

이학석사 학위논문

감성가자미, *Pleuronectes obscurus* (Herzenstein)의
난발생과 체세포 분열주기

*Egg development and mitotic interval (τ_0) in black
plaice, *Pleuronectes obscurus* (Herzenstein)*

지도교수 박 인 석

2008년 2월

한국해양대학교 대학원

해양생명환경학과

임 수 연

이학석사 학위논문

감성가자미, *Pleuronectes obscurus* (Herzenstein)의
난발생과 체세포 분열주기

*Egg development and mitotic interval (τ_0) in black
plaice, *Pleuronectes obscurus* (Herzenstein)*

지도교수 박 인 석

2008년 2월

한국해양대학교 대학원

해양생명환경학과

임 수 연

본 논문을 임수연의 이학석사 학위논문으로 인준함.

2007년 11월

주 심 최 철 영 (인)

위 원 조 성 환 (인)

위 원 박 인 석 (인)

한국해양대학교 대학원

목 차

	<i>Page</i>
목 차	iii
Abstract	v
List of Tables	vii
List of Figures	viii
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 친어관리 및 종묘생산	4
2. 생식 특성 조사	4
3. 부화, 초기사육 및 관리	5
4. 제 1 난할시간 및 체세포 분열주기(τ_0) 조사	5
5. 난발생 조사	6
III. 결 과	7
1. 생식 특성	7
2. 제 1 난할시간	7
3. 체세포 분열주기(τ_0)	11
4. 난발생 및 부화	13

IV. 고찰	16
V. 국문 요약	19
VI. 감사의 글	20
VII. 참고 문헌	22

*Egg development and mitotic interval (τ_0) in black
plaice, *Pleuronectes obscurus* (Herzenstein)*

by

Soo-Yeon Im

Submitted to

The Department of Marine Bioscience and Environment

Graduate School of Korea Maritime University

(Supervised by In-Seok PARK, Ph. D.)

Abstract

Black plaice, *Pleuronectes obscurus* (Herzenstein), were collected from the coastal areas of Hari, Young-do, Busan, Korea, from February to March 2007 and fertilized in order to observe egg development and temperature-related cleavage rates and mitotic intervals (τ_0).

The fertilized egg is demersal and adhesive, and measuring 0.84 ± 0.010 mm in diameter. The eggs contain no oil globules. After 1 hr 45 min, the blastodisc formed. The 2-, 4-, 8-, 16-, 32- and 64-cell stages were attained in respective times of 2.5, 3.5, 4.5, 5.5, 7.5, and 8.5 hr; the morula stage in 10 hr and the blastula stage in 16 hr. The eggs began the gastrula stage in 20 hr and formed of the embryonic body in 27 hr. The optic vesicles appeared in 44 hr, the auditory vesicles and Kupffer's vesicle in 72 hr. Kupffer's vesicle had disappeared and movements of heart and tail were observed in

90 hr. Hatching took place 121 hr after fertilization at 14°C. The hatched larvae were 3.5±0.16 mm in total length.

The first cleavage stage occurred at 190~195, 160~165, 125~130, 75~80, 60~65 and 45~50 min at 6, 10, 14, 18, 22 and 26°C, respectively. At higher temperatures, eggs developed faster and underwent further identical development. For black plaice, τ_0 were 83.44±3.076, 71.53±3.060, 63.12±2.109, 45.09±2.780, 39.96±2.095 and 30.44±3.354 min at 6, 10, 14, 18, 22 and 26°C, respectively. There were strong negative correlations between the τ_0 and water temperatures at all temperatures ($Y=-2.6981X+98.767$, $R^2=0.9831$, where Y is τ_0 and X is temperature).

Approved as qualified thesis of Soo-Yeon Im for the degree of Master of Philosophy by the Evaluation Committee in November 2007.

List of Tables

	<i>Page</i>
Table 1. Body length, body weight, gonadosomatic (GSI) and hepatosomatic index (HSI) of broodstock black plaice, <i>Pleuronectes obscurus</i>	8
Table 2. Embryonic development of the black plaice, <i>Pleuronectes obscurus</i>	14

List of Figures

	<i>Page</i>
Fig. 1. External morphology of the broodstock black plaice, <i>Pleuronectes obscurus</i> used in this study. (a) female and (b) male. Bar is 6 cm	9
Fig. 2. The percentages of black plaice, <i>Pleuronectes obscurus</i> eggs developed to anaphase of first cleavage at six different temperatures overtime	10
Fig. 3. Mitotic intervals (τ_0 , λ) for black plaice, <i>Pleuronectes obscurus</i> as functions of temperature (X). The temperatures used are within the normal range for spawning and early, development in this species. Eggs from three females to were fertilized with pooled sperm from five males and were distributed among the temperature treatments	12
Fig. 4. The eggs development of the black plaice, <i>Pleuronectes obscurus</i> . Each developmental stages are detailed in Table 2. Bars are 200 μm	15

I. 서 론

감성가자미, *Pleuronectes obscurus* (Herzenstein)는 가자미목(Pleuronectiformes), 가자미과(Pleuronectidae)에 속하며 전장이 약 40 cm으로 보통 연안에 서식하지만 기수역에도 들어오며, 연체동물이나 갑각류 등을 먹이로 하며 우리나라의 전 연안, 홋카이도 중부 이남의 일본 해역, 동중국해 등 널리 분포하고 있다(최 등, 2002).

최근 해산어류 양식이 넙치(*Paralichthys olivaceus*), 조피볼락(*Sebastes schlegelii*) 등 몇몇 어종에 편중되어 있으므로 넙치와 생태적으로 비슷한 저서성 가자미류를 비롯한 유영성 어류의 종묘생산 기술 개발에 의한 양식품종의 다양화가 요구된다(이 등, 1997). 감성가자미는 고가의 회를 비롯한 식용으로도 많이 이용되고 있으며 수산자원으로 산업적 가치가 높은 어류로 최근 자원량이 감소하고 있어 자원 증강, 자원 보호 차원 및 양식산업 측면에서 감성가자미의 종묘생산 기술 개발이 절실하다.

하지만 감성가자미에 관한 연구는 우리나라에서 Kim *et al.* (2007)에 의한 세포유전학적 연구만이 있을 뿐 관련 연구가 전무한 실정이다. 지금까지 우리나라에서 가자미류의 초기생활사 및 종묘생산에 관한 연구는 돌가자미(*Kareius bicoloratus*), 문치가자미(*Limanda yokohamae*), 범가자미(*Verasper variegatus*) 및 참가자미(*L. herzensteini*) 등에 관해서 되어 있을 뿐 감성가자미에 대해서는 연구된 적이 없다(Kim, 1982; Kim *et al.*, 1983; 김 등, 1985; 조 등, 1995; Han and Kim, 1997; 한과 김, 1999).

