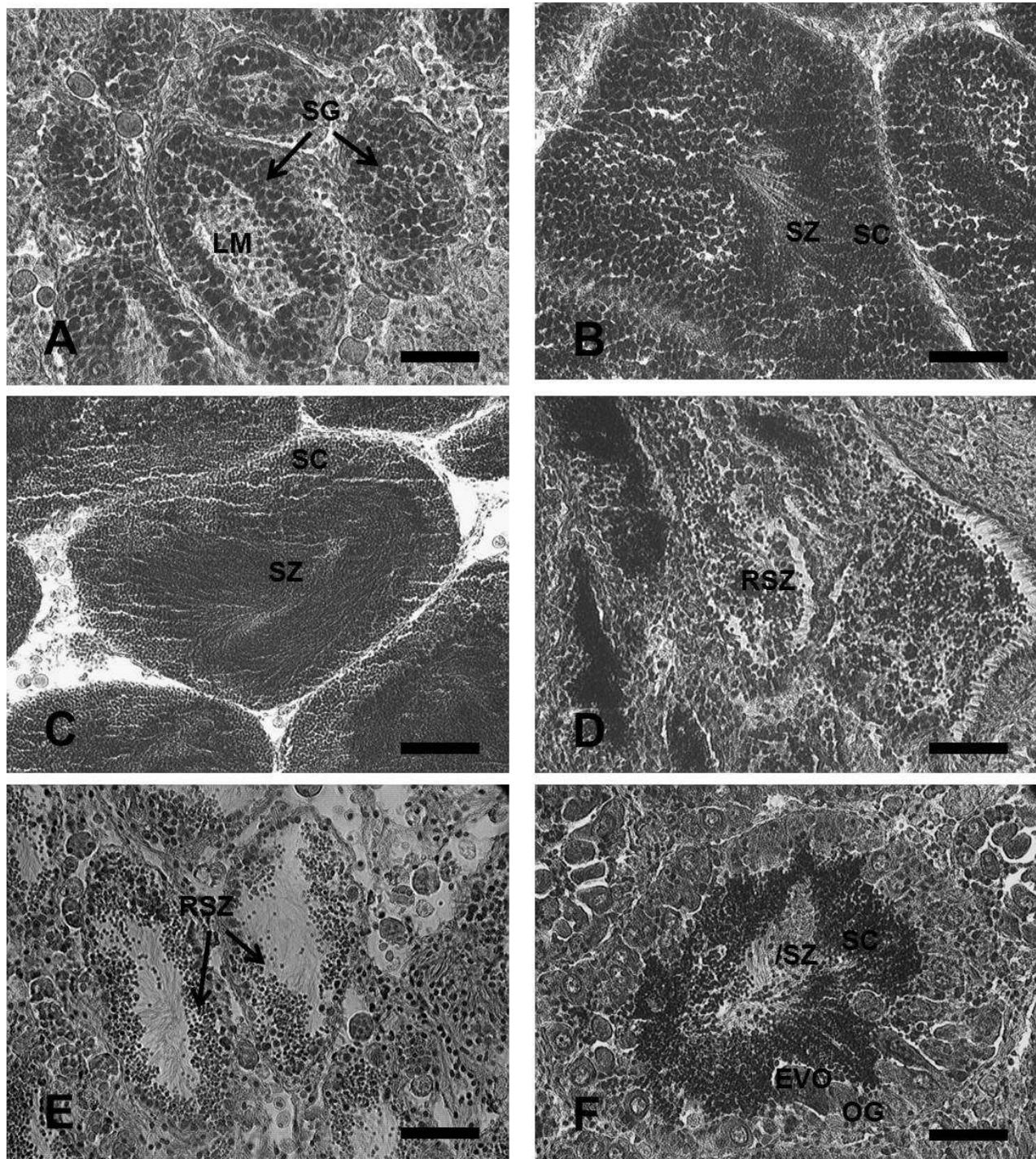


Fig. 33. Photomicrographs of testis of *Hyotissa hyotis*. (A) Early developing stage of testis exhibiting spermatogonia (SG). (B) Late developing stage: columns of SC and spermatozoa (SZ) move to the central part of growing testes. (C) Ripe stage: mature testes filled with SZ. (D) Spawning stage: partly spawned testes with vacated space. (E) Spent stage: partly devoid follicles with relict spermatozoa (RSZ). (F) Hermaphrodite. Scale bar: 50 um. LM: lumen, FW: follicle wall

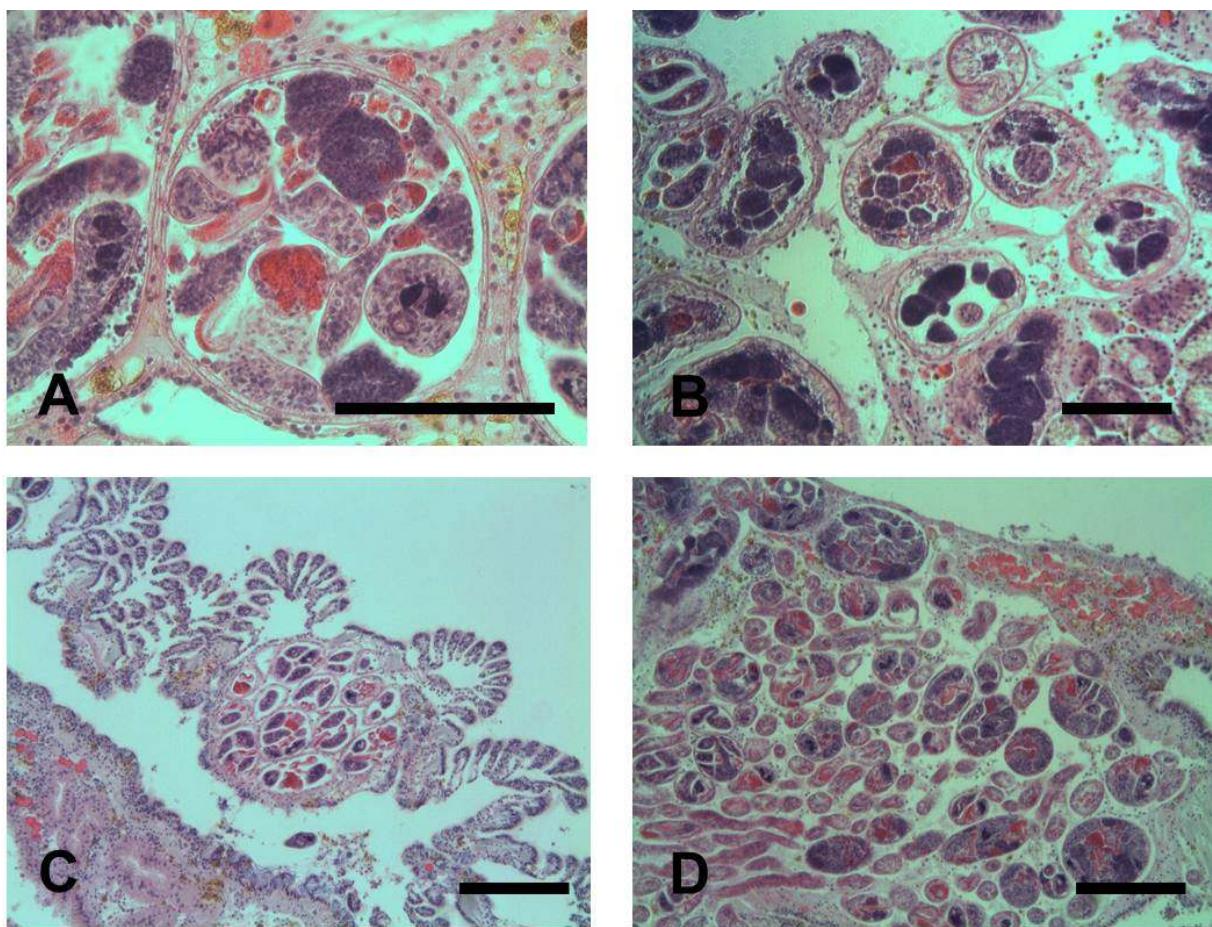


Fig. 34. Trematode infection in the gonad follicle (A, B), gill (C) and connective tissue (D) of *Hyotissa hyotis*. Scale bar = 100 μm .

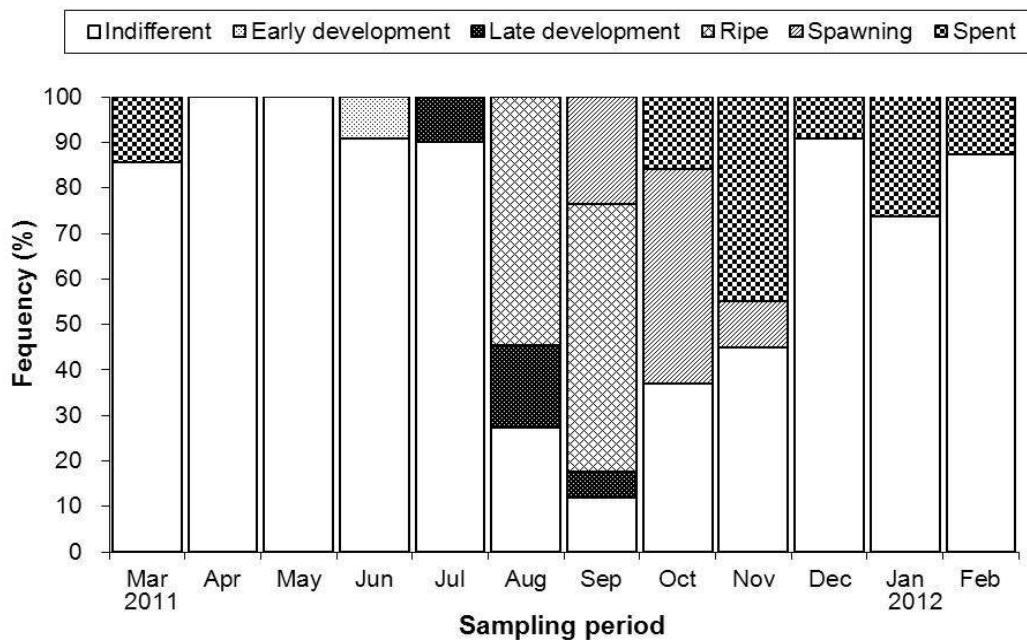
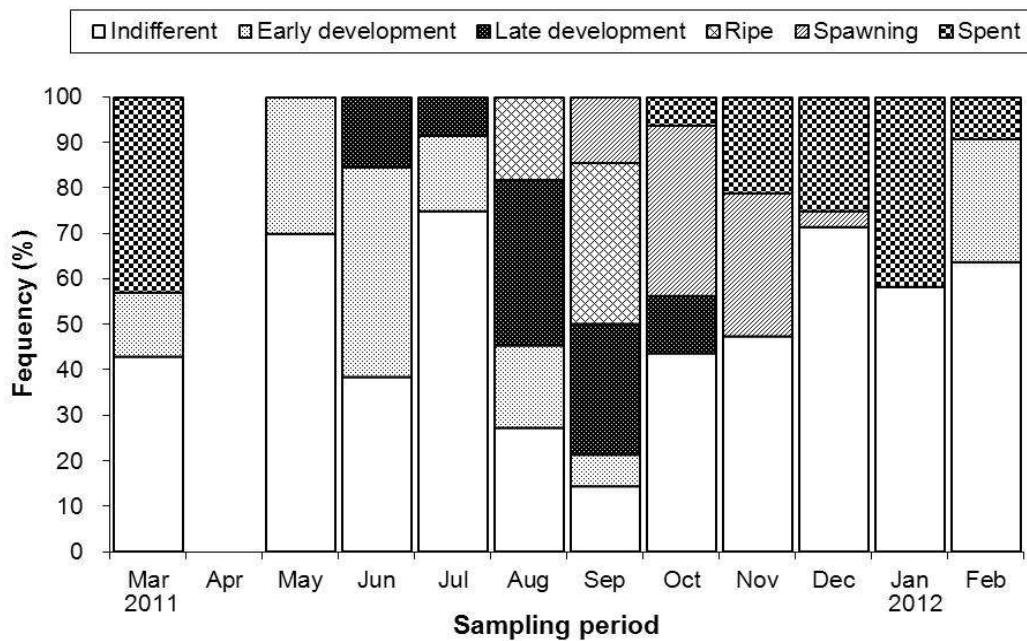
A**B**

Fig. 35. Percentage of reproductive stages of *Hyotissa hyotis*. A, female; B, male.

4) 소화맹낭위축도

중국굴의 소화맹낭위축도는 가시굴과 동일한 방법으로 0~4 단계 등급으로 구분하였다 (Fig. 36). 중국굴의

소화맹낭위축도의 연중 변화는 Fig. 37과 같이 해양환경관리공단에서 서귀포 연안 저층에서 측정한 chlorophyll a 농도값과 같이 비교하였다. 중국굴의 소화맹낭위축도는 5월에 1.1로 낮긴 하였지만 chlorophyll a의 농도가 낮았던 3월과 7월에 각각 2.3과 2.5로 높았으며 chlorophyll a의 농도가 증가하는 8월 이후에는 소화맹낭위축도 지수가 2 이하로 감소하였다. 이러한 결과는 소화맹낭위축도가 먹이량이 많을 때 중국굴의 영양상태가 좋음을 확인할 수 있었다. 40% 이상의 개체들이 산란하였던 10월에 소화맹낭위축도 지수가 증가하였으며, 이는 산란 스트레스에 의해 영양상태가 저하되어 있음을 시사한다. 이러한 결과들을 미루어 보아 중국굴의 소화맹낭위축도도 가시굴과 마찬가지로 중국굴의 영양상태를 평가하는데 좋은 지시자인 것으로 확인되었다.

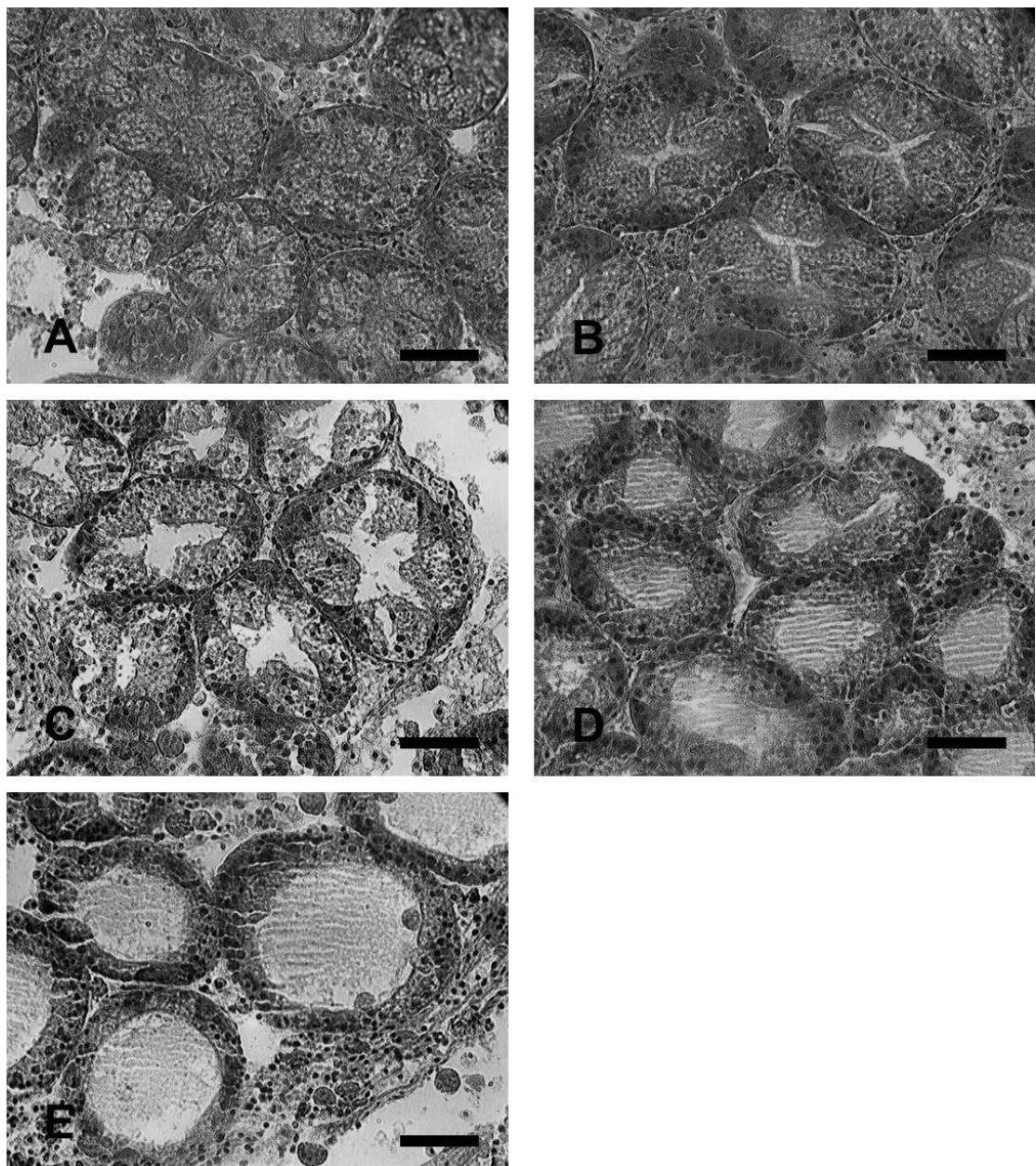


Fig. 36. Photomicrographs of digestive gland atrophy conditions of *Hyotissa hyotis*. A, absorptive stage I (Score 0); B, holding stage (Score 1); C, absorptive stage II (Score 2); D, disintegrative stage (Score 3); E, reconstituting stage (Score 4). Scale bar: 50 μm .

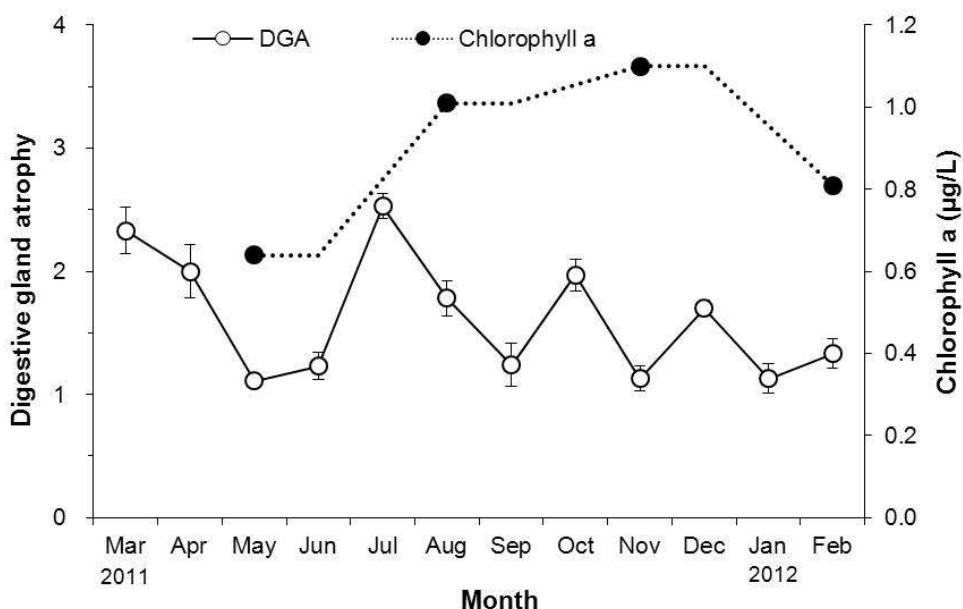


Fig. 37. Monthly changes in digestive gland atrophy (DGA, mean \pm standard error) of *Hyotissa hyotis* and chlorophyll a concentration.

5) 체조성분 함량

중국굴의 체조성 성분은 패각근과 잔여 조직부위로 나누어 단백질, 탄수화물, glycogen 및 지질을 분석하였다. 중국굴의 패각근과 잔여 조직에서 모두 단백질의 함량이 평균 350–450 mg/g tissue dry weight의 범위를 나타냈으며, 단백질이 중국굴 체조성분의 주요 구성원임을 확인하였다. 중국굴의 단백질 함량의 연중 변화는 크지 않았다 (Fig. 38 and Fig. 39). 탄수화물과 glycogen은 패각근에서 각각 평균 41.3–111.5 mg/g과 16.9–84.8 mg/g tissue dry weight으로 잔여 조직의 평균 6.8–21.9 mg/g (탄수화물)과 2.4–9.7 mg/g tissue dry weight (glycogen) 보다 높은 것으로 확인되었다. 특히, 잔여조직의 탄수화물과 glycogen 함량은 생식세포 발달시기인 봄철에 증가하는 경향을 보였다 (Fig. 39). 지질은 다른 생화학 조성분과 마찬가지로 패각근에서 평균 45.8–97.0 mg/g tissue dry weight으로 잔여 조직부위의 4.2–58.4 mg/g tissue dry weight 보다 높았다 (Fig. 38 and Fig. 39).

