



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

博士學位論文

$^{60}\text{Co}$  감마선 조사에 따른 속성장 및  
환경내성에 강한 등근전복과  
오분자기의 신품종 개발에



濟州大學校 大學院

海洋生命科學科

左 旻 昔

2015 年 2 月

# $^{60}\text{Co}$ 감마선 조사에 따른 속성장 및 환경내성에 강한 등근전복과 오분자기의 신제품 개발에 관한 연구

指導教授 呂寅圭

左旻昔

이 논문을 理學 博士學位 論文으로 提出함



左旻昔의 理學博士 學位論문을 認准함

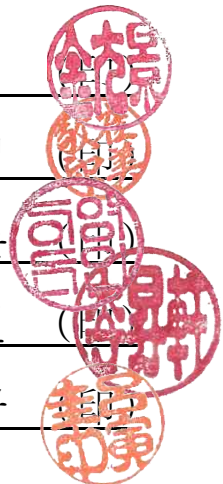
審査委員長 김대경

委 員 최미경

委 員 이영돈

委 員 이승헌

委 員 여인규



濟州大學校 大學院

2015年 2月

A study on the development of disk abalone  
(*Haliotis discus discus*) and small abalone  
(*Haliotis diversicolor aquatili*) for rapid growth and  
environmental tolerance in accordance with  
 $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ - ray irradiation

Min-Seok Jwa

(Supervised by professor In-Kyu Yeo)

A thesis submitted in partial fulfillment  
of the requirement for the degree of

Doctor of philosophy

Department of Marine Life Sciences

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

February, 2015

# 목 차

목차 .....	i
List of Tables.....	vi
List of Figures.....	vii
Abstract.....	xiv
I . 종합서론 .....	1
II . $^{60}\text{Co}$ 감마선 조사가 등근전복과 오분자기에 미치는 영향 .....	6
1. 서 론.....	6
2. 재료 및 방법.....	9
1) 모패관리 .....	9
1-1) 등근전복.....	9
1-2) 오분자기.....	9
2) 감마선 조사용 케이스 제작.....	10
3) 감마선 조사.....	11
4) 혈림프(Hemolymph) 수 측정 .....	12
5) 항산화 효소 측정 .....	13
6) 통계처리 .....	16
3. 결과.....	17
1) 감마선 선량에 따른 등근전복 Hormesis 변화 .....	17
1-1) 생존율 변화 .....	17

1-2) 혈림프수 변화.....	18
1-3) 항산화효소 변화.....	19
2) 감마선 조사에 따른 오분자기 Hormesis 변화.....	21
2-1) 생존율 변화.....	21
2-2) 혈림프수 변화.....	22
2-3) 항산화효소 변화.....	23
4. 고 찰.....	2
Ⅲ. <sup>60</sup> Co 감마선 조사 후 생산된 전복류 치패의 형질 변화.....	29
1. 서론.....	29
2. 재료 및 방법.....	31
1) 실험재료 및 사육관리.....	31
1-1) 둥근전복.....	31
1-2) 오분자기.....	31
2) 부착규조류 배양.....	32
3) 감마선 조사 후 종자생산.....	33
4) 난발생 과정 조사.....	34
5) 수정률 및 부화율 측정.....	34
6) 유생관리.....	34
7) 부착률 측정.....	35
8) 성장률 측정.....	35
9) 성장 유전자 mRNA 발현 분석.....	36
10) RT-PCR.....	37
11) Thermoluminescence(TL) 측정.....	38

12) 통계처리.....	39
3. 결과.....	40
1) 사육관리.....	40
1-1) 등근전복.....	40
1-2) 오분자기.....	40
2) 먹이생물의 공급.....	41
3) 난발생 과정 변화.....	42
4) 수정란 수 및 수정률 변화.....	45
4-1) 등근전복.....	45
4-2) 오분자기.....	47
5) 비정상 발생란의 계수.....	49
5-1) 등근전복.....	49
5-2) 오분자기.....	50
6) 부화율 및 부착률 변화.....	51
6-1) 등근전복.....	51
6-2) 오분자기.....	53
7) 성장률 변화.....	55
7-1) 등근전복.....	55
7-2) 오분자기.....	56
8) 성장유전자 MYOSTATIN mRNA 변화.....	57
9) Thermoluminescence(TL) 변화.....	58
4. 고찰.....	59