제 1 난할 억제제는 염색체공학에 사용되는 수단으로서 염색체공학은 양식 생산성 향상의 단기적인 극대화를 이룰 수 있다(Thorgaard, 1983). 제 1 난할 억제제는 염색체공학 중 4배체(tetraploid), 체세포 분열 억제성 자성발생 2배체(mitotic gynogenetic diploid), 웅성발생성 2배체(androgenetic diploid) 유도에 사용되며, 이 때 효율적인 제 1난할 억제를 위하여 수온 의존적인 제 1 난할 시간 파악은 필수적이다(Thorgaard, 1983; Mair, 1993).

척추동물에서 치녀생식의 유도는 바늘로 미수정난을 찌름으로써 유도된 바 있다(Bataillon, 1910; Kawamura, 1939; Levy, 1913). 이후에 저온(cold shock) 처리가 양서류에서 제 1 난할 즉, 제 1 체세포분열을 억제시킴으로 치녀생식 유도에 효과적임이 판명된 바 있다(Böök, 1941; Frankhauser, 1945). 또한 자성 발생성 반수체의 유전물질 배가는 제 2 감수분열 억제와 제 1 난할 억제로 가능하다. 제 2 감수분열 억제는 일부 어류에서 3배체 유도시 사용되는 온도, 수압, 화학적 처리로 가능하며 제 1 난할 억제는 4배체 유도시 주로 사용되는 고온 처리, 수압 처리가 단독으로 또는 병행되어 사용되고 있다(Thorgaard, 1986; Komen *et al.*, 1991). Streisinger *et al.* (1981)은 제 1 체세포분열시 고온 및 수압 처리로 동형접합성인 체세포분열 억제성 자성발생성 2배체 zebrafish (*Zebra danios*)를 유도하였고, Onozato (1984)는 수압 처리로 연어(*Oncorhynchus keta*)에서 체세포분열 억제성 자성발생성 2배체를 생산한 바 있다. 자성발생성 2배체 유도시 효과적인 제 2극체 방출 억제 및 제 1 난할 억제는 처리 대상 어류에 사용되는 처리의 종류, 강도 및 시간에 따라 달라질 수 있다(Thorgaard *et al.*, 1981; Onozato and Yamaha, 1983; Thorgaard and Allen, 1987).

Dettlaff unit (τ_0)는 초기에 일어나는 동시적 난할 동안의 한 체세포 분열주기 또는 두 개의 연속적인 세포 분열 사이의 간격을 말한다(Saat and Veersalu, 1996a, 1996b; Shelton *et al.*, 1997). τ_0 는 온도에 따라 반비례적으로 변하며, 회귀분석을 통한 τ_0 와 온도 사이의 관계는 유사한 생식 특성을 가진 종에 있어서 온도와 관련하여 발생단계를 예측할 수 있다(Dettlaff, 1986). 현재까지 체세포 분열주기는 paddlefish (*Polyodon spathula*), shovelnose sturgeon (*Scaphirhynchus platyrhynchus*), 잉어(*Cyprinus carpio*), tench (*Tinca tinca*), black crappie (*Pomoxis nigromaculatus*), 메기(*Silurus asotus*), winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*), greenling (*Hexagrammos otakii*) 등 많은 종에서 염색체 조작을 위한 최적의 시간을 추정하기 위해 사용되었다(Flajshans *et al.*, 1993; Shelton and Rothbard, 1993; Mims *et al.*, 1997; Shelton *et al.*, 1997; Gomelsky *et al.*, 2000; Park and Im, 2001; Park and Johnson, 2002, Park *et*

al., 2006).

따라서 본 논문에서는 감성가자미의 양식 산업화의 일환으로서 인공수정에 의한 난발생과정 조사와 아울러, 감성가자미에 있어서 효과적인 염색체조작을 위한 기초 자료로 활용 가능한 수온에 따른 τ_0 와 제 1 난할 시간에 관하여 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 친어관리 및 종묘생산

본 실험에서 사용된 감성가자미, *Pleuronectes obscurus*의 친어는 2007년 2월부터 3월에 걸쳐 부산 영도 하리포구 연안수역에서 채집된 개체를 구입하여 한국해양대학교 수산유전육종학연구실의 임해양식장으로 이동하여 순치 후 종묘 생산에 사용하였다.

본 실험에 사용된 친어의 외형을 copy stand (Nikon D80, Japan) 하에서 촬영하였으며, 친어의 평균 체장과 평균 체중을 digital vernier caliper (CD-20CP, Japan)와 전자저울(JW-1, Korea)을 사용하여, 0.01 cm, 0.01 g 단위로 각각 측정하였다. 복부를 압박하여 친어로부터 알과 정자를 채란·채정하여 건식법을 통해 인공수정 하여 발생·부화시켰다.

2. 생식 특성 조사

감성가자미 친어의 생식 특성을 파악하기 위하여 생식소중량지수(gonadosomatic index: GSI)와 간중량지수(hepatosomatic index: HSI)를 파악하였다. 생식소중량지수와 간중량지수는 각각 $GSI (\%) = (\text{생식소 중량} / \text{어체중}) \times 100$, $HSI (\%) = (\text{간중량} / \text{어체중}) \times 100$ 으로 계산하였다.

아울러 암컷 친어의 단위 체중당 포란수 및 수정난의 난경을 조사하였다. 암컷 친어 단위 체중당 포란수는 암컷 친어 100 g 체중당 포란수로 나타내었으며, 포란수는 난중량을 1개 난의 평균 중량으로 나누어 계산하였다. 수정난의 난경은 생물현미경(Axioskop, Zeiss, Germany)의 $\times 50$ 배율 하에서 eyepiece micrometer로 50 개의 난경을 측정하여 평균하였다.

3. 부화, 초기사육 및 관리

수정난은 정수식의 플라스틱 수조(36 cm×51 cm×31 cm)에 수용하였으며, 사육 용수는 물리가제(100 μm)로 여과하여 1일 1회, 1/3씩 환수하였고 공기 공급을 충분히 하였다. 실험 중 수정난의 부화 수온은 14±0.5℃로 유지하였다.

부화한 자어의 사육 중 먹이는 부화 후 2 일째부터 rotifer를 5 개체/ml로 하루에 2 번씩 공급하면서 사육하여 종묘생산하였다.

4. 제 1 난할시간 및 체세포 분열주기(τ_0) 조사

난발생 온도 차이에 따른 수정난의 제 1 난할시간 및 각 수온 조건의 체세포 분열주기(mitotic interval, τ_0)를 조사하기 위하여 6℃, 10℃, 14℃, 18℃, 22℃ 및 26℃의 부화 수온 조건하에서 수정난을 발생시켰으며, 수정 직후 부터 5분 간격으로 수정난을 표본 하였다. 각 표본은 5%의 중성 해수포르말린(50 ml formalin, 3.25 g Na₂HPO₄ · 12H₂O, 2.25 g KH₂PO₄, 해수 950 ml)을 사용하여 고정하였으며, 관찰하기 전까지 4℃에 보관하였다. 체세포 분열주기 관찰은 생물현미경로 ×50 배율에서 관찰하였다.