다른 이매패류와 같이 중국굴에서도 glycogen을 패각근에 저장해 두었다가 배우자 형성시기에 주 에너지원으로 사용하는 것으로 사료된다. Rodríguez-Astudillo et al. (2005)의 멕시코 걸프만에 서식하는 중국굴이 주 에너지원인 탄수화물 또는 glycogen을 패각근에 저장하고, 이를 배우자 형성시기에 사용하다는 연구 결과와도 일치한다. 우리나라에 서식하는 중국굴의 연중 번식주기 및 생화학 조성분 변화에 관한 연구는 전무한 실정으로, 이 연구 수행을 통한 중국굴의 번식주기 규명과 생화학 조성분 변화에 관한 결과는 국내 패류 연구에 있어 그 의미가 매우 크다.

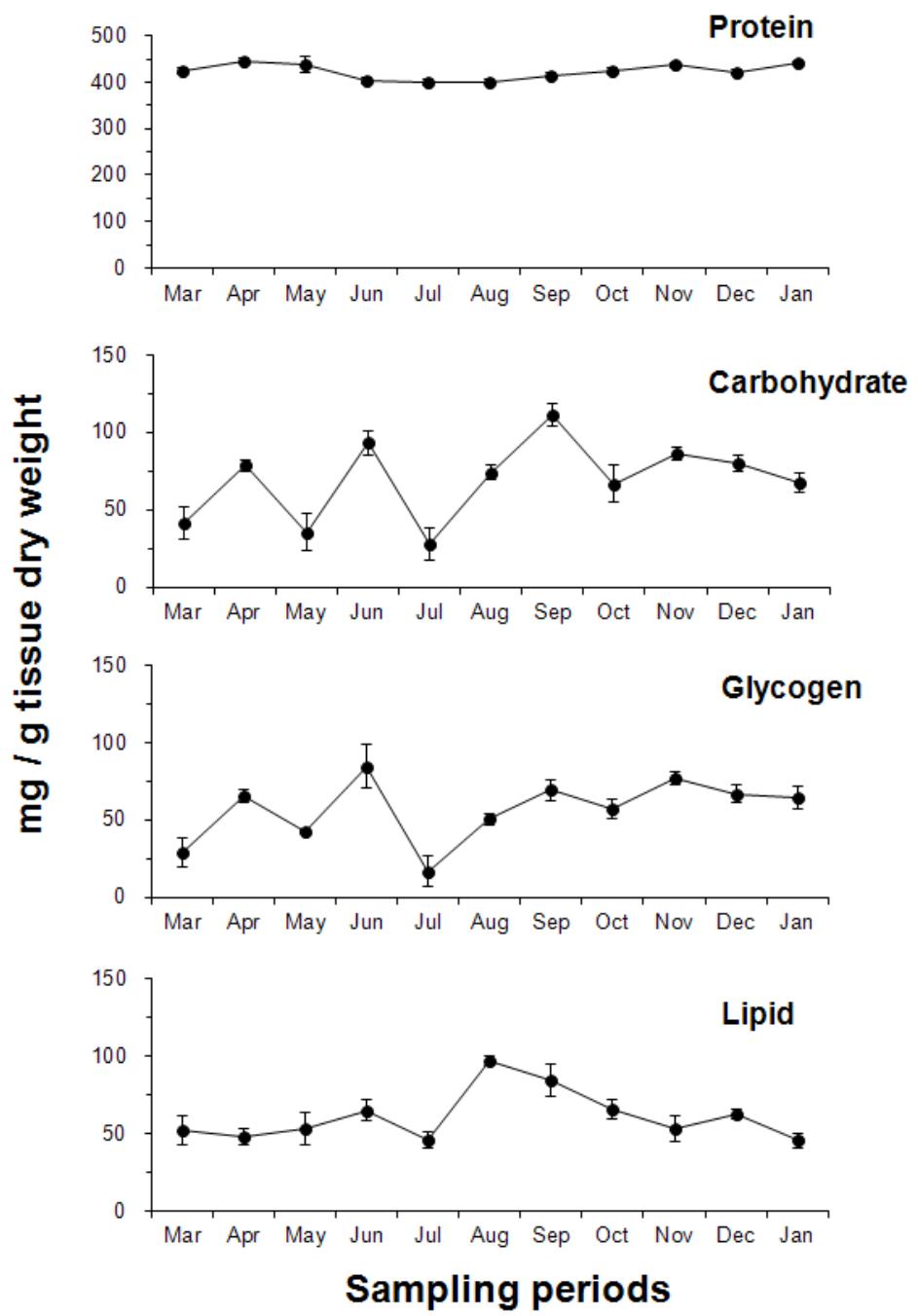


Fig. 38. Monthly variation of biochemical components of adductor muscle of *Hyotissa hyotis*.

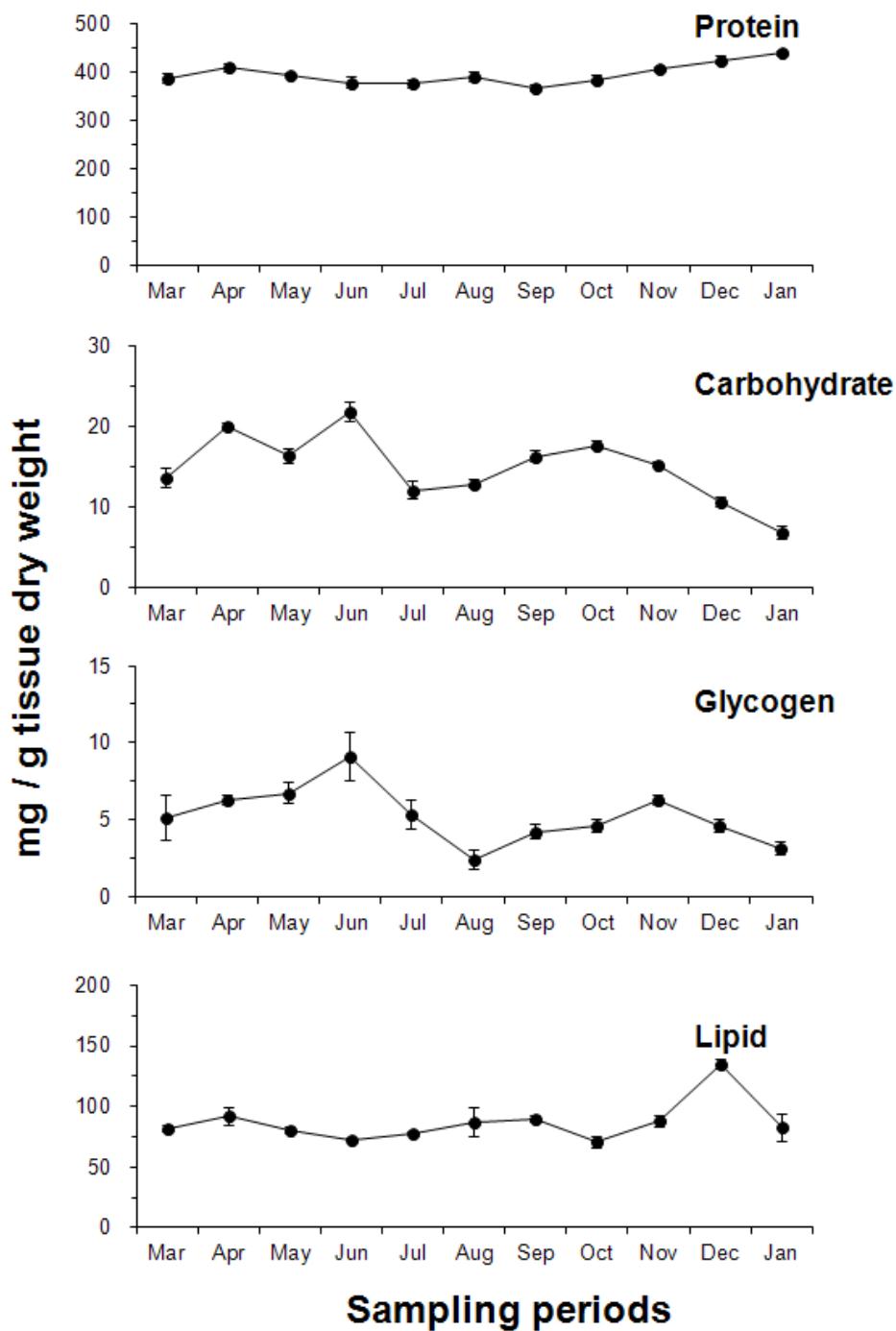


Fig. 39. Monthly variation of biochemical components of remaining soft tissue of *Hyotissa hyotis*.

6) 혈구 수

중국굴 혈구 집단 별 세포 수의 연중 변화는 Fig. 40과 같다. Granulocytes, hyalinocytes, blast-like cells 수의 연중 증감 패턴은 비슷하였다. 혈구 수는 봄철인 2월부터 5월까지 서서히 증가하다, 6월 이후 감소하는 경향을 보였다. 가을철인 10월과 11월에는 혈구 수가 갑자기 증가하여 최대값을 기록하였으며, 12월 이후에는 다시 감소하는

패턴을 보였다. 중국굴의 혈구 수가 증가한 10월과 11월은 서식 지역내 chlorophyll a의 농도가 가장 높았던 시기와 일치한다. 가시굴의 혈구 수의 변화 결과에서와 마찬가지로, 중국굴 혈구의 세포 분열이 먹이량이 많았던 10월과 11월에 활발히 일어난 것으로 사료된다. 또한, 혈구의 수가 산란 또는 산란후기인 11월부터 급격히 감소하는 것은 산란 이후에 많은 혈구들이 생식소 조직 사이로 침윤 현상에 의한 것으로 사료된다.

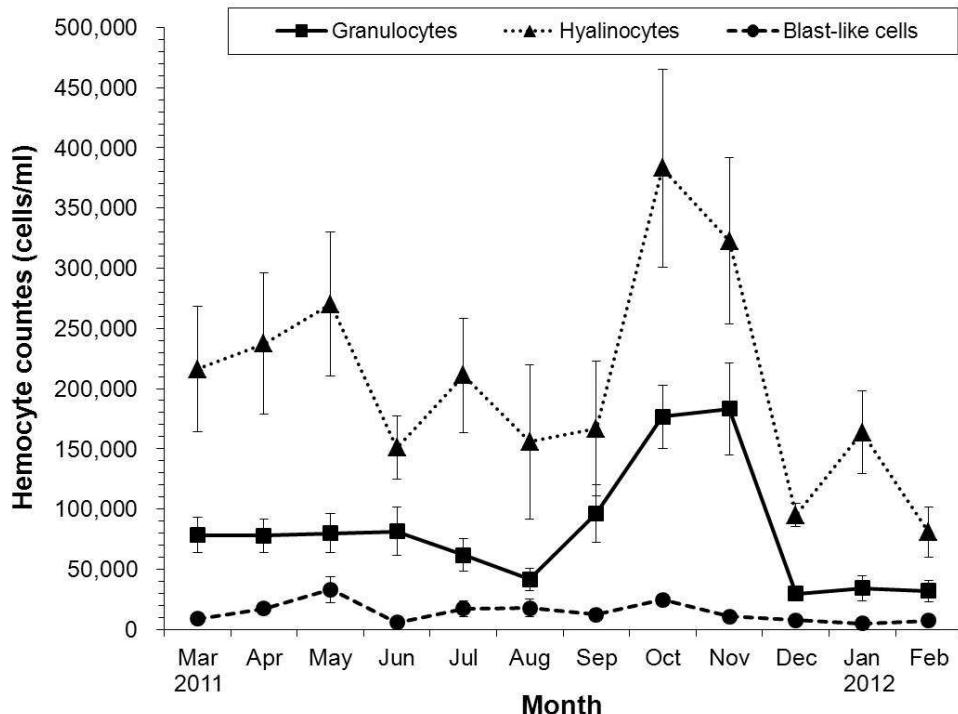


Fig. 40. Monthly variation of hemocyte counts of *Hyotissa hyotis*. Values are presented as mean \pm standard error. For each month, N=5.

7) 혈구의 형태학적 변화

유세포 분석기를 이용하여 측정한 중국굴 혈구의 크기와 내부밀도의 연중변화는 Fig. 41과 같다. 세 종류의 혈구 세포의 크기의 연중 변화의 패턴은 비슷하였으며, 가시굴의 결과와는 달리 혈구 수의 변화에 따른 세포의 크기 변화는 관찰되지 않았다. 중국굴 혈구의 내부밀도는 hyalinocytes와 blast-like cells은 연중 변화가 거의 없었다. 이와 달리, granulocytes는 9월에 최저값을 기록한 후 서서히 증가하여 1월에 내부밀도가 가장 높은 수치를 기록하였다.

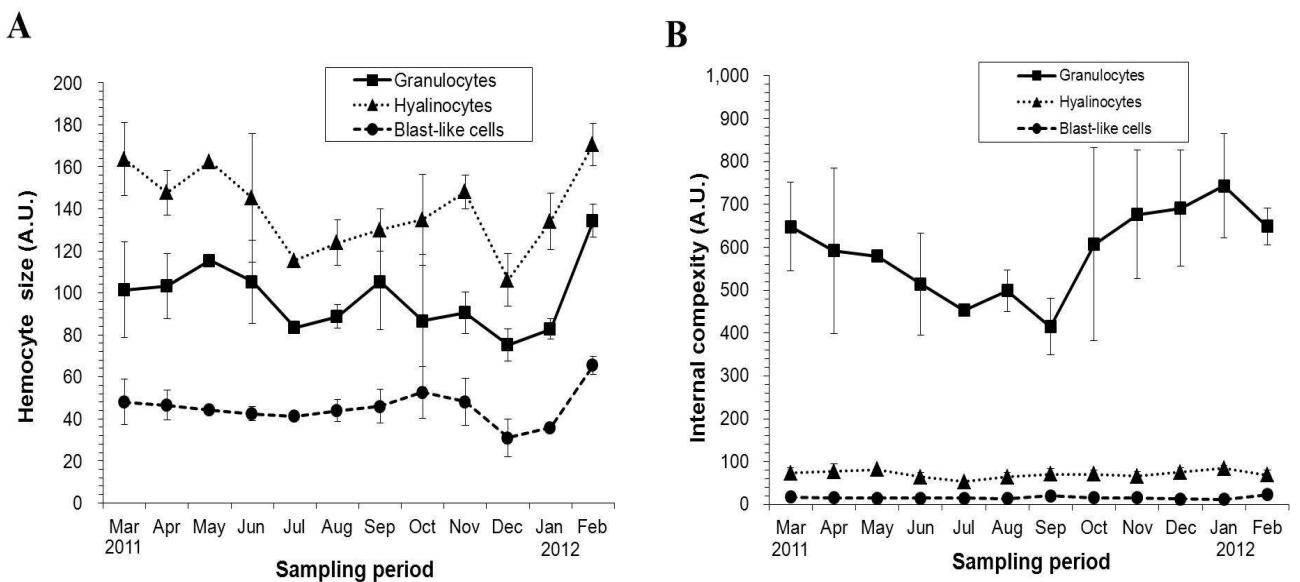


Fig. 41. Monthly variation of relative size (A) and internal complexity (B) of *Hyotissa hyotis* hemocytes. Values are presented as mean \pm standard error. For each month, N=5.

8) 혈구 사망률

중국굴의 혈구 사망률의 연중 변화는 Fig. 42와 같다. 3월부터 7월까지는 5–9%의 낮은 혈구 사망률을 보이다가 8월에 25.8%로 사망률이 급격히 증가하였다. 이 현상은 가시굴의 결과와 비슷하게, 산란이 일어나는 8–9월에 혈구 사망률이 높은 것으로 미루어 보아, 산란 스트레스로 인해 혈구의 사망률이 증가한 것으로 사료된다.

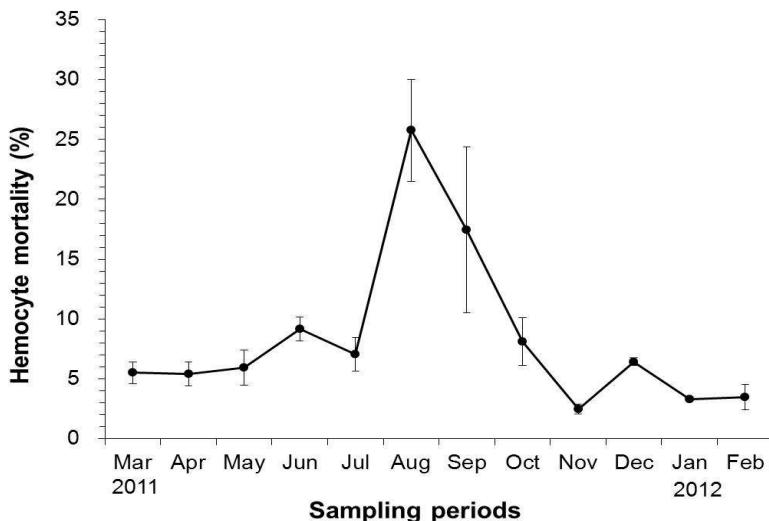


Fig. 42. Monthly variation of hemocyte mortality of *Hyotissa hyotis*. Values are presented as mean \pm standard error. For each month, N=5.

9) 혈구 식세포율

중국굴 혈구 식세포율의 연중 변화는 Fig. 43과 같으며, 중국굴의 혈구 식세포율은 가시굴과는 달리 뚜렷한 연중 변화를 보이지 않았다. 2월에 이후 3월부터 5월까지 주요 면역 세포인 granulocytes의 식세포율이 낮았으며 혈구 사망률도 갑자기 증가한 것으로 미루어 보아 이 시기의 중국굴의 면역력은 저하되어 있음을 알 수 있었다. 면역력이 저하된 3월에는 중국굴의 비만도가 갑자기 급감하였고 소화맹낭위축도 지수도 높았으며, 흡충에 감염된 개체들도 관찰되었다. 그러므로 혈구 사망률과 식세포율은 중국굴의 건강도를 평가하는데 좋은 바이오 마커임을 확인할 수 있었다.

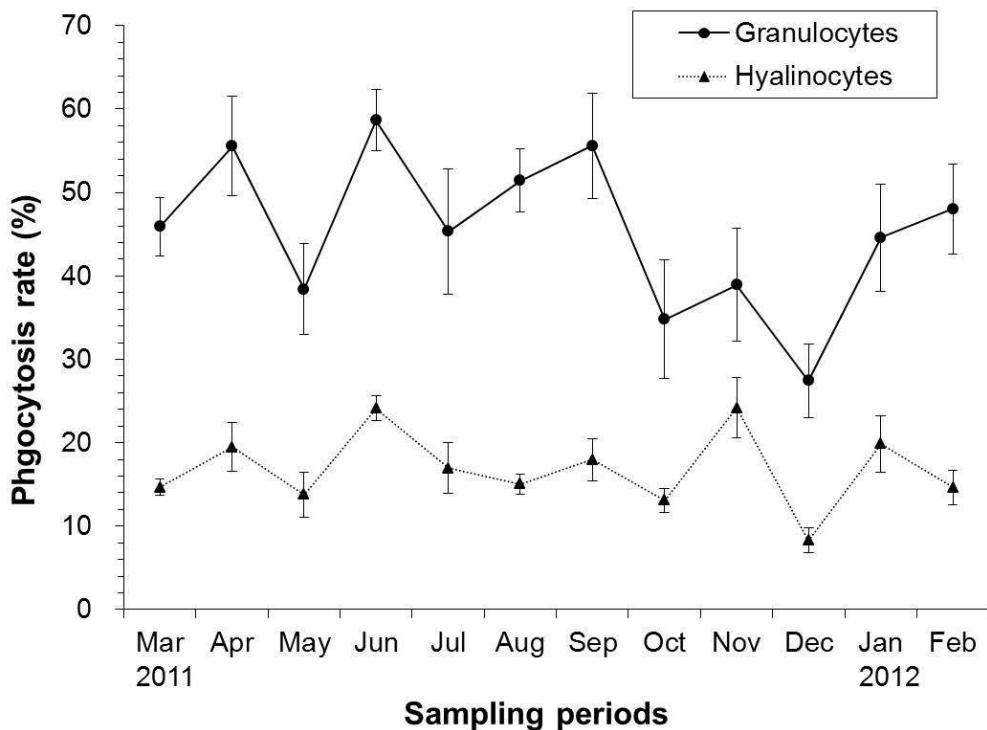


Fig. 43. Monthly variation of hemocyte phagocytosis index of *Hyotissa hyotis*. Values are presented as mean \pm standard error. For each month, N=5.