본 실험에서 체세포 분열주기는 1 세포기의 정확한 시작 시점을 결정하는 문제점과 첫 난할 시작 시점 결정의 어려움 및 8 세포기 이후 일어나는 난할의 동시적 분할의 시간측정에 대한 어려움 등으로 인해, 1 세포기, 4 세포기 및 16 세포기 까지 이르는 시간은 배제하여 Ignatyeva (1975)의 방법에 따라 각 부화 수온에서 전체 난의 약 10% 정도가 2 세포기(τ_I)에 이르는 시간, 8 세포기(τ_{III})까지 이르는 시간을 조사하였다. 평균 체세포 분열주기는 $\tau_0=(\tau_{III}-\tau_I)/2$ 로 계산하였다. 평균 체세포 분열주기와 수온과의 상관관계를 파악하기 위하여 선형회귀분석(linear regression analysis)을 실시하였다.

5. 난발생 조사

수정난의 발생을 관찰하기 위하여 수정 직후 초기는 5분 간격, 30분 간격으로 표본 하였으며 발생이 진행된 시점 이후 부터는 1시간 간격으로 표본하였다. 표본 즉시 5% 중성 해수포르말린으로 고정 하였다. 고정 즉시 생물현미경으로 사진 촬영하였으며, 이에 따르는 난발생 단계를 확인하였다. 난발생 시간은 난의 각 발생 단계에 전체 난의 80%가 도달한 시점으로 정하였다.

Ⅲ. 결 과

본 실험에서 사용된 감성가자미 친어의 평균 체장 및 평균 체중은 암·수 각각 31.9 ± 3.81 cm, 864.1 ± 331.87 g ($n=10$) 및 26.4 ± 2.18 cm, 285.9 ± 71.06 g ($n=10$) 이었으며(Table 1), 사용된 친어의 외형은 Fig. 1과 같다.

1. 생식 특성

감성가자미 친어의 생식소중량지수(GSI)는 암컷은 $30.2 \pm 1.43\%$ 으로 수컷의 $2.3 \pm 0.78\%$ 보다 약 27% 크며, 간중량지수(HSI)는 암컷 $1.0 \pm 0.49\%$ 에 비하여 수컷은 $0.8 \pm 0.19\%$ 으로 암컷에 비해 수컷이 약 0.05% 작았다(Table 1). 암컷 친어의 단위 체중당 평균 포란수는 $92,861 \pm 5,002$ 개/100 g으로 나타났다.

2. 제 1 난할시간

수온 차이에 따른 감성가자미 수정란의 수정 후 시간 경과에 따른 제 1 난할 빈도 분포 조사 결과는 Fig. 2와 같다.

난발생 수온 6°C 에서 제 1 난할은 수정 후 145분에 시작되어 점진적인 난할 빈도 증가를 보이면서 수정 후 240분에 완료 되었고 제 1 난할 완료에 소요되는 시간은 95분 이었으며 50%의 제 1 난할 빈도를 보이는 시간은 수정 후 190~195분 이었다. 난발생 수온 10°C 에서의 제 1 난할은 수정 후 125분 부터 시작되어 점진적인 난할 빈도 증가를 보이면서 수정 후 195분에 완료 되었다. 제 1 난할 완료시까지 걸린 시간은 70분이며, 제 1 난할의 빈도가 50%를 보이는 시간은 수정 후 160~165분 이었다. 난발생 수온 14°C 에서의 제 1 난할 시작 시간은 105분으로 제 1 난할 완료 까지는 45분이 소요되어 수정 후 150분에 완료되었다. 50%의 제 1 난할 빈도를 보이는 시간은 125~130분 이었다.

난발생 수온 18°C 에서 제 1 난할 시작은 수정 후 60분 이었으며 점진적으로

Table 1. Body length, body weight, gonadosomatic (GSI) and hepatosomatic indices (HSI) of broodstock black plaice, *Pleuronectes obscurus*

	Body length (cm)	Body weight (g)	GSI (%)	HSI (%)
Female ($n=10$)	31.9 ± 3.81	864.1 ± 231.8	30.2 ± 1.43	1.0 ± 0.49
Male ($n=10$)	26.4 ± 2.18	285.9 ± 71.0	2.3 ± 0.78	0.8 ± 0.19

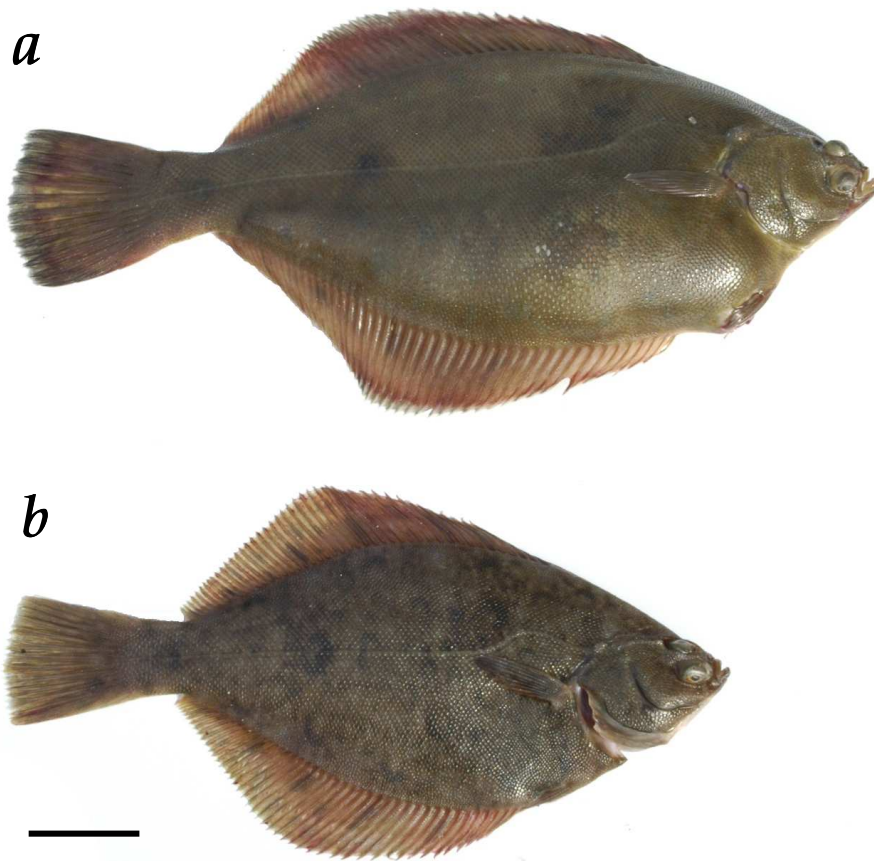


Fig. 1. External morphology of the broodstock black plaice, *Pleuronectes obscurus* used in this study. (a) female and (b) male. Bar is 6 cm.