이번 연구에서는 제주 연안에 서식하는 아열대성 굴인 가시굴과 중국굴의 생식주기를 규명하였으며 비만도, 소화맹낭위축도, 혈구 면역학적 특성들의 연중 변화를 동시에 측정한 것은 최초의 시도이다. 이러한 조직병리학적, 면역학적 방법을 병합한 모니터링 연구는 기존의 군집 차원의 연구에서 벗어나 개체군의 생리, 번식, 면역 등의 기능적인 특성을 분석한 결과이다. 이 연구에서 시도하였던 모니터링 기법들과 연구 결과들은 제주 연안에 서식하는 아열대성 굴들의 자원 관리 및 종 보존 차원뿐 만 아니라 연안의 환경오염 및 수온 상승 등의 장기적 모니터링 연구에도 널리 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

III. 중국굴의 식품영양학적 특성 분석

1. 연중 AMI 변화

중국굴의 전체 조직 건중량에 대한 패각근의 건중량으로 나타낸 패각근 지수(AMI)의 연중변화는 Fig. 44와 같다. 전체 조직 중 패각근의 구성 비율은 연중 50.4–63.1%의 범위로 절반 이상을 차지하고 있었다. 중국굴 패각근 지수는 연중 전체 조직의 50% 이상을 유지하며, 4월에 가장 높은 63.1%, 10월에 가장 낮은 50.4%를 기록하였다. 중국굴의 패각근 지수는 5월부터 7월까지 서서히 증가하기 증가하다, 8월부터 10월까지 지속적으로 감소하는 패턴을 보였다. 이 기간은 중국굴의 성 성숙과 산란기로 패각근 지수의 변화가 중국굴의 생식주기와 밀접한 상관관계를 갖고 있음을 추정할 수 있다. 산란이 끝난 11월부터는 패각근 지수가 55.4%로 증가하여 1월까지 이전 수준인 54% 이상을 유지하였다.

가리비류와 키조개류의 패각근은 식품으로 널리 이용되고 있으며, 이들의 패각근은 전체 육질의 20–40%를 차지한다 (Pazos et al., 1997; Ruiz-Verdugo et al., 2001; Soria et al., 2002; Beltrán-Lugo et al., 2006; Leal-Soto et al., 2011). 이 연구에서 확인된 중국굴의 패각근의 구성비는 가리비와 키조개류보다 약 2배정도 많은 50–60% 구성 비율을 나타내고 있어, 중국굴 패각근의 식품으로서의 이용가능성이 높음을 시사한다. 또한, 가리비와 키조개류에서는 대상종의 생리적 상태를 나타내는 지표로 패각근 지수를 이용하여 설명하고 있다 (Kleinman et al., 1996; Soria et al., 2002; Beltrán-Lugo et al., 2006; Leal-Soto et al., 2011; Ocaño-Higuera et al., 2011). 이들의 연구에 따르면, 패각근 지수는 생식소 발달 지수와 음(–)의 상관관계가 있으며, 운송 중에 발생하는 스트레스나 질병에 따라 패각근 지수가 감소한다고 설명하고 있다. 따라서, 중국굴의 산란기인 8월부터 10월까지 감소한 패각근 지수는 산란 스트레스를 간접적으로 확인할 수 있는 좋은 생리적 marker이며, 이를 지수는 중국굴의 번식, 생리학적 상태 또는 패각근의 품질을 나타내는 좋은 지표로 활용될 수 있음을 시사한다.

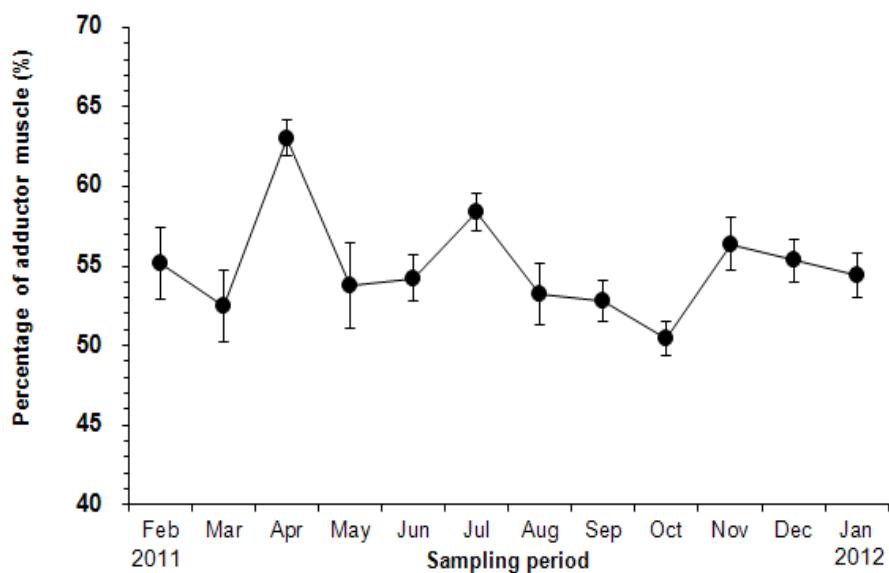


Fig. 44. Monthly changes in adductor muscle index (AMI) of *Hyotissa hyotis*. Values are presented as mean \pm standard error.

2. 패각근의 일반조성분 분석

중국굴 패각근의 일반 조성분을 분석한 결과, 조단백질이 67–70%로 패각근의 주된 성분이었으며, 탄수화물 16–19%, 조회분 8–10%, 조지방 4–6%로 구성되어 있었다 (Table 7). 다른 연구들에서 중국굴을 비롯한 해산 이매패류의 패각근에서 측정한 일반 조성분비를 Table 8에 요약하였다. 이 연구에서 측정된 중국굴 패각근의 일반 조성분은 Rodríguez-Astudillo et al. (2005)이 멕시코 걸프만에 서식하는 중국굴의 패각근의 일반조성분보다 약 2배 이상 높은 구성비를 보였다. 그러나, 가리비류와 키조개류의 패각근의 일반 조성분 비율과는 비슷한 수치를 보였다. 따라서 중국굴의 패각근은 식품으로 이용되고 있는 가리비류와 키조개류의 패각근과 같이 식품으로써 가치가 높음을 시사한다.

중국굴 패각근 지수의 연중 변화를 기초로 하여, 패각근내 일반 조성분의 변화를 중국굴의 산란시기를 기준으로 세 그룹 (산란 전 A, 산란기 B, 산란 후 C)으로 분류하여 분석하였다 (Table 7). 조단백, 조지방과 조회분은 산란기 이후에 감소하는 경향을 보이는 반면, 탄수화물은 산란 후에 약 2% 가량 증가하였다. 가리비류는 패각근에 저장된 탄수화물내 glycogen을 에너지원으로 이용하여 배우자 형성 (gametogenesis)에 이용하며 (Beltrán-Lugo et al., 2006), 가리비 *Pecten maximus*의 패각근내 탄수화물이 소화맹낭보다 2배 이상의 탄수화물 에너지원을 제공한다고 설명하고 있다 (Pazos et al., 1997). 따라서, 중국굴의 생식세포들이 발달하는 성숙기에는 패각근의 탄수화물 에너지원으로 소모되어 감소하고, 산란 활동이 종료되어 회복기에 접어들면서 패각근내 탄수화물 저장이 증가함을 추정할 수 있다. 이러한 경향은 생식소 발달기의 A 그룹의 중국굴 탄수화물 함량이 16.0%인 반면, 산란기와 산란 후의 B와 C 그룹의 중국굴내 탄수화물 함량 17.6%, 18.6%로 증가된 수치에서 확인할 수 있었다.

Table 7 Percentage of proximate composition (mean \pm standard deviation) in the adductor muscle of *Hyotissa hyotis*. 3 replicates were analysed in each group. A, Oysters in pre-spawning stage; B, Oysters in spawning stage; C, Oysters in post-spawning stage

	A	B	C
Protein	69.39 \pm 0.44	67.80 \pm 0.55	68.12 \pm 0.78
Carbohydrate	16.02 \pm 0.22	17.69 \pm 0.95	18.63 \pm 0.91
Lipid	5.52 \pm 0.10	5.83 \pm 0.24	4.54
Ash	9.43 \pm 0.04	8.67 \pm 0.30	8.94 \pm 0.22

Table 8 Proximate composition in adductor muscle of marine bivalves. To, total body, Ad: adductor muscle.

Species	Moisture (%)		Protein (%)		Lipid (%)		Carbohydrate (%)		Ash (%)		Site	Author		
	Total	Adductor	Total	Adductor	Total	Adductor	Total	Adductor	Total	Adductor				
<i>A. ventricosus</i> (diploids)	scallop	wet			10.0–18.0				1.0–17.0		Laguna Rancho Bueno	Ruiz-Verdugo et al. (2001)		
<i>A. ventricosus</i> (triploids)		wet			12.0–17.0				1.0–18.0		Laguna Rancho Bueno	Ruiz-Verdugo et al. (2001)		
<i>P. yessoensis</i>		dried			62.6		1.2		24.7		11.5	Hong Kong	Chung et al. (2002)	
<i>P. maximus</i>		dried			75.0		63.5–84.3		4.0		5.0–22.0	5.7–8.8	Ria de Arousa, Spain	Pazos et al. (1997)
<i>N. subnodosus</i>		dried			77.0		15.1–17.3		0.5		1.8–10.5	1.3–1.5	Bahia Kino, Mexico	Beltrán-Lugo et al. (2006)
<i>A. pectinata</i>	pen shell	wet (dried)			78.8		16.4 (77.4)		1.1 (5.2)		1.9 (8.9)	1.8 (8.6)	Boryeong, Korea	Kim (2008)
<i>A. pectinata</i>		wet (dried)			79.4		15.2 (73.4)		1.4 (6.7)		1.3 (6.4)	2.8 (13.5)	Yeosu, Korea	Kim (2008)
<i>A. pectinata</i>		wet (dried)			81.2		13.8 (73.2)		1.3 (6.9)		1.5 (8.0)	2.3 (12.0)	Jangheung, Korea	Kim (2008)
<i>C. gigas</i>	oyster	dried					40.0–70.0		4.0–6.0		10.0–15.0 (glycogen)		Shandong, China	Liu et al. (2010)
<i>P. fucata mertensii</i>	pearl oyster	wet (dried)			77.3		16.5 (72.7)		1.6 (7.1)		2.7 (11.9)	1.9 (8.4)	Tongyoung, Korea	Kim et al. (2006)
<i>H. hyotis</i>	oyster	dried					15.0–45.0		3.0–6.0		1.0–9.0		Gulf of California	Rodríguez-Astudillo et al. (2005)
<i>H. hyotis</i>		dried			79.9		67.8–69.4		4.5–5.8		16.0–18.6	8.7–9.4	Jeju, Korea	present study

3. 중국굴의 아미노산 성분 분석

3-1. 구성 아미노산

생식 주기를 기준으로 산란 전, 후의 중국굴의 구성 아미노산 변화를 참굴과 강굴을 포함하여 분석하였다. 중국굴의 전체 조직 (whole tissue)내 구성 아미노산의 함량은 생식 전, 후에 관계없이 참굴과 강굴보다 높은 함량을 갖고 있었다 (Table 9). 특히, glutamic acid, aspartic acid와 arginine이 중국굴 전체 조직과 패각근 모두에서 가장 높은 함량을 보였으며, 이 수치는 참굴과 강굴에 비해 약 1.5배 높은 수치이다. Glutamic acid, aspartic acid와 arginine은 참굴의 체조직 또는 패각근내 다량으로 존재하는 구성 아미노산으로 알려져 있으며, 이들 구성 아미노산의 비율 변화는 식품 영양학적 가치 및 품질 특성 규명에 중요한 역할을 하고 있다 (Sakaguchi and Murata, 1989; Choi et al. 2011).

또한, 중국굴의 구성 아미노산 함량은 산란 주기에 따른 변화를 보였다. 산란기에 중국굴의 전체 조직 (whole body)에서 구성 아미노산 함량이 감소한 반면, 패각근의 구성 아미노산 함량은 산란 후에 감소하는 경향을 나타냈다 (Table 9). 산란주기 (산란 전, 산란기, 산란 후)동안 중국굴 패각근내 구성아미노산의 총 함량은 9,586.04–13,068.43 mg/100g의 범위를 보였다. 김 (2008)은 식용으로 이용되고 있는 국내산 키조개 (*Atrina pectinata*)의 구성 아미노산의 총 함량을 분석하여, 13,767–16,382.04 mg/100g로 보고하였다. 이 연구 결과와 비교시, 중국굴 패각근의 구성 아미노산의 총 함량은 키조개 패각근과 비슷한 수준으로 참굴, 강굴과 더불어 중국의 패각근은 식품 및 영양학적으로 가치가 높은 패류임을 시사한다.

3-2. 유리 아미노산

산란주기 (산란 전, 산란기, 산란 후) 변화에 따른 중국굴, 참굴과 강굴의 전체조직 (whole tissue)와 패각근 (adductor muscle)내 유리 아미노산의 함량을 측정하여 Table 10에 정리하였다. 중국굴의 유리 아미노산의 총 함량은 전체 조직이 패각근보다 평균적으로 약 3배정도 높은 함량비를 차지하고 있다. 중국굴의 전체 조직내 유리 아미노산의 총 함량은 산란주기 동안 4,033.64–4,987.77 mg/100g 범위를 나타냈다. 참굴과 강굴의 유리 아미노산 총 함량과 중국굴의 유리 아미노산 총 함량과 비교 시, 중국굴의 유리 아미노산의 총 함량은 참굴의 4,356.30–5,031.02 mg/100g에 비슷한 함량 범위를 보인 반면, 강굴의 유리 아미노산 총 함량 3,095.37–4,663.09 mg/100g 보다 높은 함량비를 보였다.

다양한 유리 아미노산 중, 중국굴의 전체조직과 패각근내 가장 높은 구성 비율을 차지하는 유리 아미노산은 taurine으로 확인되었다. 이 유리 아미노산은 중국굴의 산란 주기에 관계없이 전체 조직 42.6–49.2%, 패각근 26.5–28.4%를 차지하고 있다 (Table 10). 또한, 전체 조직 중국굴의 taurine 함량은 강굴 전체 조직의 taurine보다 약 2–3배 높은 구성비를 갖고 있었다. 일반적으로 taurine은 기능성을 가진 함황아미노산 (sulfur containing amino acids)으로 맛에는 관여하지 않으나, 칼슘, 삼투압, 뇌 발달 등의 물질대사에 관여하는 기능성 아미노산으로 알려져 있다 (Develin, 2002). 또한, 식용으로 널리 이용되고 있는 키조개 (*A. pectinata*) (김 2008)와 가리비 (*Nodipecten subnodosus*) (Beltrán-Lugo et al. 2006)의 패각근에서도 높은 taurine 함량비를 차지한다고 설명하고 있다.

Table 9 Total amino acid contents (mg/100 g dry tissue) of *Hyotissa hyotis*, *Crassostrea ariakensis*, and *C. gigas*. Oysters were divided into three groups* (A: before spawning, B: spawning, C: after spawning) and then analyzed. AM: adductor muscle, WT: whole tissue.

Amino acid	A				B				C			
	<i>H. hyotis</i>		<i>C. ariakensis</i>	<i>C. gigas</i>	<i>H. hyotis</i>		<i>C. ariakensis</i>	<i>C. gigas</i>	<i>H. hyotis</i>		<i>C. ariakensis</i>	<i>C. gigas</i>
	AM	WT	WT	WT	AM	WT	WT	WT	AM	WT	WT	WT
Aspartic-acid	1450.38	3445.60	2044.77	2439.78	1384.53	3363.03	2816.54	2904.17	1101.38	3679.75	3182.92	2571.97
Threonine	486.72	1179.74	873.21	967.05	442.67	1217.33	1043.94	1029.32	349.50	1309.71	1174.78	883.56
Serine	483.36	1203.44	758.31	969.35	449.27	1257.88	1072.84	1040.08	318.91	1337.50	1279.94	844.84
Glutamic acid	2374.11	5328.85	2962.90	3389.68	2211.25	5100.92	3851.24	4024.51	1743.39	5733.35	4677.98	3537.11
Glycine	645.51	1832.14	1361.26	1511.06	564.35	1878.91	1715.49	1913.16	513.57	2160.01	2471.92	1545.84
Alanine	797.06	1921.57	1302.67	1478.00	809.47	1882.39	1631.90	1650.52	608.12	2063.31	1986.58	1531.86
Cystine	57.62	226.48	141.01	137.60	46.45	224.12	188.86	174.61	40.37	258.98	235.09	136.10
Valine	506.59	1339.10	903.98	1065.70	468.69	1332.82	1170.91	1168.02	388.92	1446.30	1293.17	1001.42
Methionine	288.94	619.14	321.46	470.40	261.52	663.95	523.20	586.54	204.02	670.36	623.14	507.63
Isoleucine	556.95	1390.69	869.86	1064.43	511.10	1391.27	1171.11	1149.88	400.36	1509.01	1283.23	979.60
Leucine	1107.21	2496.66	1436.35	1750.53	1045.75	2419.91	1964.13	2009.87	842.99	2702.40	2251.68	1682.53
Tyrosine	433.67	1087.11	436.64	608.63	384.31	1016.82	674.73	791.99	274.65	1134.65	878.77	615.39
Phenylalanine	414.60	1096.92	687.59	942.68	387.76	1112.07	979.64	1012.28	280.27	1194.33	1080.80	859.20
Histidine	331.42	873.37	771.32	869.34	284.80	897.24	958.27	878.49	242.53	961.31	992.84	791.81
Lysine	1052.73	2529.81	1505.98	1922.86	976.22	2510.87	2072.30	2169.96	703.18	2668.62	2204.02	1751.36
Ammonia	132.47	404.27	275.04	308.61	122.00	397.20	346.30	346.11	112.15	419.72	372.02	361.12
Arginine	1290.18	3027.91	1611.23	1871.08	1198.46	2944.49	2147.47	2226.61	1045.24	3292.51	2489.74	1812.81
Prolin	656.91	1439.70	1345.35	1635.06	489.75	1449.70	1424.32	1539.23	416.48	1502.08	1695.76	1357.58
Total	13,066.43	31,442.51	19,608.91	23,401.84	12,038.35	31,060.92	25,753.20	26,615.35	9,586.04	34,043.91	30,174.39	22,771.73

*A: before spawning, *H. hyotis*: Dec 2010–Aug 2011, *C. ariakensis*: Jan 2007–Jun 2007, *C. gigas*: Feb 2009–Jun 2009

B: spawning, *H. hyotis*: Sep 2011–Oct 2011, *C. ariakensis*: Jul 2007 and Aug 2008–Sep 2008, *C. gigas*: Jul 2009–Sep 2009

C: after spawning, *H. hyotis*: Nov 2011–Jan 2012, *C. ariakensis*: Oct 2008–Dec 2008, *C. gigas*: Oct 2009–Feb 2010

Table 10 Free amino acid profile (mg/100 g dry tissue) of *Hyotissa hyotis*, *Crassostrea ariakensis*, and *C. gigas*. Oysters were divided into three groups* (A: before spawning, B: spawning, C: after spawning) and then analyzed. AM: adductor muscle, WT: whole tissue.