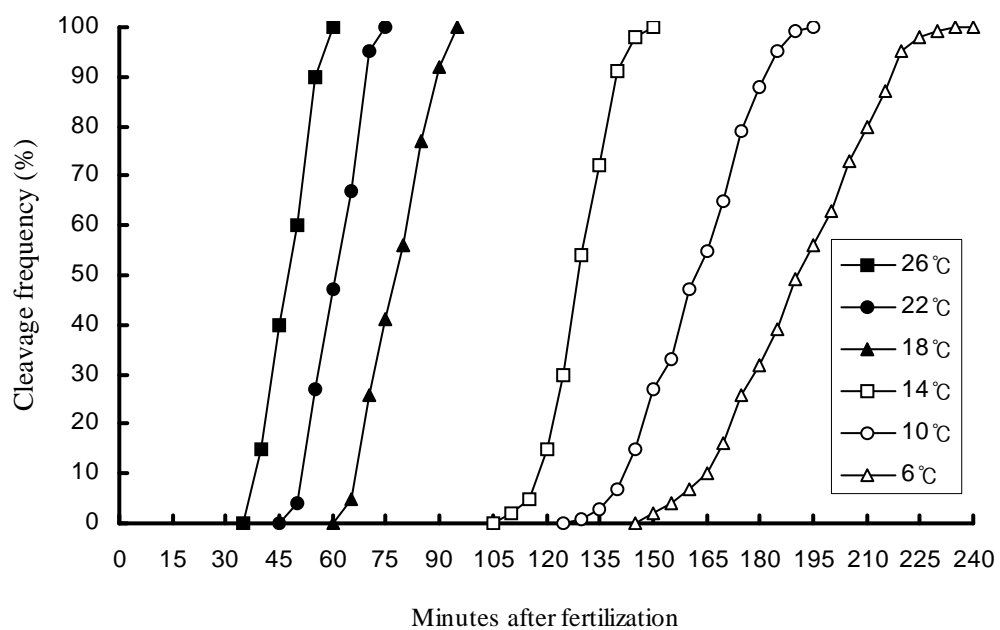


Fig. 2. The percentages of black plaice, *Pleuronectes obscurus* eggs developed to anaphase of first cleavage at six different temperatures overtime.

난할 빈도가 증가하여 수정 후 95분에 제 1 난할의 완료 되었으며 완료까지 걸린 시간은 35분 이었다. 수정 후 75~80분에 제 1 난할 빈도가 50%를 나타내었다. 난발생 수온 22℃에서의 제 1 난할 시작은 수정 후 45분으로 수정 후 75분에 완료 되었다. 50%의 제 1 난할 빈도를 보이는 시간은 수정 후 60~65분 이었으며 제 1 난할 완료 까지는 30분이 소요 되었다. 난발생 수온 26℃에서는 수정 후 35분에 제 1 난할이 시작되어 수정 후 60분에 완료 되었다. 제 1 난할 완료에 소요된 시간은 25분이며 제 1 난할 빈도 50%를 보인 시간은 45~50분 이었다.

Fig. 2에서 나타난 바와 같이, 감성가자미에서 난발생 수온이 높아질수록 제 1 난할 시작 시점은 빨라지며, 제 1 난할 빈도 50%를 보이는 시점 역시 빨라짐을 보였다. 난발생 수온이 높아질수록 제 1 난할 완료에 소요되는 시간은 짧아졌으며, 난발생 수온이 증가 할수록 수정 후 경과 시간에 따른 제 1 난할 빈도 graph의 기울기가 급격하여 졌다.

3. 체세포 분열주기(τ_0)

감성가자미 발생난의 체세포 분열주기는 난발생 수온 6℃에서 83.44±3.076분, 10℃에서 71.53±3.060분, 14℃에서 63.12±2.109분, 18℃에서 45.09±2.780분으로 나타났으며 22℃에서는 39.96±2.095분, 그리고 26℃에서 30.44±3.354분 이었다(Fig. 3). Fig. 3에서 볼 수 있듯이 감성가자미 발생난의 수온 증가에 따른 체세포 분열주기 시간(Y)은 직선적인 감소를 보이며 수온(X)에 따라 $Y=-2.6981X+98.767$ ($R^2=0.9831$)의 직선식으로 나타났다.

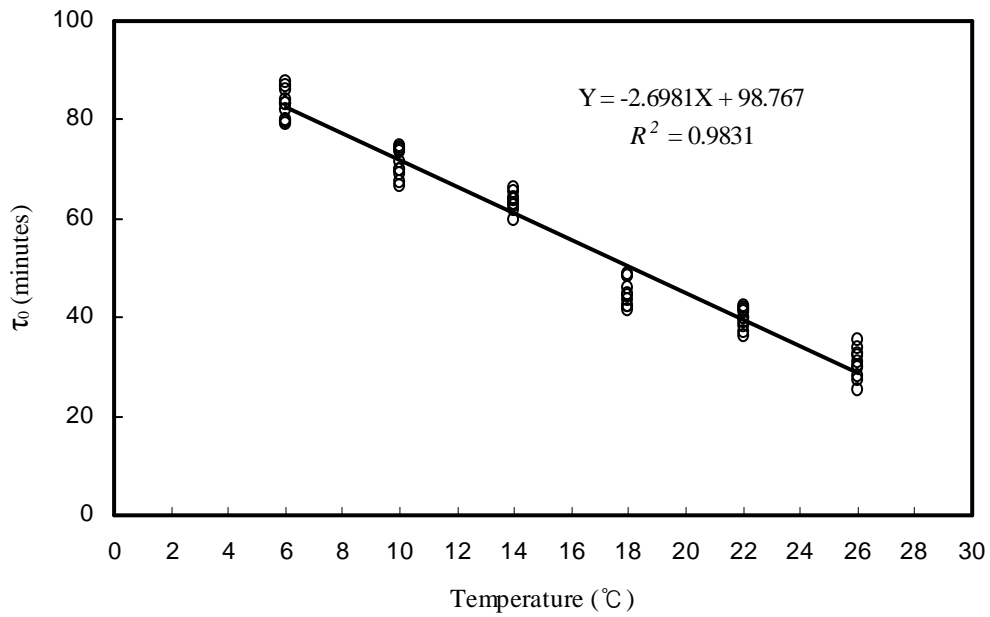


Fig. 3. Mitotic intervals (τ_0 , Y) for black plaice, *Pleuronectes obscurus* as functions of temperature (X). The temperatures used are within the normal range for spawning and early, development in this species. Eggs from three females to were fertilized with pooled sperm from five males and were distributed among the temperature treatments.

4. 난발생 및 부화

인공수정을 통하여 얻은 감성가자미 수정란의 14℃에서 수정 후 경과시간에 따른 각 발생단계 결과는 Table 2 및 Fig. 4와 같다. 수정란의 평균 난경은 0.84 ± 0.010 mm ($n=50$)의 비분리 부착란으로 유구가 없었다(Fig. 4-A).

수정 후 1시간 45분 후 배반이 형성되며(Table 2, Fig. 4-B), 수정 후 2시간 30분에 2 세포기에 도달하였다(Table 2, Fig. 4-C). 2 세포기 형성 1시간 후인 수정 후 3시간 30분에 4 세포기(Table 2, Fig. 4-D), 2 세포기 형성 2시간 후인 수정 후 4시간 30분에 8 세포기에 도달하였다(Table 2, Fig. 4-E). 수정 후 5시간 30분 후에 16 세포기에 달하였으며(Table 2, Fig. 4-F), 수정 후 7시간 30분 후에는 32 세포기(Table 2, Fig. 4-G), 수정 후 8시간 30분 후에는 64 세포기에 도달하였다(Table 2, Fig. 4-H).

이후 계속 분열하여 수정 후 10시간 후에는 상실기에 달하였으며(Table 2, Fig. 4-I), 그로부터 6시간이 지난 수정 후 16시간에는 계속적인 난할의 진행으로 할구가 더 작게 되어 배반엽과 난황 사이에 빈공간이 형성된 포배기에 달하였다(Table 2, Fig. 4-J). 감성가자미 수정란은 단황란으로서 난할은 불완전난할을 보였다. 분열이 계속적으로 진행되어 수정 후 20시간에 낭배기가 시작되어(Table 2, Fig. 4-K) 수정 후 23시간에는 배반이 난황의 대부분을 덮었다(Table 2, Fig. 4-L).

수정 후 27시간 후에는 배체가 형성되기 시작하였다(Table 2, Fig. 4-M). 수정 후 44시간 후에는 안포가 형성되며 10개 이하의 체절을 확인할 수 있었다(Table 2, Fig. 4-N). 수정 후 72시간 후에는 이포와 Kupffer 세포가 형성되며 14개 이상의 체절을 확인할 수 있었다(Table 2, Fig. 4-O). 수정 후 90시간 후에는 Kupffer 세포가 없어지고, 20개 이상의 체절을 확인할 수 있었으며(Table 2, Fig. 4-P), 이 때 심장 박동과 아울러 꼬리를 꿈틀거리며 움직이는 것이 관찰되었다. 수정 후 121시간이 되어서 부화하는 개체를 확인할 수 있었으며 부화 후 개체의 전장은 3.5 ± 0.16 mm 이었다(Table 2, Fig. 4-Q).

Table 2. Embryonic development of the black plaice, *Pleuronectes obscurus* at 14°C

Time (hr : min)	Stages *	Descriptions
-	A	Fertilized egg
1 : 45	B	Elevation of blastodisc
2 : 30	C	2-celled stage
3 : 30	D	4-celled stage
4 : 30	E	8-celled stage
5 : 30	F	16-celled stage
7 : 30	G	32-celled stage
8 : 30	H	64-celled stage
10 : 00	I	Morula stage
16 : 00	J	Blastula stage
20 : 00	K	Beginning of gastrulation
23 : 00	L	Postgastrula stage
27 : 00	M	Formation of the embryonic body
44 : 00	N	Less than 10 mytomes stage, formation of optic vesicles
72 : 00	O	More than 14 mytomes stage, formation of auditory vesicles and Kupffer's vesicle
90 : 00	P	20 and above mytomes stage, disappearance of Kupffer's vesicle
121 : 00	Q	Hatching of embryo

* stages (A ~ Q) referring from Fig. 2.

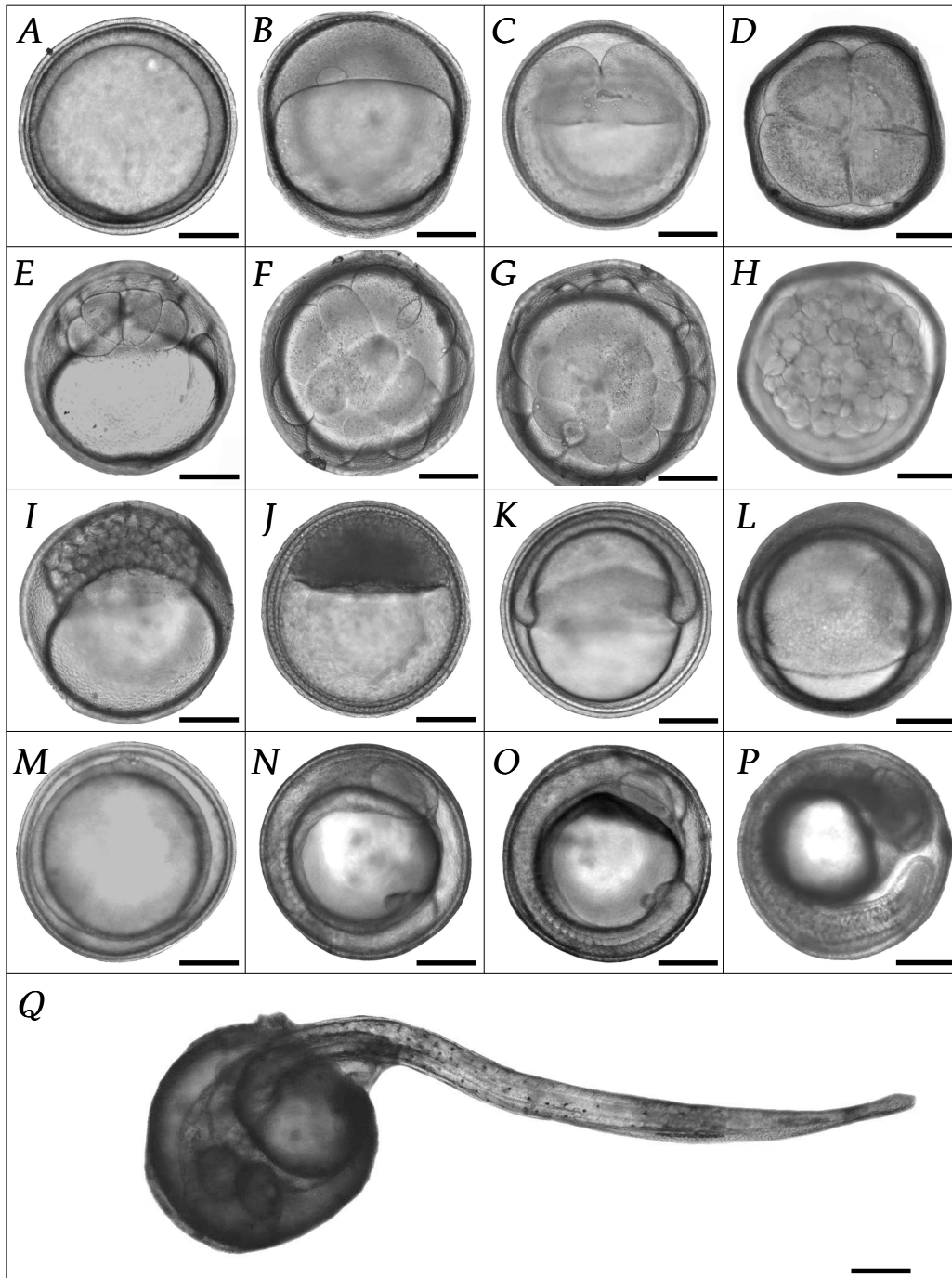


Fig. 4. The eggs development of the black plaice, *Pleuronectes obscurus*. Each developmental stages are detailed in Table 2. Bars are 200 μm.