Amino acid	A				B				C			
	<i>H. hyotis</i>		<i>C. ariakensis</i>	<i>C. gigas</i>	<i>H. H. hyotis</i>		<i>C. ariakensis</i>	<i>C. gigas</i>	<i>H. hyotis</i>		<i>C. ariakensis</i>	<i>C. gigas</i>
	AM	WT	WT	WT	AM	WT	WT	WT	AM	WT	WT	WT
o-Phospho-Serine	—	7.05	77.80	48.60	1.87	22.51	108.85	35.47	3.23	18.55	238.95	47.66
Taurine	434.67	1,986.56	803.82	1,534.99	363.23	2,184.84	677.31	1,600.90	360.13	2,125.28	1,103.94	1,643.55
o-phosphoethanolamine	0.00	—	30.21	37.83	5.16	—	24.72	33.48	—	—	27.67	24.37
Aspartic-acid	24.30	86.68	41.82	80.01	17.94	100.63	48.86	86.87	17.93	113.99	70.51	122.73
Threonine	6.07	12.06	83.82	43.29	3.92	17.15	14.33	35.20	3.65	15.69	27.40	80.42
Serine	4.94	11.02	48.45	38.54	0.94	8.06	27.39	21.74	1.94	17.89	24.78	53.48
Asparagine	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Glutamic acid	67.24	241.66	206.98	362.12	52.94	259.74	217.06	276.41	54.20	226.72	215.24	342.65
α-Aminoadipic Acid	3.07	9.37	70.01	—	—	46.35	—	20.58	1.08	33.19	27.27	19.52
Glycine	90.46	243.01	343.97	366.43	95.46	346.70	344.57	485.00	111.71	398.64	683.68	421.42
Alanine	99.34	239.77	279.80	329.98	57.12	224.23	230.75	264.37	61.70	226.07	343.79	364.45
Citrulline	—	—	—	—	—	—	—	—	—	12.86	—	—
α-Amino-n-butyric Acid	—	7.29	9.09	4.27	1.12	9.95	—	—	0.42	7.79	5.26	5.28
Valine	7.34	12.69	45.09	—	7.51	23.13	7.11	8.47	3.95	10.56	—	24.94
Cystine	60.25	24.22	20.27	9.22	47.64	111.42	14.25	20.86	41.74	21.93	69.59	27.62
Cystathionine	—	—	16.09	—	—	—	—	—	—	—	—	12.13
Methionine	—	4.69	—	6.96	6.46	24.38	—	—	13.26	7.69	28.77	18.98
Isoleucine	10.83	—	18.20	—	—	21.53	—	—	5.08	—	—	13.01
Leucine	9.55	13.53	45.48	17.18	4.67	25.57	9.89	—	7.50	18.11	—	36.09

Norleucine	—	—	—	—	1.86	—	—	17.20	4.81	—	15.02	—
Tyrosine	—	7.82	9.77	19.81	—	12.08	7.68	16.38	—	20.01	13.58	21.18
Phenylalanine	10.29	17.06	22.07	20.72	12.74	—	13.07	12.12	6.50	28.53	37.67	28.72
Homo-Cystine	—	—	—	—	8.58	—	—	—	—	—	—	—
β -Aminoisobutyric acid	—	212.42	337.00	196.21	22.28	162.84	160.97	—	14.68	201.47	109.19	259.61
γ -Amino-n-butyric acid	—	12.82	25.03	50.82	6.83	14.05	17.22	41.26	—	13.49	14.77	43.11
Histidine	15.54	27.11	54.85	43.88	4.43	19.12	30.57	6.26	10.63	16.42	19.47	—
3-Methyl-Histidine	—	—	—	—	2.85	—	—	20.42	—	—	—	54.10
1-Methyl-Histidine	—	—	—	—	—	—	—	—	—	14.55	—	—
Tryptophan	—	—	—	—	—	—	—	—	—	31.09	—	—
Carnosine	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Anserine	151.99	193.24	334.61	196.51	138.73	413.62	263.31	234.14	131.15	422.25	207.90	227.30
Hydroxylysine	10.43	15.32	17.55	10.20	11.12	13.73	11.20	10.11	8.36	12.04	13.35	10.92
Ornithine	10.56	13.95	35.16	18.29	7.88	12.50	31.10	5.96	5.01	20.30	9.36	35.94
Lysine	15.95	32.75	36.73	34.08	9.13	25.66	—	—	11.61	30.77	17.03	—
Ammonia	4.15	10.82	16.26	—	3.56	12.06	5.52	3.43	3.50	14.62	17.78	7.94
Ethanolamine	4.89	17.94	—	93.22	10.25	19.62	92.29	99.09	8.67	—	—	90.96
Arginine	57.47	182.10	144.21	102.04	31.92	141.10	60.01	66.45	39.70	164.33	67.22	121.76
Hydroxyprolin	285.55	14.72	85.99	140.28	253.09	—	125.13	163.67	249.24	79.43	148.12	192.31
Prolin	138.15	375.96	524.86	550.83	156.18	519.98	552.21	788.54	179.86	663.52	1,105.83	678.88
Total	1,523.01	4,033.64	3,784.98	4,356.30	1,347.41	4,792.56	3,095.37	4,374.39	1,361.24	4,987.77	4,663.09	5,031.02

*A: before spawning, *H. hyotis*: Dec 2010–Aug 2011, *C. ariakensis*: Jan 2007–Jun 2007, *C. gigas*: Feb 2009–Jun 2009

B: spawning, *H. hyotis*: Sep 2011–Oct 2011, *C. ariakensis*: Jul 2007 and Aug 2008–Sep 2008, *C. gigas*: Jul 2009–Sep 2009

C: after spawning, *H. hyotis*: Nov 2011–Jan 2012, *C. ariakensis*: Oct 2008–Dec 2008, *C. gigas*: Oct 2009–Feb 2010

4. 중국굴의 지방산 성분

생식 주기에 따른 중국굴, 참굴과 강굴의 지방산 성분비를 측정하여 Table 11과 12에 정리하였다. 포화지방산의 경우, 중국굴의 패각근과 전체조직에서 생식주기에 관계없이 지방산은 16:0과 18:0의 함량비가 가장 높은 구성비를 차지한 반면, 참굴과 강굴의 전체조직에서는 14:0과 16:0의 지방산이 가장 높은 구성비를 차지하였다 (Table 11). 또한, 산란 전과 산란기의 중국굴 전체조직과 패각근내 16:0과 18:0 포화지방산 비율은 참굴과 강굴에 비해 함량이 낮았다.

단일 불포화 지방산의 경우, 중국굴의 16:1과 18:1 지방산 함량이 참굴과 강굴보다 생식주기동안 낮은 함량비를 보였다. 이에 반해, 이중결합의 수가 2개 이상인 다가 불포화 지방산의 함량은 결합수가 많을수록 참굴과 강굴에 비해 함량비가 높았다 (Table 12). 특히, n-3와 n-6 계열의 필수 지방산인 EPA와 DHA의 경우, 참굴과 강굴에 비해 2배 이상 높은 함량을 보였다. 또한, 대부분의 지방산 함량이 전체조직과 패각근에서의 함량이 비슷하였으며 (Table 10, Table 11), DHA의 경우 전체 조직보다 패각근에서의 함량이 높게 조사되었다 (Table 12). n-3와 n-6 계열의 지방산은 필수지방산으로, 체내에서 합성되지 않거나 양이 부족하여 반드시 섭취해야 하는 지방산이다 (최 등 2000). 중국굴 패각근의 DHA와 EPA와 같은 높은 불포화지방산 함량은 가리비류인 *N. subnodosus*와 *Pecten jacobaeus*의 패각근에 존재하는 불포화지방산 함량보다 높은 것을 알 수 있고, *Argopecten ventricosus*와 키조개 (*A. pectinata*) 패각근의 불포화지방산 함량과는 비슷하였다. 따라서 굴, 가리비 및 키조개와 견주어 보았을 때, 중국굴은 식품영양학적으로 우수한 식품원료로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

Table 11 Saturated fatty acid contents (mg/100 g dry tissue) of *Hyotissa hyotis*, *Crassostrea ariakensis*, and *C. gigas*. Oysters were divided into three groups* (A: before spawning, B: spawning, C: after spawning season) and then analyzed. AM: adductor muscle, WT: whole tissue.

		A				B				C							
		<i>H. hyotis</i>		<i>C. ariakensis</i>		<i>H. hyotis</i>		<i>C. ariakensis</i>		<i>C. gigas</i>		<i>H. hyotis</i>		<i>C. ariakensis</i>		<i>C. gigas</i>	
		AM	WT	WT	WT	AM	WT	WT	WT	AM	WT	WT	WT	AM	WT	WT	
Butyric acid	C4:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
Caproic acid	C6:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
Caprylic acid	C8:0	0.05	0.00	0.48	0.18	0.06	0.00	0.78	0.06	0.05	0.00	0.10	0.27				
Capric acid	C10:0	0.01	0.00	0.36	0.02	0.01	0.00	0.10	0.03	0.04	0.00	0.10	0.05				
Undecanoic acid	C11:0	0.00	0.00	0.58	0.66	0.00	0.00	1.22	0.41	0.00	0.00	0.35	0.03				
Lauric acid	C12:0	0.07	0.00	0.91	0.54	0.14	0.00	1.28	0.28	0.02	0.00	0.40	0.30				
Tridecanoic acid	C13:0	0.01	0.00	0.61	0.37	0.03	0.00	1.18	0.39	0.03	0.00	0.19	0.36				
Myristic acid	C14:0	10.65	11.63	37.23	98.72	13.35	19.28	65.70	31.54	9.04	11.75	16.17	42.76				
Pentadecanoic acid	C15:0	4.96	6.43	5.14	7.88	6.34	6.24	11.26	5.01	4.93	5.54	2.41	8.26				
Palmitic acid	C16:0	134.05	135.28	185.42	393.94	175.82	159.10	386.73	167.47	127.13	127.93	78.37	242.66				
Magaric acid	C17:0	11.22	12.38	7.89	14.22	15.24	13.29	21.98	10.97	10.88	10.21	3.81	15.99				
Stearic acid	C18:0	32.99	35.28	31.91	10.09	44.08	40.33	21.58	4.46	30.53	32.19	13.34	7.44				
Arachidic acid	C20:0	0.25	0.82	0.86	13.46	0.40	0.46	0.95	0.90	0.01	0.00	0.46	0.16				
Heneicosanoic acid	C21:0	0.01	10.36	0.00	0.07	0.10	12.84	0.00	0.00	0.02	8.64	0.00	0.03				
Behenic acid	C22:0	0.03	15.39	2.64	0.76	0.09	16.08	0.03	0.03	0.03	10.15	0.02	0.07				
Tricosanoic acid	C23:0	0.05	0.21	0.00	0.03	0.83	0.00	0.18	0.15	0.02	0.00	0.01	0.02				
Lignoceric acid	C24:0	0.03	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.02	0.00				

*A: before spawning, *H. hyotis*: Dec 2010–Aug 2011, *C. ariakensis*: Jan 2007–Jun 2007, *C. gigas*: Feb 2009–Jun 2009

B: spawning, *H. hyotis*: Sep 2011–Oct 2011, *C. ariakensis*: Jul 2007 and Aug 2008–Sep 2008, *C. gigas*: Jul 2009–Sep 2009

C: after spawning, *H. hyotis*: Nov 2011–Jan 2012, *C. ariakensis*: Oct 2008–Dec 2008, *C. gigas*: Oct 2009–Feb 2010

Table 12 Unsaturated fatty acid profile (mg/100 g dry tissue) of *Hyotissa hyotis*, *Crassostrea ariakensis*, and *C. gigas*. Oysters were divided into three groups* (A: before spawning, B: spawning, C: after spawning season) and then analyzed. AM: adductor muscle, WT: whole tissue.

		A				B				C							
		<i>H. hyotis</i>		<i>C. ariakensis</i>		<i>H. hyotis</i>		<i>C. ariakensis</i>		<i>C. gigas</i>		<i>H. hyotis</i>		<i>C. ariakensis</i>		<i>C. gigas</i>	
		AM	WT	WT	WT	AM	WT	WT	WT	AM	WT	WT	AM	WT	WT	WT	
Myristoleic acid	C14:1	0.35	0.00	0.51	3.28	0.05	0.00	1.27	0.45	0.22	0.00	0.37	0.32				
cis-10-Pectadecenoic acid	C15:1	0.47	0.00	0.50	0.73	1.24	0.00	0.99	0.97	0.40	0.00	0.11	1.59				
Palmitoleic acid	C16:1	13.79	13.30	47.21	112.38	19.90	22.79	31.68	26.55	11.83	11.90	27.96	36.40				
Magaroleic acid	C17:1	0.84	0.44	4.41	1.38	0.61	2.89	5.80	1.38	0.77	1.07	1.87	1.33				
Oleic, Elaidic acid	C18:1n9c,1n9t	24.98	26.18	96.30	45.03	32.47	31.57	51.18	16.55	22.82	30.98	59.30	45.43				
Eicosenoic acid	C20:1	2.05	2.37	3.67	26.55	1.93	2.83	3.44	20.96	2.84	1.95	2.24	3.93				
Erucic acid	C22:1	16.99	0.00	0.61	0.05	1.98	0.00	0.83	24.45	1.38	0.00	0.06	3.04				
Nervonic acid	C24:1n15c	0.03	0.00	0.25	0.20	0.03	0.00	0.12	0.05	0.03	0.00	0.24	0.03				
Lenoleic acid	C18:2n9c	9.72	12.23	2.75	16.68	13.76	12.75	2.66	4.14	9.13	10.66	2.08	16.91				
Linoleladic acid	C18:2n9t	0.03	0.18	0.00	2.80	0.04	0.00	0.12	0.04	0.08	0.00	0.08	0.00				
Eicosadienoic acid	C20:2	0.59	1.21	0.05	0.85	1.89	0.68	0.03	0.03	1.36	0.51	0.01	0.06				
cis-13,16-Docosadienoic acid	C22:2	2.77	1.20	0.00	1.17	0.03	1.06	0.08	0.81	2.22	0.73	0.03	0.00				
γ-Linolenic acid	C18:3n6,9,12c	1.20	5.45	0.04	0.96	1.52	6.36	0.10	0.31	0.64	4.52	0.10	1.29				
Linolenic acid	C18:3n9,12,15c	8.39	8.56	0.71	16.44	11.14	8.75	1.64	2.21	6.74	6.61	0.51	14.41				
cis-11,14,17-Eicosatrienoic acid	C20:3	0.50	1.46	0.00	0.43	0.96	0.67	0.02	0.02	0.02	0.73	0.00	0.05				
Arachidonic acid	C20:4	11.08	11.02	0.65	6.15	13.21	11.13	0.00	8.32	9.46	9.75	0.97	0.02				
EPA	C20:5	46.23	43.00	5.10	77.15	58.44	45.21	4.85	39.19	33.85	28.02	4.64	51.74				
DHA	C22:6n3	115.62	83.62	2.21	37.73	151.30	74.68	2.23	29.86	108.48	65.18	2.70	33.06				

*A: before spawning, *H. hyotis*: Dec 2010–Aug 2011, *C. ariakensis*: Jan 2007–Jun 2007, *C. gigas*: Feb 2009–Jun 2009

B: spawning, *H. hyotis*: Sep 2011–Oct 2011, *C. ariakensis*: Jul 2007 and Aug 2008–Sep 2008, *C. gigas*: Jul 2009–Sep 2009

C: after spawning, *H. hyotis*: Nov 2011–Jan 2012, *C. ariakensis*: Oct 2008–Dec 2008, *C. gigas*: Oct 2009–Feb 2010

IV. 가시굴의 배발생 및 유생발달

전자 현미경을 이용하여 관찰된 성숙한 가시굴 정자의 형태는 짧은 원추형의 두부와 36.9 um의 긴 편모 (flagellum)을 갖고 있다 (Fig. 46A). 정자 두부의 직경은 1.55 um이며, 상단부의 첨체 (acrosome)와 타원형의 핵 (nuclear), 중편 (mid-piece)의 미토콘드리아 (mitochondria)로 구성되어 있다 (Fig. 46B). 완숙한 가시굴 알은 난막에 둘러싸인 타원형으로, 알의 직경은 46.5 ± 1.4 um의 범위를 나타냈다 (Fig. 45A & 46C). 또한, 성숙한 가시굴 알은 해수에 가라앉는 전형적인 침성란 (demersal egg)의 특징을 보였다.

가시굴의 배 발생 (embryogenesis)은 수정 40분 후에 수정란의 표면에 극체 (polar body)가 형성되면서 시작되었다 (Fig. 45B & 46D). 수정란의 난할은 수정 1시간 10분 후에 시작되었으며, 이 시기의 수정란은 세포의 크기가 비대칭적인 2세포 (2-cell)의 형태를 갖고 있다 (Fig. 45C & 46E). 수정 1시간 40분 후에는 4세포기 (4세포기) (4-cell)의 형태를 갖고 있으며, 이 시기의 세포는 세포의 크기가 비슷한 3개의 난할구 (blastomere)와 세포 크기가 가장 큰 1개의 난할구로 구성되어 있다 (Fig. 45D & 46F). 이 후, 난할구내 세포의 분열이 지속적으로 이루어져 8세포 (8-cell) (Fig. 45E & 46G), 16세포 (16-cell) (Fig. 46H)가 형성되고, 수정 3시간 20분후에 세포 분열이 절정에 이르러 가시굴의 조직 또는 기관 분화를 위한 초기 배인 상실기 (morula)로 분화하였다 (Fig. 45F & 46I). 수정 4시간 50분 후에는 상실기 중앙에 포배강 (blastocoel)이 형성되면서 포배기 (blastula)가 형성되었고 (Fig. 45G), 원구 (blastopore)의 함입 (invagination)과 난할된 할구 표면에 섬모 (cilia)가 생성되는 초기 낭배기 (early gastrula)가 수정 5시간 50분에 관찰되었다 (Fig. 45H & 46J). 수정 1시간 후에는 embryo의 난할 표면 전체에 섬모가 발달하면서, 활동 범위가 작은 나선 또는 구형의 회전 운동을 보이는 후기 낭배기 (late gastrula)로 발달하였다. 특히, 이 시기의 embryo는 활발한 자유 유영활동을 위한 구전섬모환 (protroch)의 발달이 embryo의 상단부에 뚜렷히 관찰되었다 (Fig. 45I & 46K). 활발한 운동성을 갖는 담륜자 유생 (trochophore larvae)은 수정 9시간 30분 후에 관찰되었으며, 이 시기의 embryo는 난할 표면의 구전섬모환 (prototroch)과 정단모 (apical tuft)를 이용하여 해류를 일으키며 해수안을 자유롭게 유영하는 모습이 관찰되었다 (Fig. 45J & 46L).

민 (2004)는 가시굴 (*S. kegaki*)을 포함하여 제주 연안에 서식하는 굴목 (Ostreoida)에 속하는 10종의 굴류를 보고하였다. 가시굴은 다른 굴류와 달리 연안의 암반 조간대에 서식하는 소형 굴류로 우리나라 제주도를 비롯하여 아열대 지역의 인도-서태평양, 중국 남부와 일본 혼슈 지역에 분포하는 아열대 종이다. Kim et al. (2010)은 제주 남부 연안에 서식하는 가시굴의 연중 생식주기를 조직학적 관찰을 실시하여, 수온 범위가 24.6–26.7°C를 보이는 여름철인 7월부터 8월까지가 주 산란기이며, 완숙한 알의 크기는 36.9 ± 5.7 um라고 보고하였다. 이와 비슷하게, 일본 와카야마 (Wakayama)현과 시즈오카 (Shizuoka)현에 서식하는 가시굴을 이용하여 초기 배발생 (early embryogenesis)에 관여하는 유전자들의 발현 특성 규명에 사용된 가시굴 수정난의 크기는 40 um 였다 (Kakoi et al. 2008). 이 연구에 사용된 제주 북부 연안에 서식하는 가시굴은 Kim et al. (2010)의 보고와 같이 8월에 암, 수 개체의 완전한 성성숙이 이루어지고 있음을 확인하였다.

이매파류의 정자는 형태학적으로 표준형 정자 (primitive type)에 속하며, 두부의 뾰족한 첨체와 타원형의 핵, 미토콘드리아가 위치하는 중편 (mid-piece)과 한 개의 긴 편모를 가지는 미부 (tail)로 구성되어 있다 (Franzan, 1983). 특히, 굴과 (Ostereidae)에 속하는 굴류의 정자 형태는 첨체의 모양, 핵의 형태 (구형, 타원형, clyinder형)과 중편의 미토콘드리아 수에 따라 구별된다. *Crassostrea* 속에 속하는 굴류의 정자 형태는 모자형의 첨체, 구형의 핵과 4개의 미토콘드리아를 갖고 있다 (Yurchenko, 2012). 이와 달리, *Saccostrea* 속에 속하는 호주굴 (*Saccostrea commercialis*)의 정자 형태는 *Crassostrea* 속과 아주 유사하지만, 첨체의 미세구조에서 *Crassostrea* 속의 정자 형태와 구별된다고 설명하였다 (Healy and Lester, 1990). 따라서, 제주도 연안에 서식하는 가시굴의 정자의 외부 형태는 굴과 (Ostreidea)에 속하는 굴류의 정자 형태와 유사하지만, 종 특이적 특징을 결정하는 첨체의 미세구조에 대한 상세한 연구가 필요하다.

굴목 (Ostreoida)에 속하는 이매패류의 초기 배발생 (early embryogenesis)는 12시간 내에 완료되며, 형태변화가 일어나는 D-shaped larvae로의 분화는 24시간 이내에 이루어진다 (Table 13). Crassostrea 속에 속하는 참굴 (*C. gigas*)의 경우, 21–22°C 환경하에서 수정난에서 담륜자 유생까지 10시간, D-상 유생까지 약 24시간이 소요된다고 설명하였다 (Hur and Hur, 2000). 이와 유사하게, Mangrove oyster (*C. madrasensis*)의 초기 배 발생 소요시간도 수정난에서 담륜자 유생기가 6시간 30분–13시간 50분, D-상 유생까지 18시간–24시간으로 보고하였다 (Samuel, 1983). 가시굴 (*S. kegaki*)의 경우, Kakoi et al. (2008)은 27°C 환경에서 수정난에서 D-상 유생까지 18시간이 소요됨을 보고하였다. 또한, 가시굴과 같은과에 속하는 *S. cucullata*의 초기 유생발달에 관한 연구에서도 담륜자 유생까지 10–12시간이 소요됨을 보고하였다 (Table 12) (Kalyanasundaram and Ramamoorth, 1987). 따라서, 제주도 연안에 서식하는 가시굴의 초기 배 발생 단계 및 소요 시간은 굴목 (Ostereoida)에 속하는 굴류의 초기 배 발생 단계에 유사한 경향을 나타냈다. 이 연구 결과는 향후 기화 변화에 따른 해양 이매패류의 번식, 생태 및 생활사 규명에 유용한 자료로 활용될 것으로 사료된다.

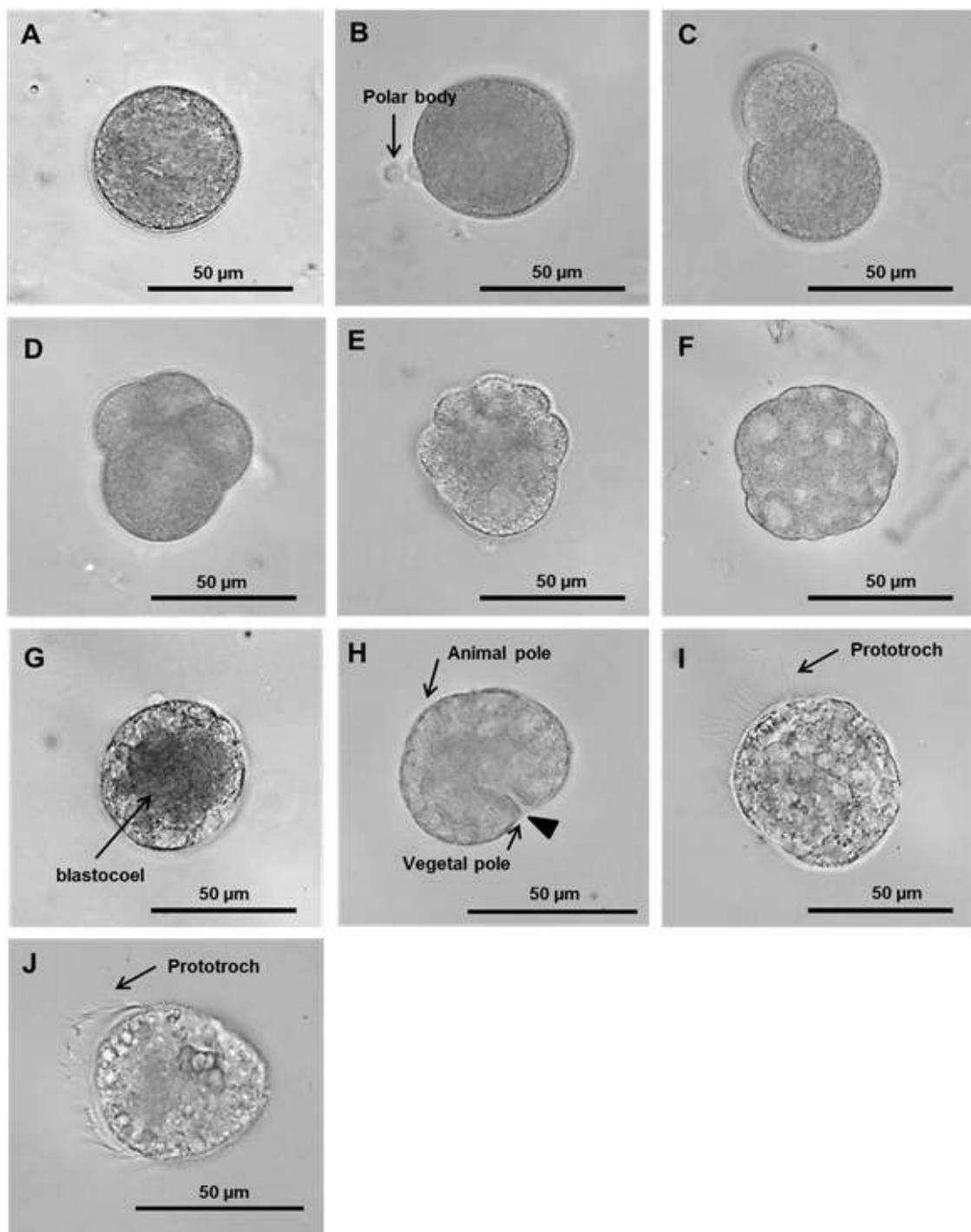


Fig. 45. Photographs of *Saccostrea kegaki* in different development stages. (A) ripe egg, (B) fertilized egg (40 min), (C) 2 cell (1h 10 min), (D) 4 cell (1h 40 min), (E) 8 cell (2h 10 min), (F) morula (3h 20 min), (G) blastula (4h 50 min), (H) early gastrula (4h 50 min), (I) late gastrula (7h), (J) trocophore larvae (9h 30 min).

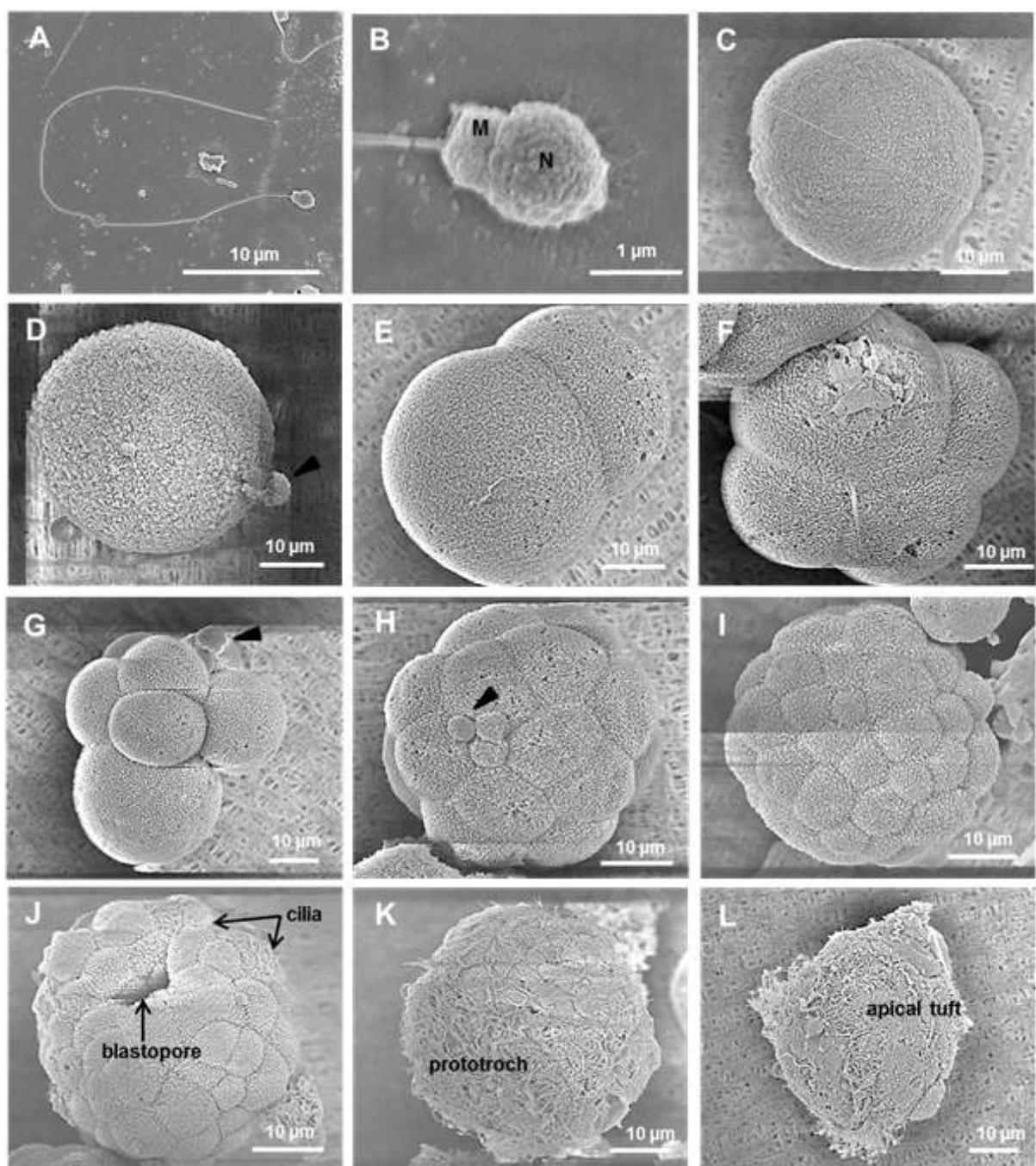


Fig. 46. SEM (scanning Electron Microscopy) ultrastructure of *Saccostrea kegaki* in different development stages. (A) Spermatozoa (ripe sperm), (B) Enlarged ripe sperm (C) ripe egg, (D) fertilized egg with pole body (arrow) (40 min), (E) 2 cell (1h 10 min), (F) 4 cell (1h 40 min), (G) 8 cell with pole body (arrow) (2h 10 min), (H) 16 cell with pole body (arrow) (2h 50 min), (I) morula (3h 20 min), (J) early gastrula (4h 50 min), (K) late gastrula (7h), (L) trochophore (9h 30min).

Table 13 Larval development of oyster reported from different studies.

	Samuel (1983)	Kalyanasundaram & Ramamoorthi (1987)	Hur and Hur (2000)	Kakoi et al. (2008)	Present study
Species	<i>Crassostrea madrasensis</i>	<i>Saccostrea cucullata</i>	<i>Crassostrea gigas</i>	<i>Saccostrea kegaki</i>	<i>Saccostrea kegaki</i>
Temperature (°C)		28–29	21–22	27	24
Salinity (psu)		32–34		—	32.1
Egg size (μm)		40		40	47.5–49.6
Fertilized egg	30 min	40–45 min	30 min	60 min	40 min
2 cell	40 min	1 h 40–50 min	1 h 10 min	1h 10min	1 h 10 min
4 cell	50 min	—	2 h	—	1 h 40 min
8 cell	60 min	—	2 h 45 min		2 h 10 min
16 cell		—	3 h 20 min		2 h 50 min
Morula		—	4 h 20 min	—	3 h 20 min
Blastula	1 h 50 min–3 h	—	5 h	—	4 h 50 min
Gastrula	5 h 50 min–6 h 30 min	5 h	7 h	—	7 h
Trochophore	6 h 30–13 h 50 min	10–12 h	10 h	—	9 h 30 min
D-larvae	18 h – 24 h 30 min	20–25 h	23 h 55 min	18 h	—

V. 우리나라 굴의 유전학적 유연관계 분석 및 gene marker 개발

1. SSU rDNA

제주도를 포함한 우리나라 연안에 서식하는 7종 굴류의 핵내 유전자인 SSU rDNA을 PCR 증폭시, 약 1.8 kb의 단일 DNA fragment가 증폭되었다. 클로닝 과정을 거쳐 결정된 완전한 염기서열 길이, GC 비율과 염기서열 상동성을 정리하여 Table 14에 나타내었다. 7종 굴의 SSU rDNA의 염기서열의 길이는 1746–1750 bp, GC 비율은 49–51%의 범위를 나타났다. 각 종별 SSU rDNA 염기서열에 대한 특징을 살펴보면, *Crassostrea* 속(genus)에 속하는 강굴 (*C. ariakensis*), 참굴 (*C. gigas*), 바윗굴 (*C. nippona*)과 버지니아굴 (*C. virginica*)의 SSU rDNA의 길이는 각각 1750과 1749 bp로 각 종별 3개체에서 결정된 염기서열의 길이는 동일한 반면, 종별 개체내 염기서열간 substitution(치환)이 확인되었다. 또한, GenBank database에 등록되어 있는 유전자들에 대한 우리나라 굴류의 SSU rDNA에 대한 염기서열 유사성을 BLAST N 프로그램을 이용하여 검색하였다. 그 결과, *Crassostrea* 속의 강굴, 참굴과 바윗굴은 일본산 참굴의 SSU rDNA (*C. gigas*: AB064942)에 99.4–99.8%, 버지니아 굴은 버지니아굴의 SSU rDNA (X60315)에 99.3–99.4%의 높은 유사성을 나타내었다. *Ostrea* 속(genus)에 속하는 태생굴 (*O. circumpecta*)의 SSU rDNA는 1749 bp로 *Ostrea* 속의 유럽굴 (*O. edulis*: L49052)의 SSU rDNA에 각각 98.1–98.3%의 유사성을 나타냈다. *Saccostrea* 속(genus)의 가시굴 (*S. kegaki*)의 SSU rDNA의 길이는 1746–1747 bp이며, 일본산 참굴의 SSU rDNA (AB064942)에 98.5–98.6%의 유사성을 보였다. *Hyotissa* 속(genus)에 속하는 중국굴 (*H. hyotis*)의 SSU rDNA는 1749 bp이며, 일본산 참굴 (*C. gigas*; AB064942)의 SSU rDNA에 98.5–98.6%의 유사성을 보였다.

Table 14 Nucleotide length, GC content and sequence similarity of the small subunit rDNA genes determined in 7 oyster species

Species	Number of individuals	Nucleotide length	Similarity (Accession number)	
		(GC content, %)		
<i>C. ariakensis</i>	3	1750 (50%)	99.8%	(AB064942: <i>C. gigas</i>)
<i>C. gigas</i>	3	1750 (50%)	99.7–99.9%	(AB064942: <i>C. gigas</i>)
<i>C. nippona</i>	3	1750 (50%)	99.4–99.7%	(AB064942: <i>C. gigas</i>)
<i>O. circumpecta</i>	3	1749 (51%)	98.1–98.3%	(L49052: <i>O. edulis</i>)
<i>H. hyotis</i>	2	1746 (49%)	99.2–99.3%	(AB389633: <i>H. numisma</i>)
<i>S. kegaki</i>	3	1746–1747 (50%)	98.5–98.6%	(AB064942: <i>C. gigas</i>)
<i>C. virginica</i>	3	1749 (50%)	99.3–99.4%	(X60315: <i>C. virginia</i>)

7종 굴류의 SSU rDNA를 이용하여 이들간의 유전학적 유연관계를 분석하여 Fig. 47에 나타내었다. 우리나라 연안에 서식하는 7종 굴의 SSU rDNA는 유전적으로 *Ostereidae* 과(family)와 *Gryphaeidea* 과(family)로 나뉘어지고 있다. *Ostreidea* 목에는 강굴, 참굴, 바윗굴과 버지니아굴이 *Crassostrea* 속에 포함되며, 태생굴은 *Ostrea* 속, 가시굴은 *Saccostrea* 속, *Gryphaeidea* 목의 중국굴은 *hyotissa* 속으로 구분되었다. 특히, *Crassostrea* 속은 *Ostrea* 속과 *Saccostrea* 속과 sister clade로 가까운 유연관계를 보이며, *Crassostrea* 속의 강굴과 바윗굴의 SSU rDNA 상에 유전적으로 동일 clade에 속하였다. 또한, 버지니아 굴의 경우, 우리나라 강굴, 참굴, 바윗굴과는 독립된 clade를 형성하고 있다 (Fig. 47).

현재까지 굴과 (*Osteridae*)의 유전학적 연구에 대한 정보는 GenBank를 비롯한 여러 데이터베이스에 SSU rDNA에 대한 정보는 주요 상업종인 참굴 (*C. gigas*)과 버지니아 굴 (*C. virginica*)에 대하여만 밝혀졌으며, 이외의 종에 대한 정보는 거의 없는 실정이다. 따라서, 이번 연구를 수행하여 버지니아 굴을 포함하여 우리나라

라 연안에 서식하는 7종 굴에 대한 SSU rDNA의 유전정보를 새롭게 획득하였으며, 핵내의 단백질을 합성하는 ribosome에 높은 보존성을 갖고 있는 SSU rDNA gene을 이용한 계통분류학적 유연관계 분석은 이매패류(굴, 바지락 등)의 분류학적 난점을 해결할 수 있는 유용한 정보로 이용될 수 있음을 확인하였다.

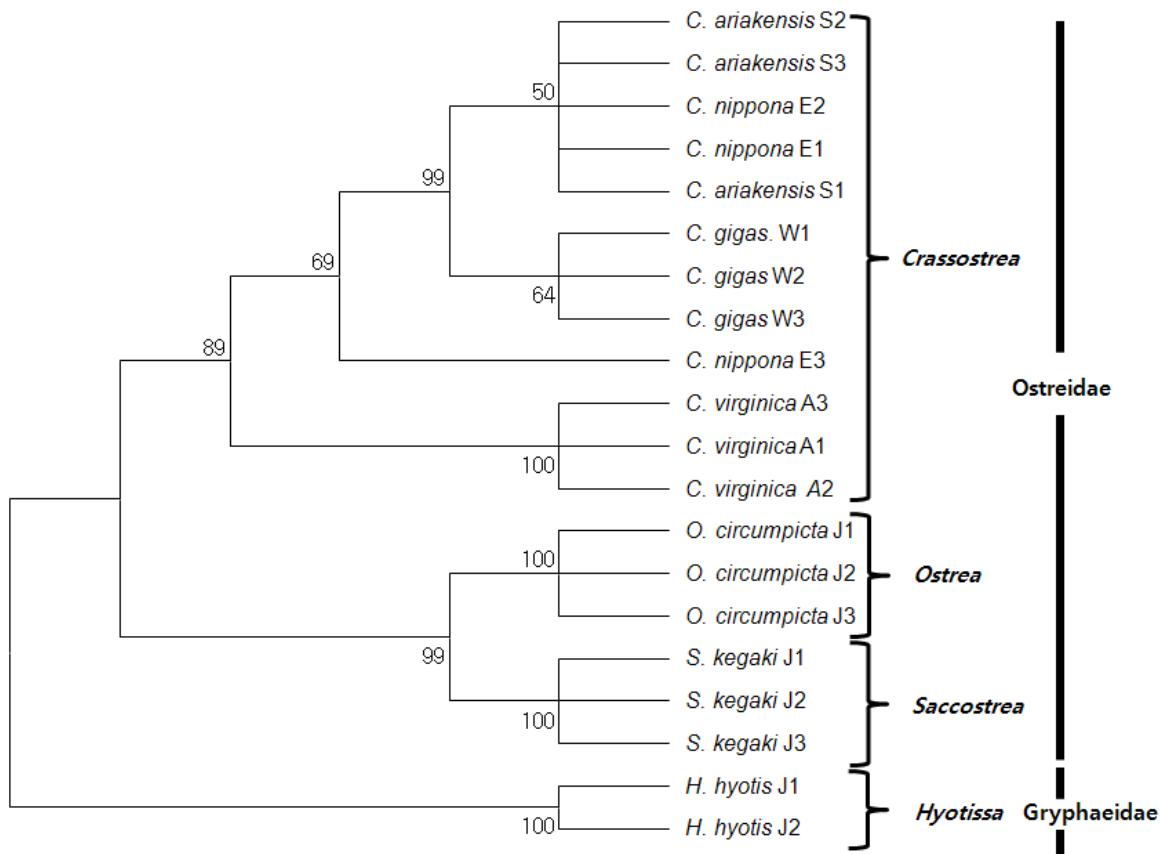


Fig. 47. Neighbor-joining tree inferred from SSU rDNA sequences of 7 oyster species determined in this study. Bootstrap values > 50% are shown at nodes.

2. ITS

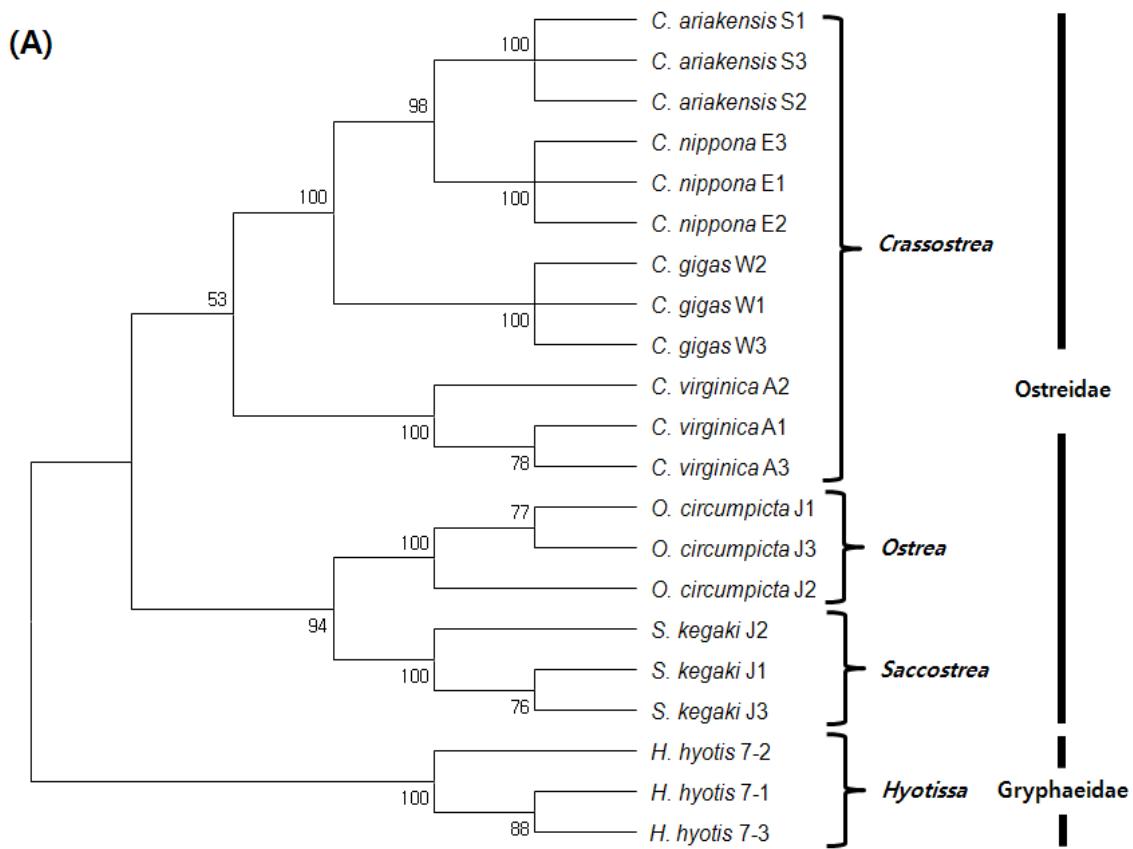
7종의 굴류에서 증폭된 ITS region의 산물은 약 1–1.4 kb의 단일 DNA fragment로, 클로닝 과정을 거쳐 완전한 염기서열을 결정하였다. 각 종별로 결정된 ITS 염기서열의 길이는 998–1361 bp로 그 크기가 종에 따라 ITS region의 길이가 다양하였다. ITS region 서열내에는 86 bp의 SSU rDNA, 71bp의 LSU rDNA 서열이 ITS 염기서열의 5'과 3' 영역, ITS1과 ITS 2 사이에 158 bp의 5.8S rDNA가 잘 보존되어 있었다. 7종 굴의 ITS1과 ITS2 염기서열 길이와 GC content를 Table 15에 나타내었다.