IV. 고찰

가자미류는 대부분의 해산어처럼 구형의 분리부성란이며 일부는 침성 점착란으로서 감성가자미(*Pleuronectes obscurus*)는 문치가자미(*Limanda yokohamae*)와 같이 침성점착란이며 유구는 존재하지 않았다(Kim *et al.*, 1983). 감성가자미의 난경은 0.84 ± 0.010 mm 으로 문치가자미의 0.71~0.80 mm (Kim *et al.*, 1983)와 비슷하며, 참가자미(*L. herzensteini*)의 0.86~0.96 mm (한과 김, 1999) 및 돌가자미(*Kareius bicoloratus*)의 1.014~1.04 mm (Kim, 1982) 보다는 작았다.

수온 14°C에서 감성가자미의 수정란은 수정 후 1시간 45분 후에 배반이 형성되어 수정 후 10시간에는 상실기에 달하였으며 수정 후 20 시간에 낭배기가 시작되었다. 수정 후 23 시간에는 배반이 난황의 대부분을 덮고 수정 후 27시간 후에 배체가 형성되기 시작하였다. 수정 후 44시간 후에 안포가 형성되며 수정 후 72시간에 이포와 Kupffer 세포가 형성되어 수정 후 90시간에는 Kupffer 세포가 없어지고 심장 박동과 꼬리의 움직임을 확인할 수 있었다. 감성가자미의 수정란은 부화하기에 이르기까지 121시간이 소요되었다.

돌가자미의 경우 수온 8.0~9.5 °C에서 수정 후 1시간 40분 후에 배반이 형성되어 수정 후 6시간 55분에 상실기, 수정 후 20시간 15분에 낭배기에 달하였다. 수정 후 26시간 55분에 배체가 형성되며 안포 형성은 수정 후 27시간 50분, Kupffer 세포는 수정 후 38시간 45분에 형성되었으며, 이포 형성은 수정 후 49시간 5분에 일어났다. 수정 후 58시간 50분에 Kupffer 세포가 사라지며 심장 박동을 관찰할 수 있었으며, 수정 후 73시간 45분 후에 부화가 일어났다(Kim, 1982).

문치가자미는 평균 수온 11.4°C에서 배반 형성은 수정 후 3시간 만에 일어났으며, 수정 후 17시간에 상실기, 수정 후 35시간에 낭배기에 달하였다. 배체 형성은 수정 후 42시간에 일어났으며, 수정 후 43시간에 안포가 형성되었다. 수정 후 48시간에 Kupffer 세포가 형성되고 수정 후 74시간에 심장박동과 이포가 형성되었고 Kupffer 세포가 사라졌다. 문치가자미의 부화는 수정 후 120시간에

일어났다. 또한 참가자미는 평균 수온 16.0℃에서 수정 후 11시간에 상실기에 달하였으며 수정 후 27시간에 배체의 머리 부분이 형성되어 수정 후 28시간에는 안포가 형성되었다. Kupffer 세포는 수정 후 29시간에 형성되어 수정 후 36시간에 사라졌다. 수정 후 46시간에 심장이 형성되어 박동하였으며, 부화시까지 걸린 시간은 약 63~64시간 이었으며, 평균 수온 14.0℃에서는 약 87시간이 소요되었다(Kim, 1982; Kim *et al.*, 1983; 한과 김, 1999).

감성가자미와 돌가자미의 수정난은 배반 형성에 이르는 시간까지는 비슷하였으나 돌가자미, 문치가자미의 부화 수온보다 상대적으로 높은 감성가자미의 수정난이 부화에 이르기까지 소요된 시간은 돌가자미 보다 길었으며, 배반 형성이 느린 문치가자미와는 비슷한 경향을 보였다. 반면 같은 수온에서의 참가자미보다는 더 많은 시간이 소요되었다. 감성가자미의 난발생과정에서 이포와 Kupffer 세포가 거의 동일한 시기에 형성된 것을 제외하고는 돌가자미, 문치가자미, 참가자미의 난발생과정과 동일하게 안포가 먼저 형성되고 Kupffer 세포가 없어지는 시점에서 심장박동을 관찰할 수 있었다. 이러한 난발생과정의 차이는 동일 종내 에서도 난발생 수온에 좌우될 수 있으며, 동일 수온 조건 하에서도 각 종의 종 특이성에 의해서 좌우될 수 있다.

부화 직후의 자어의 전장은 문치가자미 2.64~2.72 mm, 참가자미 2.70~2.90 mm, 돌가자미 3.09~3.146 mm 으로서 감성가자미의 부화 직후 자어의 전장 3.5 ± 0.16 mm 에 비해 작았다(Kim, 1982; Kim *et al.*, 1983; 한과 김, 1999).

감성가자미 수정난의 제 1 난할 시작 시간과 체세포분열 주기(τ_0)의 조사를 위해 6℃, 10℃, 14℃, 18℃, 22℃ 및 26℃로 수온 조건을 다르게 하여 조사한 결과 제 1 난할 시작 시간은 6℃, 10℃, 14℃, 18℃, 22℃ 및 26℃에서 각각 수정 후 145분, 125분, 105분, 60분, 45분 및 35분 이었으며, 체세포 분열주기는 각각 83.44 ± 3.076 분, 71.53 ± 3.060 분, 63.12 ± 2.109 분, 45.09 ± 2.780 분, 39.96 ± 2.095 분 및 30.44 ± 3.354 분 이었다. 얻어진 결과와 같이 감성가자미의 난발생에 있어서 수정 시간을 기준으로 하여 제 1 난할 시작시간은 발생 수온이 증가함에 따라 빨라지며, 체세포 분열주기는 감소하는 경향을 보였다. 본 연구와 비슷하게,

winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*), 메기(*Silurus asotus*), 쥐노래미 (*Hexagrammos otakii*), baltic herring (*Clupea harengus membras* L.), perch (*Perca fluviatilis* L.) and ruffe (*Gymnocephalus cernuus* L.)에서 체세포 분열주기 결과와 유사하게, 발생 수온 증가에 따라 체세포 분열주기가 감소하였다(Saat and Veersalu, 1996a, 1996b; Park and Im, 2001; Park and Johnson, 2002; Park *et al.*, 2006).