7종 굴의 ITS1과 ITS2 서열은 340–515 bp, 399–537 bp, GC content는 55–60%, 53–62%까지 종에 따라 그 크기가 다양함이 확인되었다. *Crassostrea* 속의 강굴, 침굴, 바위굴과 베지니아 굴, *Saccostrea* 속의 가시굴의 ITS1과 ITS2 영역은 종에 따라 그 길이가 다르며, ITS2 영역이 ITS1 영역보다 상대적으로 더 많은 염기서열을 갖고 있다. 그러나, 태생굴과 중국굴의 ITS1과 2 영역의 염기서열 길이는 거의 동일하였다.

Table 15 Nucleotide length, and GC content of ITS regions determined in 7 oyster species

Species	No. of individuals	ITS1		5.8S		ITS2	
		Length(bp)	GC(%)	Length(bp)	GC(%)	Length(bp)	GC(%)
<i>C. ariakensis</i>	3	470-472	58-59	158	56	472-473	55
<i>C. gigas</i>	3	449-452	57	158	56	535-537	53-54
<i>C. nippona</i>	3	514-515	57	158	56	531	55
<i>O. circum picta</i>	3	400	59-60	158	56	399-400	62
<i>H. hyotis</i>	3	340-343	53	158	56	342	55-56
<i>S. kegaki</i>	3	426-429	55	158	56	475	59
<i>C. virginica</i>	3	432-433	58	158	56	506-512	56-57

ITS1과 ITS2 영역의 서열을 이용하여 7종 굴의 유전학적 유연관계를 살펴본 결과, ITS1과 ITS2 영역 모두에서 7종의 굴은 Ostreoidea (superfamily)의 두 개의 family인 Ostreidae와 Gryphaeidae로 구분되었다 (Fig. 48A &48B). SSU rDNA 결과와 마찬가지로, 태생굴과 가시굴의 ITS 영역에서도 유전적 유연관계가 가까웠다 (bootstrap value 94%: ITS1, 100%: ITS2). 이와 달리, *Crassostrea* 속의 굴류에서는 ITS1과 ITS2 유전자들 사이의 유연관계가 상이하였다. ITS1에서는 강굴과 바위굴이 유전학적으로 유연관계가 가깝고, 참굴과는 sister branch를 형성한 반면, ITS2에서는 참굴과 바위굴이 유전학적으로 유연관계가 가까우며, 강굴과는 sister branch를 형성하는 특징을 나타내고 있다.



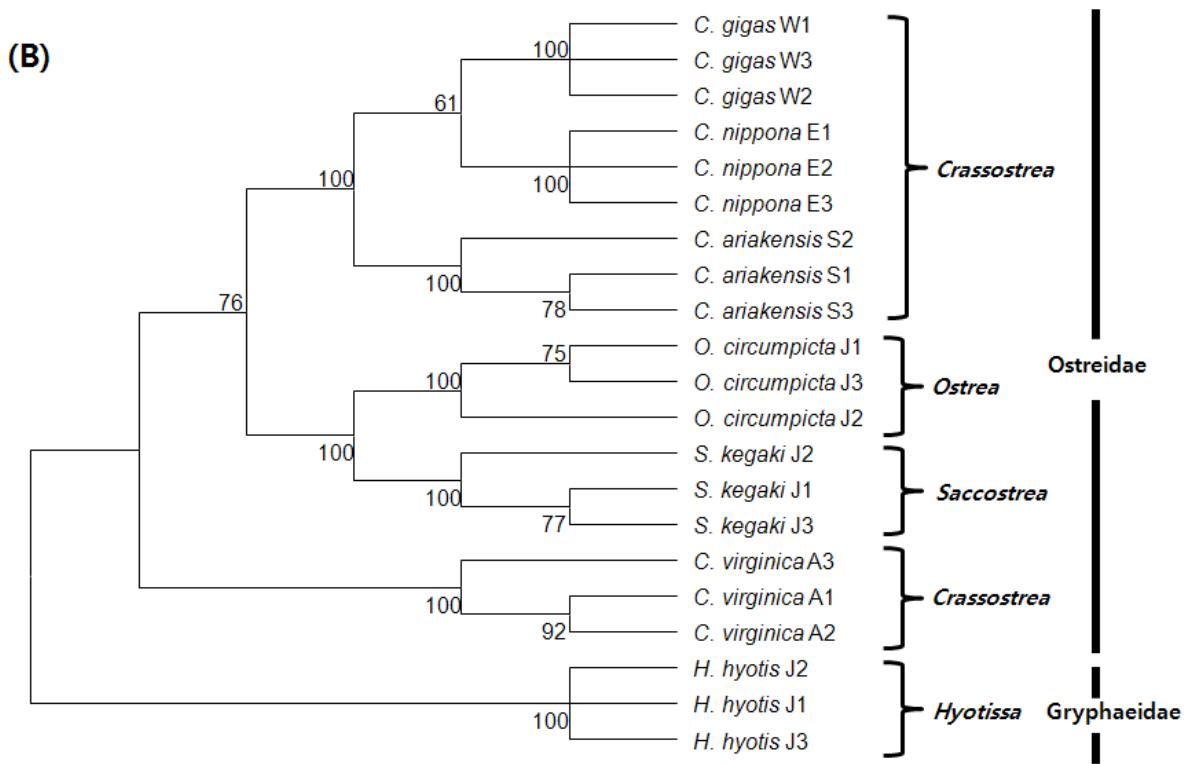


Fig. 48. Neighbor joining tree inferred from ITS regions of 7 oyster species determined in this study. (A) ITS1 and (B) ITS2. Bootstrap values $> 50\%$ are shown at nodes.

ITS1과 ITS2는 핵내 ribosome의 SSU rDNA와 LSU rDNA 사이에 위치하며, rDNA 유전자가 높은 유전적 보전성을 보이는 반면에 ITS 영역의 서열은 진화학상 빠른 유전적 염기 변이를 갖고 있어 속 (genus) 또는 종 (genus) 구별을 위한 유용 유전자로 이용되고 있으며 이들 서열을 이용하여 종 특이적 (species-specific) marker가 일부 이매패류에서 개발되고 있다 (Reece et al. 2008).

3. COI

제주도를 비롯한 우리나라 연안에 서식하는 굴류의 mitochondrial gene의 하나인 COI 유전자를 증폭하여, 완전한 염기서열을 결정하여 Table 16에 정리하였다. 중국굴의 경우, 두 가지의 COI primer set을 이용하여 PCR을 시도하였으나, 증폭산물이 생성되지 않아 클로닝에 실패하였다. 중국굴을 제외한 6종 굴류의 COI 유전자의 길이는 바위굴이 935 bp인 반면, 나머지 5종 굴의 COI 유전자의 길이는 700 bp로 동일한 길이를 갖고 있다. Crassostrea 속의 강굴, 참굴, 바위굴과 버지니아 굴은 GenBank에 등록되어 있는 각각의 종에 대하여 99.6–100%의 염기서열 상동성을 보였다. 이에 반해, 태생굴의 COI 유전자는 *O. chilensis*에 82.5%의 상동성, 가시굴은 *S. cucullata*에 98.7–99.1%의 상동성을 보였다.

6종 굴류의 COI 서열을 아미노산 서열로 변환하여, 유전적 유연관계를 분석하였다 (Fig. 49). 그 결과, 바위굴과 강굴의 COI 아미노산 서열은 SSU rDNA 서열과 마찬가지로 유전적으로 유연관계가 가까워 단일 계통군을 형성하고 있었다. 이에 반해, 참굴과 바위굴은 Crassostrea 속에서 단일 계통군을 형성하면서, 바위굴과 강굴에 sister clade 관계를 나타내고 있다. 또한, Crassostrea 속은 Ostrea 속과 Hyotissa 속과 구별된 single

clade를 형성하고 있다.

Reece et al. (2008)은 동남 아시아에 서식하는 *Crassotrea* 속에 속하는 9종의 굴류에 대한 유전적 유연관계를 규명하기 위해 COI 유전자를 이용하여 비교하였다. 그 결과, *Crassostrea* 속에 속하는 굴류는 유전적으로 매우 근접한 유연관계를 갖고 있으며, *Crassotrea* 속의 single clade를 생성한다고 설명하고 있다. 마찬가지로, 제주도 및 우리나라 연안에 서식하는 강굴, 바윗굴과 참굴은 *Ostrea* 속과 *Hyotissa* 속과 구별되며, *Crassostrea* 속에 각각의 clade를 형성하고 있다. 따라서, COI 유전자를 이용한 굴류의 유전적 유연관계 분석에 유용한 marker임을 시사한다.

Table 16 Nucleotide length, and sequence similarity of COI determined in 6 oyster species

Species	Number of individuals	Nucleotide length (amino acids, aa)	Similarity (Accession number)
<i>C. ariakensis</i>	3	700 bp (226 aa)	99.6% (YP002860234: <i>C. ariakensis</i>)
<i>C. gigas</i>	3	700 bp (226 aa)	100% (AAG36948: <i>C. gigas</i>)
<i>C. nippona</i>	2	935 bp (310 aa)	99.7% (HM015198: <i>C. nippona</i>)
<i>O. circum picta</i>	1	700 bp (226 aa)	82.5% (JF3.1917: <i>O. chilensis</i>)
<i>S. kegaki</i>	3	700 bp (226 aa)	98.7-99.1% (AAK97451: <i>S. cucullata</i>)
<i>C. virginica</i>	2	700 bp (226 aa)	99.6% (YP254649: <i>C. virginica</i>)

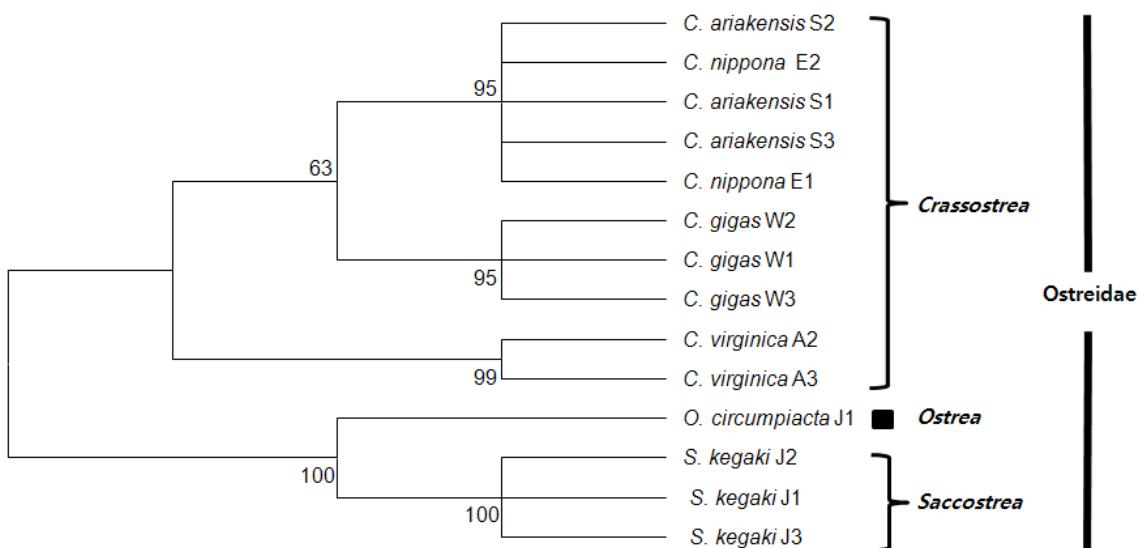


Fig. 49. Neighbor joining tree inferred from COI of 6 oyster species determined in this study. Bootstrap values > 50% are shown at nodes.

4. H3

7종 굴류에서 증폭된 H3 유전자는 크기가 약 400 bp의 단일 DNA fragment가 확인되었고, 이 단편을 클로닝하여 완전한 염기서열을 결정하였다. 염기서열 결정된 H3 유전자는 8종 모두 374 bp, 124개의 아미노산 서열을 구성하며, GC 비율은 종에 따라 다양하게 51–56%의 범위로 구성되어 있었다 (Table 17). 이를 서열을 이용하여 데이터베이스에 등록되어 있는 유전자들과의 상동성을 검색한 결과, *Crassostrea* 속의 강굴, 참

굴, 바위굴과 벼지니아굴의 H3 유전자는 벼지니아 굴과 참굴의 H3 유전자에 가장 높은 상동성을 나타내었다. *Ostrea* 속의 태생굴과 벼굴, *Saccostrea* 속의 가시굴은 *Ostrea* 속의 유럽굴 (*O. edulis*)의 H3 유전자에 89.3%의 염기서열 상동성을 나타내었다. *Hyotissa* 속의 중국굴은 중국굴 (*H. hyotis*)에 98%의 상동성을 보였다.

Table 17 Nucleotide and GC content of the H3 determined in 7 oyster species

Species	Number of individuals	Nucleotides (amino acid)	Similarity (Accession number)	
		GC content		
<i>C. ariakensis</i>	3	374(124aa)	53–54%	92.8–94.8% (HQ329250: <i>C. virginica</i>) (HQ009948: <i>C. gigas</i>)
<i>C. gigas</i>	3	374(124aa)	53–54%	92.6% (HQ329250: <i>C. virginica</i>)
<i>C. nippona</i>	3	374(124aa)	54–55%	96.7–96.8% (HQ329250: <i>C. virginica</i>)
<i>H. hyotis</i>	3	374(124aa)	54%	98% (HQ329258: <i>H. hyotis</i>)
<i>S. kegaki</i>	3	374(124aa)	53%	89.3% (AY070151: <i>O. edulis</i>)
<i>C. virginica</i>	2	374(124aa)	56%	98.3% (HQ329250: <i>C. virginica</i>)

H3 유전자를 이용하여 우리나라 굴류의 유전학적 유연관계를 분석하여 Fig. 50에 나타내었다. *Crassostrea* 속의 강굴, 참굴, 바위굴과 벼지니아 굴의 H3 유전자는 각각의 clade를 형성하며, *Ostrea* 속의 태생굴과 *Sassotrea* 속의 가시굴은 *Gryphaeidae*과의 중국굴과 가까운 유연관계를 형성하고 있다. 현재까지 *Ostreidea* family내 histone H3 유전자 서열은 참굴과, 유럽굴의 서열만이 알려져 있으며, 이외의 종에 대한 H3 유전정보는 미비한 실정이다. 따라서, 이번 연구 수행의 결과로 새롭게 획득한 H3 유전자 서열은 SSU rDNA, ITS, COI 서열과 더불어 굴류를 비롯한 해산 이매파류의 기초적인 유전자원 제공 및 유연관계 분석에 유용한 자료로 이용될 것이다.

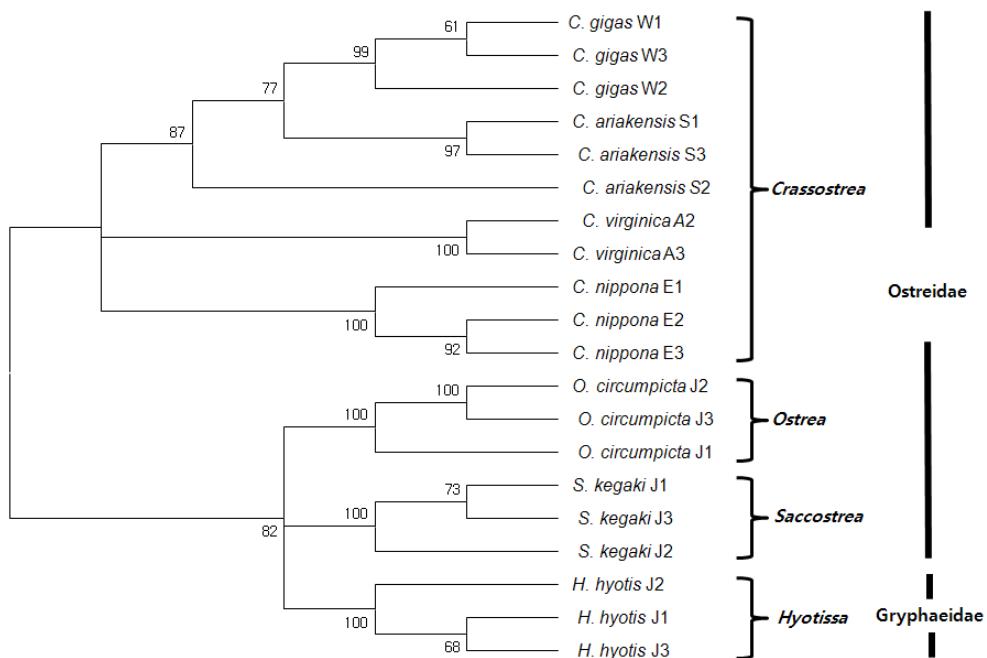


Fig. 50. Neighbor joining tree inferred from H3 gene of 7 oyster species determined in this study. Bootstrap values > 50% are shown at nodes.

4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

년도	연구목표	달성도	관련분야에의 기여도
2011	굴 시료 확보 (제주 연안 가시굴, 중국굴 집단 서식지 및 월별 채집)	80%	제주 연안 서식 굴류(서식지, 분포도, 종)에 관한 기초 자료 제공
	굴류의 혈구면역학적 특성 규명 (제주 연안 가시굴, 중국굴의 혈구 집단 및 면역학적 특성)	100%	폐류 혈구의 면역학적 특성 분석 기술 확립 아열대 굴류의 혈구 면역학적 특성 규명 및 정보 제공
	굴류의 유전자적 특성 규명 (제주연안과 우리나라 굴의 SSU rDNA, ITS, H3 유전자 특성 분석)	100%	폐류의 유전학적 특성 분석법 확립 우리나라 굴류 (7종)의 유전자원 및 유전정보 (SSU rDNA, ITS, H3) 확보 우리나라 굴류의 유전학적 유연관계 정보 제공
2012	굴 시료 확보 (제주 연안 가시굴, 중국굴 집단 서식지 및 월별 채집)	100%	제주 연안 서식 굴류(서식지, 분포도, 종)에 관한 기초 자료 제공
	굴류의 혈구면역학적 특성 규명 (제주연안 서식굴인 가시굴, 중국굴, 태생굴의 혈구 집단 및 면역학적 특성 분석)	100%	아열대 굴류의 혈구 면역학적 특성 규명 및 정보 제공 폐류 혈구의 면역학적 특성 분석 기술 제공
	굴류의 혈구면역학적 특성 규명 (제주연안 서식굴인 가시굴, 중국굴의 계절별 혈구 집단의 면역학적 특성 변화 분석)	100%	아열대 굴류 혈구 집단 변동에 따른 폐류의 번식, 생리 및 생태에 미치는 기초 자료 제공 아열대 굴류의 연중 면역학적 특성 변화 기작 규명
2013	굴류의 생태학적 특성 규명 (제주연안 서식굴인 가시굴, 중국굴의 연중생식주기 및 건강도 분석)	100%	제주 연안 서식굴의 연중 생식주기 규명 제주 연안 서식굴의 생화학 조성분 규명 제주 연안 서식굴의 번식에 관한 기초 자료 제공
	굴의 식품학적 특성 규명 (제주연안 서식굴인 중국굴의 식품영양학적 특성 분석)	80%	제주 연안 서식굴의 식품영양학적 특성 규명 새로운 식용 이매폐류 개발을 위한 영양학적 기초 자료 제공
	굴류의 초기 유생발생 조사 (제주 연안 가시굴의 초기 배발 생 및 유생 관찰)	90%	제주 연안 서식굴의 번식, 생활사 및 생태에 관한 자료 제공 새로운 양식 폐류 개발을 위한 종묘 생산 기술 개발을 위한 자료 제공
	굴의 식품영양학적 특성 규명 (제주 연안 중국굴의 아미노산, 지방산 분석)	100%	제주 연안 서식굴의 식품영양학적 특성 규명 새로운 식용 이매폐류 개발을 위한 영양학적 기초 자료 제공
	굴류의 유전자적 특성 규명 (우리나라 굴류의 COI 유전자 특성 규명)	90%	폐류의 유전학적 특성 분석법 확립 우리나라 굴류 (6종)의 유전자원 및 유전정보 (COI) 확보 우리나라 굴류의 유전학적 유연관계 정보 제공

5. 연구결과의 활용계획

제주도 연안 서식 굴의 번식 주기 규명, 이들의 유전자 및 혈구의 면역능에 관한 연구는 향후 제주도 서식굴의 해양 생태학적 연구 및 굴 양식 산업에 활용하는데 그 목적이 있다. 그리고 이들의 면역학적, 유전학적 특성 분석을 통한 결과는 국내 및 국제 학술대회에서 9회 발표하였다. 또한, 연구 결과를 국제 저명학회지에 3편 이상 발표하였다. 이외에 국제 저명학술지에 1편의 논문을 투고하였으며, 3편 이상의 논문을 발표할 예정 (투고 및 투고 예정 논문 목록 참조)으로, 해양 이매패류 기초 연구 분야에서 학문적 우위를 선점할 것으로 사료된다.

이번 연구는 제주연안 아열대 굴의 번식, 면역 생리 및 분자생물학적 분류에 관한 연구를 수행하여 중국굴과 가시굴의 번식, 면역학적 특징 및 유전학적 유연관계를 구명하였다. 특히, 중국굴의 경우 식용으로 널리 이용되고 있는 가리비와 키조개처럼 패각근의 전체 조직에서 차지하는 비율이 높았으며, 이에 대한 식품 영양학적 특성 분석시 우수한 아미노산과 지방산 성분들의 함유률이 높았다. 그러나, 3년이라는 연구 기간 동안 중국굴을 포함한 제주 연안 서식굴의 번식, 성장에 미치는 환경인자 (먹이, 수온, 염분등)의 영향을 관찰하기 하기에는 연구 기간이 부족하였다. 따라서, 새로운 양식 및 식용 해산 이매패류 개발을 위한 기초 자료를 수집하기 위해 추가적인 생태학적 연구 (분포 현황, 먹이, 수온, 염분, 유생 관찰 등)와 더불어 이를 종을 이용한 가공 식품 및 유용 성분 추출물 생산과 같은 식품, 영양학적 연구가 필요하다.

투고 논문

Comparative study on the hemocytes of subtropical oysters *Saccostrea kegaki* (Torigoe & Inaba, 1981), *Ostrea circumpecta* (Pilsbry, 1904), and *Hyotissa hyotis* (Linnaeus, 1758) in Jeju Island, Korea: morphology and functional aspects

- 원고 완료, Fish and Shellfish Immunology 투고

<요약문>

We first characterized the morphology and immune-related activities of hemocyte in the subtropical oysters including *Saccostrea kegaki*, *Ostrea circumpecta*, and *Hyotissa hyotis* inhabiting in Jeju Island using light microscopy and flow cytometry. Hemocytes in the hemolymph of three oyster species identically classified into three main types: 1) granulocytes containing numerous granules in the cytoplasm, 2) hyalinocytes with no or fewer granules, and 3) blast-like cells characterized by the smallest size and very thin cytoplasm. The percentage of each hemocyte population was similar in all species; hyalinocytes were the most abundant cell in the hemolymph accounting for more than 59%, followed by granulocytes (23–31%) and blast-like cells (3–5%). The size of granulocytes of *S. kegaki* was smaller ($p < 0.05$) than those of *O. circumpecta* and *H. hyotis*. Light microscopy also allowed the description of vacuolated cells characterized by large vacuoles in the cytoplasm. Flow cytometry analysis confirmed that the granulocytes of three oyster species was the major hemocytes engaged in the cellular defense as the largest lysosome content, the most active phagocytosis activity and oxidative activity, as was previously reported in several marine bivalves. Immune-related activity of hemocytes was different between the species. Phagocytic activity was the lowest in *S. kegaki* hemocytes and PMA-stimulated oxidative activity was the lowest in *H. hyotis* hemocytes. Our results provide the basic

information of hemocytes population of three subtropical oysters for further investigations associated with various environmental stress of disease.

<Journal submission report>

Shellfish Immunology

Elsevier Editorial System^(tm) for Fish and

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Comparative study on the hemocytes of subtropical oysters *Saccostrea kegaki* (Torigoe & Inaba, 1981), *Ostrea circumpecta* (Pilsbry, 1904), and *Hyotissa hyotis* (Linnaeus, 1758) in Jeju Island, Korea: morphology and functional aspects

Article Type: Full Length Article

Keywords: *Saccostrea kegaki*; *Ostrea circumpecta*; *Hyotissa hyotis*; Hemocyte; Lysosome; Phagocytosis; Oxidative activity; Jeju Island

Corresponding Author: Dr. Kwang-sik Albert Choi, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Jeju National University

First Author: Hyun-Ki Hong

Order of Authors: Hyun-Ki Hong; Hyun-Sil Kang; Kwang-sik Albert Choi, Ph.D.

Abstract: We first characterized the morphology and immune-related activities of hemocytes in the subtropical oysters *Saccostrea kegaki*, *Ostrea circumpecta*, and *Hyotissa hyotis* using light microscopy and flow cytometry. Hemocytes of these three oyster species were classified into three main types: 1) granulocytes containing numerous granules in the cytoplasm, 2) hyalinocytes with no or fewer granules, and 3) blast-like cells characterized by the smallest size and very thin cytoplasm. The percentage of each hemocyte population was similar in all species; hyalinocytes were the most abundant cell in the hemolymph accounting for more than 59%, followed by granulocytes (23-31%) and blast-like cells (3-5%). The size of granulocytes of *S. kegaki* was smaller ($p < 0.05$) than those of *O. circumpecta* and *H. hyotis*. Light microscopy also allowed the description of vacuolated cells characterized by large vacuoles in the cytoplasm. Flow cytometry analysis confirmed that the granulocytes of the three oyster species were the major hemocytes engaged in cellular defense with the largest lysosome content, and the most active phagocytosis activity and oxidative activity, as was previously reported in several marine bivalves. Phagocytic activity was the lowest in *S. kegaki* hemocytes, and PMA-stimulated oxidative activity was the lowest in *H. hyotis* hemocytes. Our results provide the basic information of hemocytes population of three subtropical oysters for further investigations associated with various environmental disease stresses.

Suggested Reviewers: Philippe Soudant
IUEM Institut Universitaire Européen de la Mer, France
philippe.soudant@univ-brest.fr
Expert in this field.

투고 예정 논문

1. 주사 전자 현미경을 이용한 제주 북부 연안에 서식하는 가시굴 (*Saccostrea kegaki*) (Torigoe & Inaba, 1981)의 초기 유생발달에 관한 연구

- 원고 완료, The Korean Journal of Malacology 투고 예정

<요약문>

제주지역은 쿠로시오 난류의 영향으로 겨울철 수온이 다른 지역에 비해 높으며, 최근 기후 변화에 따른 해수면 수온상승으로 인해 아열대 및 열대성 패류의 유입이 증가되고 있다. 아열대 종에 속하는 가시굴 (*Saccostrea kegaki*)은 중·소형 패류로서 제주지역에 국한되며 서식하며 조간대에 널리 분포하고 있으나, 이 종의 생활사 규명에 관한 기초연구는 아직 부족한 실정이다. 따라서 이 연구는 가시굴 (*S. kegaki*)의 생활사 규명을 위한 기초 연구로 초기유생발달 과정을 관찰하였다. 가시굴은 2012년 8월 제주시 김녕항 ($33^{\circ}33' N$, $126^{\circ}44' E$)내 암반 조간대에서 채집하였고, 성숙한 개체의 생식소 조직으로부터 정자와 알을 채취하여 $24 \pm 1^{\circ}C$ 환경에서 수정시켰다. 수정란의 초기유생발달과정은 시간대 별로 광학 및 주사전자현미경을 이용하여 관찰하였다. 관찰결과, 성숙한 가시굴 알의 크기는 $46.5 \pm 1.4 \mu m$ 였고, 정자의 길이는 $36.9 \mu m$ 로 두부는 실린더 형태를 보였고, 중절부분에는 미토콘드리아가 관찰되었다. 가시굴 수정란 세포분열과 배 발달단계 및 소요시간은 다른 *Saccostrea* sp. 초기유생발달 연구들의 연구결과와 일치하였다. 따라서 가시굴을 비롯한 굴목 (Ostreoidea)에 속해있는 굴의 초기유생발달은 10–12시간 이내에 담륜자 유생으로 발생하는 것으로 사료된다. 종합적으로, 광학 현미경 및 주사 전자현미경을 이용한 가시굴 (*S. kegaki*) 초기유생발달 연구는 향후 아열대 굴의 초기 생활사 규명을 하는데 유용한 자료로 활용 될 것으로 사료된다.

2. Flow cytometric studies on the morphology and immune-related activity of hemocytes in the oyster *Crassostrea nippona* (Seki, 1934).

- 원고 완료, Zoological Studies 투고 예정

<요약문>

We characterized the morphology and immune-related activities of *Crassostrea nippona* hemocytes using flow cytometry and light microscopy. Three different subpopulations were identified in the hemolymph: granulocytes, hyalinocytes, and blast-like cells. Hyalinocytes were the most abundant and intermediate-size cells, while granulocytes were the fewest and the largest cells containing many granules in the cytoplasm. Blast-like cells were characterized by smaller size and very thin cytoplasm. Granulocytes were mainly engaged in phagocytosis and oxidative activities, although the hyalinocytes also exhibited an absence of phagocytosis and extremely low oxidative activity, indicating that these subpopulations are not involved in cell-mediated immune response. The flow cytometry analysis carried out in the present study confirmed that granulocytes are the major hemocytes populations involved in cellular defence in *C. nippona*, as was previously reported in several marine bivalve species.

3. Seasonal variation in condition index, gonad development, digestive tubule atrophy, and hemocyte parameters of the oyster, *Saccostrea kegaki* (Torigoe & Inaba 1981) on the southern coast of Jeju Island, Korea

- 원고 완료, Fish and Shellfish Immunology 투고 예정

<요약문>

Seasonal changes in the condition index (CI), gonad development, digestive tubule atrophy (DTA), and hemocyte parameters (cell counts, mortality, and phagocytosis rate) of the oyster *Saccostrea kegaki* on the southern coast of Jeju Island, Korea, were monitored monthly (February 2011 to January 2012). Gametogenesis of male and female oysters commenced in February and April respectively when the water temperature reached 15.1–15.2°C. Partially-spawned oysters were evident from August to October, when the water temperature ranged from 22.1–22.9°C. The CI, a ratio of tissue dry weight to shell cavity volume, increased gradually from February to Julu and declined dramatically in August. Histology and the CI suggested that *S. kegaki* spawning is continuous from August to January. DTA assessed from histological analysis was higher from February to May when the chlorophyll a level in the surface water was lower. These data suggest that DTA well reflect the nutritional condition of oysters. Hemocytes counts were higher in spring and summer than fall and winter, and were the highest in July when DTA was lower, indicating that cell division occurred when water temperature and food availability were higher. Hemocyte mortality was the highest in September, and the phagocytosis rate dramatically decreased in October, indicating that immune parameters were depressed due to spawning stress. Our data suggest that histological and immunological analyses could be powerful tools for monitoring the physiology of oysters.

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

– 해당 사항 없음

7. 주관연구책임자 대표적 연구실적

번호	논문명/특허명/기타	소속기관명	역 할	논문제재지/ 특허등록국가	논문제재일/ 특허등록일	특기사항 (SCI여부)
1	Development of an immunological probe to quantify reproductive effort in the Suminoe oyster, <i>Crassostrea ariakensis</i> (Gould 1861)	제주대학교	교신저자	Journal of Shellfish Research	2012.12.01	SCI
2	Annual reproductive cycle and reproductive efforts of the Manila clam <i>Ruditapes philippinarum</i> in Incheon Bay off the west coast of Korea using a histology-ELISA combined assay	제주대학교	교신저자	Aquaculture	2012.12.01	SCI
3	First report on the annual gametogenesis of <i>Heteromacoma irus</i> (Hanley, 1845) in a rocky intertidal area, Northern Jeju Island, Korea	제주대학교	교신저자	Journal of Shellfish Research	2011.04.01	SCI
4						
5						

8. 참고문헌

- 장선구, 박성우, 김영길. 2000. 한국산 바지락 (*Ruditapes philippinarum*) 혈구의 분류. 한국어병학회지. 13:129-136.
- 김규나. 2008. 키조개의 생산지역에 따른 영양성분 차이 비교분석. 석사학위논문. 전남대학교. pp. 36.
- 김상해. 1998. 한국산 굴(*Crassostrea gigas*)과 바위굴(*C. nippona*)의 16S rRNA에 대한 미토콘드리아 DNA 염기서열의 비교. 자연과학회지. 2:185-189.
- 민덕기, 이준상, 고동범, 제종길. 2004. 한국패류도감. 570pp.
- 박경일, 박홍식, 김종만, 박영제, 홍제상, 최광식. 2006. 유세포 분석기를 이용한 바지락 (*Ruditapes philippinarum*)의 면역능 측정. 한국수산학회지. 39:123-131.
- 박한도. 2004. Genetic variation of Korean oyster species and sterol composition of phytoplaktons as oyster food. Thesis of Doctor of Philosophy. Pusan National University, pp103
- 유성규. 1979. 천해양식. 세로출판사. 605pp.
- Beltrán-Lugo, A., Maeda-Martínez, A.N., Pacheco-Aguilar, R., Nolaco-Soria, H. 2006. Seasonal variations in chemical, physical, textural, and microstructural properties of adductor muscles of Pacific lions-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*). Aquaculture 258:619-632.
- Beninger, P.G., Lucas, A. 1984. Seasonal variation in condition, reproductive activity and gross biochemical composition of two species of adult clam reared in a common habitat: *Tapes*

- decussatus* L. (Jeffreys) and *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 79: 19–37.
- Chávez-Villalba, J., Mazón-Suástegui, J.M., Osuna-García, M., Robles-Mungaray, M., 2005. Growth of the oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) in Sonora, Mexico, Aquac. Res. 36: 1337–1344.
- Cheng, T.C., 1981. Bivalves. In: N.A. Ratcliffe and A.F. Rowley, Editors, Invertebrate Blood Cells I, Academic Press, London, 233–299pp.
- Choi J-D, Hwang S-M, Kang J-Y, Kim S-H, Kim J-G, Oh K-S. 2012. Food components characteristics of oysters produced in Korea. J. Agri..Life Sci. 46:105–115.
- Choi, K.S., Lewis, D.H, Powell, E.N., Ray, S.M., 1993. Quantitative measurement of reproductive output in the american oysters, *Crassostrea virginica*, using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Aquacult. Fish. Manage.. 24:375–398.
- Choi, K.S., Powell, E.N., Lewis, D.H., Ray, S.M. 1994. Instantaneous reproductive effort in female American oysters, *Crassostrea virginica*, measured by a new immunoprecipitation assay. Biol. Bull. 186:41–61.
- Damiens, G., Mouneyrac, C., Quiniou, F., His, E., Gnassia-Barelli G., Roméo M., 2006. Metal bioaccumulation and metallothionein concentrations in larvae of *Crassostrea gigas*. Environ Pollut. 140:492–499.
- Delaporte, M., Soudant, P., Lambert, C., Jegaden, M., Moal, J., Povreau, S., Dégremont, L., Boudry, P., Samain J-F., 2007. Characterisation of physiological and immunological differences between Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) genetically selected for high or low survival to summer mortalities and fed different rations under controlled conditions. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 353:45–57.
- Develin DM 2002. Textbook of biochemistry with clinical correlations. Wiley-Liss, pp807–808
- Donaghy, L., Kim, B.K., Hong, H.K., Park, H.S., Choi, K.S., 2009a. Flow cytometry studies on the populations and immune parameters of the hemocytes of the Suminoe oyster, *Crassostrea ariakensis*. Fish Shellfish Immunol. 27:296–301.
- Donaghy, L., Lambert, C., Choi, K.-S., Soudant, P. 2009b. Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): Current knowledge and future prospects. Aquaculture 297:10–24.
- Donaghy, L., Hong, H.K., Lambert, C., Park, H.S., Shim, W.J., Choi, K.S. 2010a. First characterisation of the populations and immune-related activities of hemocytes from two edible gastropod species, the disk abalone, *Haliotis discus discus* and the spiny top shell, *Turbo cornutus*. Fish Shellfish Immunol. 28:87–97.
- Donaghy, L., Hong, H.K., Lee, H.J. Jun, J.C., Park, Y.J., Choi, K.S. 2010b. Hemocytes parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* a year after the Hebei Spirit oil spill off the west coast of Korea. Helgo. Mar. Res. 64:349–355.
- Duprat-Bertazzi, G., García-Domínguez, F. 2005. Reproductive cycle of the rock oyster *Hyotissa hyotis* (Linné, 1758) (Griphaeidae) at the La Ballena Island, Gulf of California, México. J. Shellfish Res. 24(4):987–993.
- Fisher, W.S., Oliver, L.M., and Edwards, P. (1996) Hematologic and serologic variability of eastern oysters from Apalachicola Bay, Florida. J. Shellfish Res. 15:555–564.
- Flye-Sainte-Marie, J., Soudant, P., Lambert, C., Le Goïc, N., Goncalvez, M., Travers, M., Paillard, C., Jean, F., 2009. Variability of the hemocyte parameters of *Ruditapes philippinarum* in the field

- during an annual cycle. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 377:1–11.
- Franzan A 1983. Ultrastructural studies of spermatozoa in three bivalves species with notes on evolution of elongated sperm nucleus in primitive spermatozoa. *Gamete Res.* 7:199–214.
- Goedken, M., De Guise, S., 2004. Flow cytometry as a tool to quantify oyster defense mechanisms. *Fish Shellfish Immunol.* 16:539–552.
- Healy J.M., Lester R.J.G. 1990. Sperm ultrastructure in the Australian oyster *Saccostrea commercialis* (Iredale & Roughley) (Bivalvia: Ostreoidea). *J. Molluscan Stu.* 57:219–224.
- Hégaret, H., Wikfors, G.H., Soudant, P., 2003a. Flow-cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation: I Haemocyte type and morphology. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 293:237–248.
- Hégaret, H., Wikfors, G.H., Soudant, P., 2003b. Flow-cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation: II Haemocyte function: aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 293:249–265.
- Hégaret, H., da Silva, P.M., Wikfors, G.H., Lambert, C., De Bettignies, T., Shumway, S.E., Soudant, P., 2007. Hemocyte responses of Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, with varying parasite, *Perkinsus olseni*, severity to toxic-algal exposures. *Aquat Toxicol.* 84:467–479.
- Hur, Y.B., Hur, S.B. 2000. Development and growth of larvae of four bivalve species. *J. Aquac (Korea)* 13:119–128
- Gabbott, P.A. 1976. Energy metabolism. pp. 121–126. In: B.L. Bayne (ed.). *Marine Mussels: Their Ecology and Physiology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Gosling, E. Bivalve molluscs: Biology ecology and culture fishing. New Books, 2003. 443pp.
- Kalyanasundaram, M., Ramamoorthi, K. 1987. Larval development of the oyster *Saccostrea cucullata* (Born). Mahasagar: Bull. Natl. Inst. Oceanogr. 20:53–58
- Kang, C.K., Park, M.S., Lee, P.Y., Choi, W.J., Lee, W.C. 2000. Seasonal variations in condition, reproductive activity, and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in suspended culture in two coastal bays of Korea. *J. Shellfish Res.* 19(2):771–778.
- Kang, D.H., Kim, S.J., Choi, K.S., 2004. Microscopic observations of larval *Ostrea circumpecta* (BIVALVE:OSTREIDAE) in brood chambers. *J. Shellfish Res.* 23:411–415.
- Kang, D.H., Hyun, C.Y., Limpanont, Y., Choi, K.S. 2007. Annual gametogenesis of the chinese anapella clam *Caecella chinesis* (Deshayes 1885) at an upper intertidal sandy beach on the east coast of Jeju, Korea. *J. Shellfish Res.* 26(2):433–441.
- Kang, S.K., Choi, K.S., Alexandrovich Bulgakov, A., Kim, Y., Kim, S.Y. 2003. Enzyme-liked immunosorbent assay (ELISA) used in quantification of reproductive output in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Korea. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 282:1–21.
- Kim, B.K., Kang, D.H., Ko, D.K., Yang, H.S., Kim, D.K., Kang, C.K. and Choi, K.S. 2010. Annual reproductive cycle of the oyster, *Saccostrea kegaki* (Torigoe & Inaba 1981) on the southern coast of Jeju island, Korea. *Invertebra. Reprod. Dev.* 54(1):19–26.
- Kleinman, S., Hatcher, B.G., and Scheibling, R.E. (1996) Growth and content of energy reserves in juvenile sea scallops, *Placopecten magellanicus*, as a function of swimming frequency and water temperature in the laboratory. *Marine Biol.* 124:629–635.
- Klinbunga, S., Khamnamtong, N., Tassanakajon, A., Puanglarp, N., Jarayabhand, P., and Yoosukh, W. 2003. Molecular Genetic Identification Tools for Three Commercially Cultured Oysters (*Crassostrea*