본 연구 결과를 통해 발생 수온에 따른 제 1 난할 시작시간과 체세포 분열 주기는 제 1 난할 억제를 위한 최적 처리 시간 등을 결정하여 감성가자미의 음성발생성 2배체, 체세포 분열 억제성 자성발생성 2배체 및 4배체 생산의 감성가자미 염색체조작을 위한 기초자료로 사용될 수 있을 것이며 감성가자미 난발생 과정은 양식 생물학적 기초 자료로서의 가치가 있을 것이다. 차후 감성가자미의 인공수정을 통한 종묘생산 기술, 초기생활사에 대한 연구 등 감성가자미에 대한 지속적인 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

V. 국 문 요 약

부산 영도 하리포구 연안수역에서 2007년 2월부터 3월에 걸쳐 채집된 감성가자미, *Pleuronectes obscurus*를 대상으로 하여 난발생과정 및 발생 수온에 따른 제 1 난할시간과 체세포 분열주기(τ_0)를 조사하였다.

감성가자미의 수정란은 평균 난경이 0.84 ± 0.010 mm 이었고, 비분리 부착란으로 유구가 없었다. 수온 14°C 에서 수정 후 1시간 45분 후에 배반이 형성되어 수정 후 2시간 30분에 2 세포기에 도달하였다. 수정 후 3시간 30분에 4 세포기, 수정 후 4시간 30분에 8 세포기, 수정 후 5시간 30분 후에 16 세포기에 도달하였으며, 수정 후 7시간 30분 후에는 32 세포기, 수정 후 8시간 30분 후에는 64 세포기에 도달하였다. 이후 계속 분열하여 수정 후 10시간 후에 상실기에 달하였으며 수정 후 16시간에는 포배기에 달하였다. 수정 후 20시간에 낭배기가 시작되어 수정 후 27시간 후에는 배체가 형성되기 시작하였다. 수정 후 44시간 후에 안포가 형성되었으며 수정 후 72시간에는 이포와 Kupffer 세포가 형성, 수정 후 90시간에는 Kupffer 세포가 없어지고 심장 박동과 꼬리의 움직임을 확인할 수 있었다. 수정 후 121시간에 전장 3.5 ± 0.16 mm의 자어가 부화하였다.

감성가자미 수정란의 제 1 난할 시간은 6°C , 10°C , 14°C , 18°C , 22°C 및 26°C 에서 각각 수정 후 190~195분, 수정 후 160~165분, 수정 후 125~130분, 수정 후 75~80분, 수정 후 60~65분 및 수정 후 45~50분 이었고 발생 수온이 증가함에 따라 제 1 난할 시간은 빨라졌으며 난할빈도 관계식의 기울기는 완만해졌다. τ_0 는 6°C , 10°C , 14°C , 18°C , 22°C 및 26°C 에서 각각 83.44 ± 3.076 분, 71.53 ± 3.060 분, 63.12 ± 2.109 분, 45.09 ± 2.780 분, 39.96 ± 2.095 분 및 30.44 ± 3.354 분으로 이는 $Y = -2.6981X + 98.767$ ($R^2 = 0.9831$)의 직선식으로 나타낼 수 있었으며 수온 증가에 따라 τ_0 가 감소하는 경향을 보였다.

VI. 감사의 글

한국해양대학교 해양과학부에 입학, 졸업을 한 것이 엇그제 일 같은데 어느덧 대학원 석사과정을 마쳐야할 때가 되었습니다. 대학원 석사과정을 시작하기까지 우여곡절이 많았는데 무사히 석사과정을 마칠 수 있어서 더없이 기쁘고 행복합니다.

먼저 너무나도 부족한 것이 많은 저를 항상 꾸짖어 주시고 가르쳐 주시고 보듬어 주신 지도교수 박인석 박사님께 깊은 감사의 말 전하고 싶습니다. 교수님께서 베풀어 주신 사랑, 교수님께 배운 많은 것들을 꼭 잊지 않고 살아가도록 하겠습니다. 그리고 본 학위논문을 헌신적으로 심사하여 주신 심사위원장 최철영 교수님과 조성환 심사위원님께 심심한 감사의 말씀을 드립니다.

해양환경·생명과학부 학부 때부터 많은 조언과 사랑을 베풀어 주신 강효진 교수님, 노일 교수님, 서영완 교수님, 이호진 교수님, 안중웅 교수님, 임선영 교수님, 그리고 이경은 교수님께 이 글을 빌어 또 한 번 감사드립니다.

연구실 생활, 연구에 관한 사항 등 많은 조언을 아끼지 않으셨던 임재현 박사님, 허준욱 박사님, 김영자 박사님, 그리고 이진환 박사님께도 감사의 말 드립니다.

연구실 생활을 하면서 부족한 점이 많았을 저를 아껴주고 감싸주었던 동원 오빠, 우준 오빠, 민욱이 오빠께 너무나도 감사드립니다. 졸업을 하시고도 부족한 후배 챙겨주시고 조언을 아끼지 않은 선량이 언니, 은미 언니 너무나도 감사합니다. 비록 같은 연구실에서 생활하지는 않았지만 학부 때부터 졸업을 하시고 난 다음에도 챙겨주시는 상목이 오빠도 감사합니다.

대학원 석사과정을 하면서 인연을 맺어 지금은 더없이 소중한 이들로 인해 또 한번 행복을 느끼게 하는 우리 디딤터 아이들과 한 명 한 명 거론하기에 는 너무나도 많은 디딤터 식구들에게 감사합니다.

그리고 대학교 1학년 시절부터 지금까지 항상 제 곁에서 힘들 때마다 힘이 되어준 내 소중한 보물들 왕룡 오빠, 일재 오빠, 상민이, 용걸이, 창완이, 동환

이, 내 소중한 보물들 중에서 더 보물 경희, 소영이, 형엽이에게도 항상 고맙고 사랑한다고 언제까지나 행복하게 잘 지내자고 말하고 싶습니다. 비록 떨어져 자주 만나고 있지는 못 하지만 혜민이 언니, 효주에게도, 같이 석사과정을 시작한 형주와 현진이에게도 사랑한다고 고맙다고 행복하자고 말하고 싶습니다.

이 글에 제가 학과 생활을 할 수 있도록 많은 조언과 격려를 해 주셨던 선·후배님 모두를 적지 못 해 아쉽지만 항상 그 분들께 감사하고 또 감사합니다.

마지막으로 큰딸의 욕심으로 인해 육상에서의 가족과의 행복을 누리셔야 할 때에 저 멀리 망망대해에서 고생하신 사랑하는 아빠, 항상 아빠의 빈자리까지 채워주시는 사랑하는 엄마, 툭툭거리기는 하지만 그래도 사랑하는 내 동생. 가족이 있기에 제가 있습니다. 베풀어주신 아버지의 사랑에 항상 보답하면서 살겠습니다. 사랑합니다.