- belcheri*, *Crassostrea iredalei*, and *Saccostrea cucullata*) in Thailand. Marine Biol. 5: 27–36.
- Lambert, C., Soudant, P., Choquet, G., Paillard, C., 2003. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic Vibrios. Fish Shellfish Immunol. 15:225–240.
- Lambert, C., Soudant, P., Dégremont, L., Delaporte, M., Moal, J., Boudry, P., Jean, F., Huvet, A., Samain, J., 2007. Hemocyte characteristics in families of oysters, *Crassostrea gigas*, selected for differential survival during summer and reared in three sites. Aquaculture. 270:276–288.
- Leal-Soto, S., Barraza-Guardado, R., Castro-Longoria, R. 2011. Cultivation of Pen shells: An example with *Atrina Maura* in Northwestern Mexico. J. World Aquacult. Soc. 42(6):789–800.
- Li, Y., Qin, J.G. Li, X. Benkendorff, K. 2010. Assessment of metabolic and immune change in postspawning Pacific oyster *Crassostrea gigas*: identification of a critical period of vulnerability after spawning. Aquaculture Res. 41:155–165.
- Mathieu, M., Lubet, P. 1993. Storage tissue metabolism and reproduction in marine bivalves—a brief review. Invertbra. Reprod. Dev. 23:123–129.
- Ngo, T., Kang, S.G., Choi, K.W., 2002. Seasonal changes in reproductive condition of the Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg) from suspended culture in Gosung BigasKorea. Korean J. Environ. Biol. 20:268–275.
- Ngo, T.T.T., Kang, S.G., Kang, D.H., Sorgeloos, P., Choi, K.S. 2006. Effect of culture depth on the proximate composition and reproduction of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* from Gosung Bay, Korea. Aquaculture 253:712–720.
- Noseworthy, R.G., Koh, D.B., Kang, D.H., Choi, K.S., 2002. Molluscks of the Sungsanilchulbong Area in Jejudo, Korea. Underwater Science and Technology 3:111–124.
- Noseworthy, R.G., Lim, N.R., Choi, K.S. 2007. A catalogue of the mollusks of Jeju Island, South Korea. J. Korean Malacol. 23:65–104.
- Ocaño-Higuera, V.M., Maeda-Martínez, A.N., Lugo-Sánchez, M.E., García-Sánchez, G., Márquez-Ríos, E., Gómez-Jimenez, S., Pacheco-Aguilar, R. 2011. Effect of emerged shipment on the physiological condition of the adductor muscle in adult giant lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus* (Sowerby 1835). Aquac. Res. 42:1087–1095.
- Ó Foighil, D., Taylor, D.J. 2000. Evolution of parental care and ovulation behaviour in oysters. Mol. Phyl. Evol. 15:301–313.
- Park, K.I., Choi, K.S. 2004. Application of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for studying of reproduction in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia) I. quantifying eggs. Aquaculture 241:667–687.
- Park, J.K., Ó Foighil, D. 2000. Sphaeriid and corbiculid clams represent separate heterodont bivalve radiations into freshwater environments. Mol. Phylogenetic. Evol. 14(1):75–88.
- Pazos, A.J., Román, G., Acosta, C.P., Abad, M., Sánchez, J.L. 1997. Seasonal changes in condition and biochemical composition of the scallop *Pecten maximus* L. from suspended culture in the Ria de Arousa (Galicia, N.W. Spain) in relation to environmental condition. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 211(2):169–193.
- Pipe, R.K., Coles, J.A., Thomas, M.E., Fossato, V.U., and Pulsford, A.L. 1995. Evidence for environmentally derived immunomodulation in mussels from the Venice lagoon. Aquatic Toxicol. 32(1):59–73.
- Ruiz, C., Abad, M., Sedano, F., Garcia-Martin, L.O., Sanchez Lopez, J.L. 1992. Influence of seasonal environmental changes on the gamete production and biochemical composition of *Crassostrea*

- gigas* (Thunberg) in suspended culture in El Grove, Galicia, Spain. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 155:249–262.
- Ruiz-Verdugo, C.A., Racotta, I.S., Ibarra, A.M. 2001. Comparative biochemical composition in gonad and adductor muscle of triploid and diploid catarina scallop (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 259:155–170.
- Reece K.S., Cordes J.F., Stubbs J.B., Hudson K.L., Francis E.A. 2008. Molecular phylogenies help resolve taxonomic confusion with Asian *Crassostrea* oyster species. Mar Biol. 153:709–721.
- Rodríguez-Astudillo, S., Villalejo-Fuerte, M., García-Domínguez G., Guerrero-Caballero, Y.R. 2005. Biochemical composition and its relationship with the gonadal index of the black oyster *Hyotissa hyotis* (Linnaeus, 1758) at Espiritu Santo Gulf of California. J. Shellfish Res. 24(4):975–978.
- Royer, J., Ropert, M., Costil, K., 2007. Spatio-temporal changes in mortality, growth and condition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Normandy (France), J. Shellfish Res. 26:973–984.
- Sakaguchi M, Murata M. 1989. Seasonal variations of free amino acids in oyster whole body and adductor muscle. Nippon Suisan Gakkaishi. 55:2037–2041.
- Samuel D. 1983. Early larval development of Edible oyster *Crassostrea madrasensis* (Perston). Proc Symp Coastal Aquaculture 2:483–487.
- Soniat, T.M., Ray, S.M., 1985. Relationships between possible available food and the composition, condition and reproductive state of oysters from Galveston Bay, Texas. Contrib. Mar. Sci. 28:109–121.
- Soria, R.G., Pascual, M.S., Cartes, V.H.F. 2002. Reproductive cycle of the *Cholga paleta*, *Atrina seminude* Lamarck, 1819 (Bivalvia: Pinnidae) from Northern Patagonia, Argentina. J. Shellfish Res. 21(2):479–488.
- Soudant P, C Paillard, G Choquet, C Lambert, HI Reid, A Marhic, L Donaghy, TH Birkbeck. 2004. Impact of season and rearing site on the physiological and immunological parameters of the Manila clam *Venerupis* (= *Tapes*, = *Ruditapes*) *philippinarum*. Aquaculture 229:401–418.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar. S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24:1596–1599.
- Varela E.S., Beasley C.R., Schneider H., Sampaio I., Marques-Silva N. Do S., Tagliaro C.H. 2007. Molecular phylogeny of mangrove oysters (*Crassostrea*) from Brazil. J. Molluscan Stu. 73:229–234.
- Wang, H., Guo, X., 2008. Identification of *Crassostrea* oysters by multiplex species-specific PCR. J. Shellfish Res. 27:481–487.
- Yurchenko, O.V. 2012. Comparative ultrastructure study of spermatozoa in some oyster species from the Asian-Pacific coast. Micron 43:365–373.

9. 연구성과

사업명	핵심개인연구	연구책임자	최광식	주관기관	제주대학교
과제번호	2010-0009352	과제명	제주연안 아열대 굴의 번식, 면역 생리 및 분자생물학적 분류		

과학기술/학술적 연구성과(단위 : 건)															
전문학술지 논문게재				초청 강연 실적	학술대회 논문발표		지식재산권				수상 실적	출판실적			
국내논문		국외논문			국내	국제	출원		등록			저역서	보고서		
SCI	비SCI	SCI	비SCI				국내	국외	국내	국외					
0	0	3	0		0	5	4	0	0	0	1	0	0		

인력양성 및 연구시설(단위 : 명,건)													
학위배출		국내외 연수지원							산학강좌	연구기자재			
박사	석사	장기		단기									
		국내	국외	국내	국외					0	4		
2	1	0	0	0	0					0			

국제협력(단위 : 명,건)						
과학자교류		국제협력기반				학술회의개최
국내과학자 해외파견	외국과학자 국내유치	MOU체결	국제공동연구	국제사업참여	국내	국제
0	0	0	0	0	0	0

산업지원 및 연구성과 활용(단위 : 건)							
기술확산				연구성과활용(사업화 및 후속연구과제 등)			
기술실시계약	기술이전	기술지도	기술평가	후속연구추진	사업화추진중	사업화완료	기타목적활용
0	0	0	0	0	0	0	0

전문학술지 녺문게재 성과정보												
과제번호	제재연월	논문제목	총저자명	출처	학술지명	권(호)	학술지구분	sci 여부	impact Factor	국제공동 연구논문	기여도	
2010-0009352	201104	First report on the annual gametogenesis of <i>Heteromacoma irus</i> (Hanley, 1845) in a rocky intertidal area, northern Jeju Island, Korea	Limpano n t , Yanin; Yang, Hyun-Su n g ; Park, Kyung-Il; Choi, Kwang-S	직접입력	Journal of Shellfish Research	30(1)	국외	SCI 등재	1.04	아니오	100	

			ik;								
2010-0 009352	201210	Annual reproductive cycle and reproductive effort of the Manila clam <i>Ruditapes philippinarum</i> in Incheon Bay off the west coast of Korea using a histology-ELISA combined assay	6	직접입력	Aquaculture	365(2012)	국외	SCI 등재	2.041	아니오	90
2010-0 009352	201212	Development of an immunological probe to quantify reproductive effort in the Suminoe oyster, <i>Crassostrea ariakensis</i> (Gould 1861)	2	직접입력	Journal of Shellfish Research	31(4)	국외	SCI 등재	0.793	아니오	40

학술대회 논문발표 성과정보						
과제번호	발표년월	학술대회명	저자	논문제목	학술대회구분	개최국
2010-000935 2	201011	한국수산과학총연합회 공동 학술대회	김봉규, 강현실, 홍현기, 최광식	우리나라 연안에 서식하는 굴의 유전학적 특성 분석	국내학술대회	대한민국
2010-000935 2	201111	2011년도 한국수산과학총연합회 공동학술발표대회	홍현기, 김봉규, 강현실, 조성환, 최광식	제주도에 서식하는 아열대 굴, <i>Hyotissa hyotis</i> (Linnaeus, 1758)와 <i>Saccostrea kegaki</i> (Torigoe & Ihaba, 1981)의 혈구집단 분류 및 면역력 측정	국내학술대회	대한민국
2010-000935 2	201204	한국패류학회 춘계학술대회	정희도, 홍현기, 강현실, 김대경, 양혜영, 최광식	Reproductive activity and biochemical composition of the oyster, <i>Hyotissa hyotis</i> (Linnaeus 1758) on Jeju Island, Korea	국내학술대회	대한민국
2010-000935 2	201204	한국패류학회 춘계학술대회	홍현기, 박아름이, 강현실, 최광식	Seasonal variation in condition index, gonad development, digestive tubule atrophy, and hemocyte parameters	국내학술대회	대한민국

				of the oyster, <i>Saccostrea kegaki</i> (Torigoe & Inaba 1981) on the southern coast of Jeju Island		
2010-000935 2	201211	2012년도 한국수산과학총연 합회 공동학술대회	홍현기, 정희도, 이희중, 박아름 이, Elmabrouk Moez, 강현실, 최광식	조직학적 방법과 유세 포분석기를 이용한 제 주연안에 서식하는 중 국굴 <i>Hyotissa hyotis</i> (Linnaeus 1785)의 생 리, 번식, 면역학적 특 성 변화의 연중 모니 터링	국내학술대회	대한민국
2010-000935 2	201103	8th IOC/WESTPAC International Scientific Symposium	홍현기, 조성환, 최광식	First characterization of hemocytes and immune-related activities of the oyster <i>Hyotissa hyotis</i> (Linnaeus, 1758) in the southern Jeju, Korea using flow cytometry	국제학술대회	대한민국
2010-000935 2	201104	9th Asian Fisheries and Aquaculture Forum	김봉규, 강현실, 홍현기, 최광식	M O L E C U L A R IDENTIFICATION OF OYSTER SPECIES IN KOREAN WATERS	국제학술대회	중국

학술대회 논문발표 성과정보						
과제번호	발표년월	학술대회명	저자	논문제목	학술대회구분	개최국
2010-000935 2	201111	The 8th International Workshop on the Oceanography & Fisheries Sciences of the East China Sea	홍현기, 김봉규, 강현실, 조성환, 최광식	Characteristics of the populations and immune-related activities of hemocyte from <i>Hyotissa hyotis</i> (Linnaeus, 1758) and <i>Saccostrea kegaki</i> (Torigoe & Inaba, 1981) in Jeju Island, Korea	국제학술대회	일본
2010-000935 2	201212	The Second International Symposium on Manila (Asari) clam	정희도, 홍현기, 강현실, 김대경, 최광식	The annual reproductive cycle and biochemical properties of the gryphaeid oyster, <i>Hyotissa hyotis</i> (Linnaeus 1758) in Jeju, Korea	국제학술대회	대한민국

수상실적 성과정보							
과제번호	수상연월	수상명	수상자		시상기관	시상국가	수상사유
			성명	소속기관			
2010-000935 2	201111	학술발표 우수상	홍현기	제주대학교	한국패류학회	대한민국	"제주도에 서식하는 아열대 물, <i>Hyotissa hyotis</i> (Linnaeus, 1758) 와 <i>Saccostrea kegaki</i> (Torigoe & Inaba, 1981)의 헐구 집단 분류 및 면역력 측정" 주제의 구두발표 우수상

학위배출인력 성과정보							
과제번호	학위취득연월	학위구분	학위취득자				진로
			성명	성별	대학	학과	
2010-00093 52	201108	박사		남성	제주대학교	해양생명과학과	취업(박사후 연구원 포함)
2010-00093 52	201108	석사		남성	제주대학교	해양생명과학과	기타
2010-00093 52	201208	박사		남성	제주대학교	해양생명과학과	취업(박사후 연구원 포함)

연구기자재 구입 성과정보								
과제번호	구입연월	기자재명	규격	수량	제조국	구매금액	활용용도	설치장소
2010-000935 2	201007	マイクロローム		1	독일	12,800,000	조직절편제작	제주대 해양과학대학 4호관 무척추동물 양식연구실
2010-000935 2	201108	Microplate reader		1	미국	2,145,000	흡광도 측정	제주대학교 해양과학대학 4호관 무척추동물 및 양식준비실
2010-000935 2	201207	(PCR)유전자증폭기		1	일본	7,150,000	유전자증폭장치	제주대학교 해양과학대학 4호관 최광식 교수실
2010-000935 2	201209	도립현미경		1	독일	9,700,000	기생충 및 유생 관찰	제주대학교 해양과학대학 4호관 무척추동물 및 양식 준비실

10. 기타사항

- 해당사항 없음

[별첨1]

〈 대 표 연 구 성 과 〉

대표연구업적 요약문			
연구업적 제목	First report on the annual gametogenesis of <i>Heteromacoma irus</i> (Hanley, 1845) in a rocky intertidal area, Northern Jeju Isalnd, Korea		
연구업적 유형	<input checked="" type="checkbox"/> 학술지계재논문(○) <input type="checkbox"/> 저서() <input type="checkbox"/> 역서() <input type="checkbox"/> 특허() <input type="checkbox"/> 국제학회 초청강연() <input type="checkbox"/> 학술지 편집위원 참여() <input type="checkbox"/> 기술이전() <input type="checkbox"/> 기타()		
주관연구책임자 또는 공동연구원 성명	Yanin Limpanont, Hyun-Sung Yang, Kyung-Il Park and Kwang-Sik Choi	참여자수	4

■ 본 과제 수행결과로 인한 대표 연구성과 작성 시 기술내용

The annual reproductive cycle of the Indo-Pacific tellinid clam *Heteromacoma irus* (Hanley, 1845) was investigated, using histology, for the first time in this study. The sex ratio of *H. irus* collected from a rocky intertidal area on the northern coast of Jeju Island, Korea, was found to be 1:1, indicating that *H. irus* is gonochoric. In January, most clams were in the resting phase, although a small number of females showed small oogonia on their follicular epithelium. From February to May, oocyte diameter increased rapidly, and fully mature eggs (44.8–56.8 mm) appeared in May. The first spawning males and females were observed in July, when the water temperature reached 18.0C, and spawning activity continued until the end of August. During September and December, most clams were sexually in the resting stage. *H. irus* is considered to be a summer spawner, and annual gametogenesis was closely associated with the seasonal variation of the surface water temperature. Despite warm water temperatures in Jeju, the resting phase of female and male clams at the study site was prolonged from October to March, suggesting that food availability at this site could be poor and may act as a limiting factor in gametogenesis.

- 주관연구책임자 역할: 교신저자
- 논문 사사: 중견연구자 지원사업 (핵심연구), 과제번호: 2010-0009352

〈 대 표 연 구 성 과 〉

대표연구업적 요약문			
연구업적 제목	Annual reproductive cycle and reproductive effort of the Manila clam <i>Ruditapes philippinarum</i> in Incheon Bay off the west coast of Korea using a histology-ELISA combined assay		
연구업적 유형	학술지 게재논문(○) 저서() 역서() 특허() 국제학회 초청강연() 학술지 편집위원 참여() 기술이전() 기타()		
주관연구책임자 또는 공동연구원 성명	M. Jasim Uddin, Hyun-Sung Yang, Kwang-Jae Park, Chang-Keun Kang, Hyun-Sil Kang, Kwang-Sik Choi	참여자수	6

■ 본 과제 수행결과로 인한 대표 연구성과 작성 시 기술내용

We investigated the reproductive effort of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* during different gametogenic stages with combining histology and immune assay techniques. To determine the level of gonad maturation, 1- to 2-mm-thick slices of the dorso-ventral section were cut from the middle of clams for histology. The quantity of eggs in each clam was determined from the remaining tissue using rabbit anti-clam egg protein IgG in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). At the Begmiri tidal flat in Incheon Bay off the west coast of Korea, clams commenced gametogenesis in February and the first spawning female was observed in July. Clams continued to spawn into October (18.5 °C). The monthly mean gonad-somatic index (GSI), the ratio of egg mass to body weight, ranged from 4.27 (April) to 20.63 (July). The GSI increased rapidly from April (4.3) to May (16.8), peaked in July (20.6), then dropped dramatically from August (14.0) to September (5.5), indicating that clams at the Begmiri tidal flat have a major spawning pulse during August and September. The histology-ELISA combined technique enabled us to assess gametogenic stepwise reproductive efforts of clams because we could simultaneously determine the reproductive stage and quantity of eggs. The GSI of mature females ranged from 20.9 (May) to 26.6 (July), while that of partially spawned clams ranged from 12.8 (June) to 7.2 (September), suggesting that clams discharge as much as 50% of their eggs during the major spawning pulse. Histology revealed that residual eggs in spent clams were resorbed, and that clams may restore approximately 4.6% of their body weight by this energy-recycling process. The histology- ELISA combined technique provided both quantitative and qualitative information about clam reproduction, which is crucial for clam fisheries and aquaculture.

- 주관연구책임자 역할: 교신저자
- 논문 사사: 중견연구자 지원사업 (핵심연구), 과제번호: 2010-0009352

〈 대 표 연 구 성 과 〉

대표연구업적 요약문			
연구업적 제목	Development of an Immunological Probe to Quantify Reproductive Effort in the Suminoe Oyster, <i>Crassostrea ariakensis</i> (Gould 1861)		
연구업적 유형	학술지게재논문(○) 저서() 역서() 특허() 국제학회 초청강연() 학술지 편집위원 참여() 기술이전() 기타()		
주관연구책임자 또는 공동연구원 성명	Bong-Kyu Kim and Kwang-Sik Choi	참여자수	2

▣ 본 과제 수행결과로 인한 대표 연구성과 작성 시 기술내용

A polyclonal antibody specific to an egg protein of the Suminoe oyster, *Crassostrea ariakensis*, was developed to assess reproductive effort. After 2 mo of immunization, rabbit antiserum showed strong specificity to the egg protein in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The rabbit antioyster egg immunoglobulin G detected as little as 0.2 µg/mL of Suminoe oyster egg protein by ELISA. The quantity of eggs present in an oyster was estimated using ELISA and was expressed as a gonadosomatic index (GSI). Gonadosomatic index values of Suminoe oysters were assessed monthly from January to July 2007 at the Seomjin River estuary off the south coast of Korea. Histology indicated that most oysters were mature and ready to spawn by the middle of July. Mean GSI values for oysters collected in April, when most female oysters are in early developmental stages, varied between 0.6% and 14.0%. In July, most oysters were ready to spawn and GSI values ranged from 17.5 - 67.0%, with a mean of 47.7%. The potential fecundity of ripe oysters was determined by dividing the number of eggs, which was estimated by ELISA, by the mean dry weight of a single egg (14 ng); fecundity ranged from 162- 910 million eggs. The immunological technique used in this study was affordable and sensitive enough to measure variation in the number of eggs present among gametogenic stages.

- 주관연구책임자 역할: 교신저자
- 논문 사사: 중견연구자 지원사업 (핵심연구), 과제번호: 2010-0009352