VII. 참 고 문 헌

- Bataillion E*, 1910. L'embryogenése compléte provoquée chez les amphibiens par piqure de l'oeuf vierge, larve parthé nogenétiques de *Rana fusca*. Comptes Rendus des Scances de l'Academil des Sciences Serie III, Sci. de la Vie. **150**: 996-998.
- Böök JA*, 1941. Induction of haploidy in a cold treatment experiment with egg cells of the salamander *Triton taeniatus*. Kung. Fysio. Salls. Forhand. **11**: 1-16.
- Dettlaff TA*, 1986. The rate of development in poikilothermic animals calculated in astronomical and relative time units. J. Therm. Biol. **11**: 1-7.
- Flajšhans M, O Linhart and P Kvasnika*, 1993. Genetic studies of tench (*Tinca tinca* L.): induced triploidy and tetraploidy and first performance data. Aquaculture. **113**: 301-312.
- Frankhauser G*, 1945. The effects of changes in chromosome number on amphibian development. Quart. Rev. Biol. **20**: 20-78.
- Gomelsky BI, SD Mims, RJ Onders, WL Shelton, K Dabrowski and MA Garcia-Abiado*, 2000. Induced gynogenesis in black crappie. N. Am. J. Aquacult. **62**: 33-41.
- Han KH and YU Kim*, 1997. Development of larva and juvenile of the stone flounder, *Kareius bicoloratus*. Bull. Mar. Sci. Yosu Nat'l. Fish. Univ. **6**: 39-47.
- Ignatyeva GM*, 1975. Temperature dependence of cleavage rates in carp, pike and whitefish. Soviet J. Dev. Bio. **5**: 24-28.
- Kawamura T*, 1939. Artificial parthenogenesis in the frog. I, Chromosome numbers and their relation to cleavage histories. J. Sci. Hiroshima

Univ. Ser. B Div. 1 (Zoology). 6: 115-217.

- Kim E-M, HS An and I-S Park**, 2007. Cytogenetic study of *Pleuronectes obscurus*, *Konosirus punctatus* and *Pseudoblennius percoides*. J. Fish. Sci. Technol. 10: 24-29.
- Kim YU**, 1982. On the egg development and larvae of right-eye flounder, *Kareius bicoloratus* (Basilewsky). J. Kor. Fish. Soc. 15: 323-328.
- Kim YU, JG Myoung and JS Park**, 1983. Eggs development and larvae of right-eye flound, *Limanda yokohamae* Günther. J. Kor. Fish. Soc. 16: 389-394.
- Komen J, ABJ Bongers, CJJ Richter, V Muiswinkel and EA Huisman**, 1991. Gynogenesis in common carp (*Cyprinus carpio* L.). II, The production of homozyous gynogenetic clones and F1 hybrids. Aquaculture. 92: 127-142.
- Levy F**, 1913. Über künstliche Entwicklungserregung bei Amphibien. Arch. Mikroskop. Ana. 82: 65-79.
- Mair GC**, 1993. Chromosome-set manipulation in tilapia - techniques, problems and prospects. Aquaculture. 111: 227-244.
- Mims SD, WL Shelton, O Linhart and C Wang**, 1997. Induced meiotic gynogenesis of paddlefish *Polyodon spathula*. J. World Aquacult. Soc. 28: 334-343.
- Onozato H**, 1984. Diploidization of gynogenetically activated salmonid eggs using hydrostatic pressure. Aquaculture. 43: 91-97.
- Onozato H and E Yamaha**, 1983. Induction of gynogenesis with ultraviolet rays in four species of salmoniforms. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 49: 693-699.
- Park I-S and J-H Im**, 2001. Determination of the temperature-dependent index of mitotic interval (τ_0) for chromosome manipulation in far

- eastern catfish *Silurus asotus*. Korean J. Ichthyol. **13**: 85-88.
- Park I-S, E-M Kim, SR Woo, S-Y Oh, DS Kim and JW Hur**, 2006. Temperature-dependent index of mitotic interval τ_0 in greenling *Hexagrammos otakii*. Fish. Sci. **72**: 719-722.
- Park I-S and SC Johnson**, 2002. Determination of the temperature-dependent index of mitotic interval (τ_0) for chromosome manipulation in winter flounder *Pseudopleuronectes americanus*. Aquaculture. **213**: 95-100.
- Saat T and A Veersalu**, 1996a. The rate of early development in perch *Perca fluviatilis* L. and ruffe *Gymnocephalus cernuus* (L.) at different temperatures. Ann. Zool. Fenn. **33**: 693-698.
- Saat T and A Veersalu**, 1996b. Duration of synchronous cleavage cycles and rate of development at different temperatures in the baltic herring. J. Fish Biol. **48**: 658-663.
- Shelton WL and S Rothbard**, 1993. Determination of the developmental duration (τ_0) for ploidy manipulation in carps. Isr. J. Aquacult. -Bamidgeh. **45**: 73-81.
- Shelton WL, SD Mims, JA Clark, AE Hiott and C Wang**, 1997. A temperature-dependent index of mitotic interval (τ_0) for chromosome manipulation in paddlefish and shovelnose sturgeon. Prog. Fish-Cult. **59**: 229-234.
- Streisinger G, C Walker, N Dower, D Knauber and F Singer**, 1981. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). Nature. **291**: 293-296.
- Thorgaard GH**, 1983. Chromosome set manipulation and sex control in fish. In: Fish Physiology vol. 9B, Hoar WS, DT Randall and EM Donaldson, eds. Academic Press, New York, NY, pp. 405-434.
- Thorgaard GH**, 1986. Ploidy manipulation and performance. Aquaculture. **57**:

57-64.

Thorgaard GH and SK Allen Jr, 1987. Chromosome manipulation and markers in fishery management. In: Population genetics and fisheries management, Ryman N and FM Utter, eds. Univ. of Washington Press, Seattle, pp. 319-331.

Thorgaard GH, ME Jazwin and AR Stier, 1981. Polyploidy induced by heat shock in rainbow trout. Trans. Am. Fish. Soc. **110**: 546-550.

김경길 · 문영봉 · 정성채 · 허종수 · 이종관 · 송천호, 1985. 문치가자미의 종묘생산시 변태기의 먹이공급이 성장과 생존율에 미치는 영향. 수진원 연구보고서. **36**: 53-60.

이정용 · 김완기 · 장영진, 1997. 참가자미, *Limanda herzensteini*의 난발생에 미치는 수온과 염분의 영향. 한국양식학회지. **10**: 357-362.

조기채 · 김종현 · 고창순 · 김윤 · 김경길, 1995. 범가자미, *Verasper variegatus*의 종묘생산에 관한 연구. 수진원 연구보고서. **50**: 41-57.

최윤 · 김지현 · 박종영, 2002. 한국의 바닷물고기. 교학사, 서울, 538 pp.

한경호 · 김용익, 1999. 참가자미(*Limanda herzensteini*)의 난발생과정과 자어의 형태발달. 한국어류학회지. **11**: 86-93.