IV. 감마선 조사 후 생산된 전복류 F1 치패의 환경내성 변화 연구 .....	63
1. 서론 .....	63
2. 재료 및 방법 .....	67
1) 수온, 염분 내성측정 .....	67
2) 생존율 측정 .....	67
3) 항산화효소 측정 .....	68
4) Respiratory burst activity 측정 .....	69
5) Phenoloxidase activity 측정 .....	69
6) Lysozyme activity 측정 .....	70
7) 면역유전자 mRNA .....	70
8) RT-PCR 분석 .....	71
3. 결과 .....	73
1) 동근전복 고수온 내성 변화 .....	73
1-1) 생존율 .....	73
1-2) 항산화효소 변화 .....	74
1-3) Respiratory burst activity 변화 .....	76
1-4) Phenoloxidase activity 변화 .....	77
1-5) Lysozyme activity 변화 .....	78
2) 오분자기 고수온 내성 변화 .....	79
2-1) 생존율 .....	79
2-2) 항산화효소 변화 .....	80
2-3) Respiratory burst activity 변화 .....	82
2-4) Phenoloxidase activity 변화 .....	83



2-5) Lysozyme activity 변화	84
3) 둥근전복 저염분 내성 변화	85
3-1) 생존율	85
3-2) 항산화효소 변화	86
3-3) Respiratory burst activity 변화	88
3-4) Phenoloxidase activity 변화	89
3-5) Lysozyme activity 변화	90
4) 오분자기 저염분 내성 변화	91
4-1) 생존율	91
4-2) 항산화효소 변화	92
4-3) Respiratory burst activity 변화	94
4-4) Phenoloxidase activity 변화	95
4-5) Lysozyme activity 변화	96
5) 면역유전자 CASPASE-8 mRNA 변화	97
6) 열충격 단백질(HSP 70) mRNA 변화	98
4. 고찰	100
V. 종합고찰	104
VI. 요약	109
VII. 참고 문헌	111

## List of Tables

Table 1. Oligonucleotide of primers for RT-PCR .....	38
Table 2. Results of detection for the remaining amount in the Juvenile disk abalone that had been produced after being irradiated with gamma ray .....	58
Table 3. Oligonucleotide of primers for RT-PCR .....	72



## List of Figures

Fig. 1. Case for irradiation with gamma ray .....	10
Fig. 2. Gamma irradiation to abalones .....	11
Fig. 3. Procedures for extraction of protein .....	14
Fig. 4. Procedures for protein assay by Lowery method.....	15
Fig. 5. Procedures for measurment of catalase activity.....	15
Fig. 6. Procedures for measurment of SOD activity .....	16
Fig. 7. Survival rate of disk abalone ( <i>H. discus discus</i> ) after the exposure of gamma radiation.*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ ) .....	17
Fig. 8. Variations of hemolymph factors of disk abalone ( <i>H. discus discus</i> ) reared with different dose radiation.*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ ) .....	18
Fig. 9. Change of superoxide dismutase (SOD; A) and catalase (CAT; B) activity in disk abalone ( <i>H. discus discus</i> ) reared with different dose radiation. *Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ ) .....	20
Fig. 10. Survival rate of small abalone ( <i>H. diversicolor aquatili</i> ) after the exposure of gamma radiation.*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ ) .....	21
Fig. 11. Variations of hemolymph factors of small abalone ( <i>H. diversicolor aquatili</i> ) reared with different dose radiation. *Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ ).....	22

Fig. 12. Change of superoxide dismutase (SOD; A) and catalase (CAT; B) activity in small abalone ( <i>H. diversicolor aquatili</i> ) reared with different dose radiation. *Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ ).....	24
Fig. 13. Mature disk abalone ( <i>H. discus discus</i> ) (A) and small abalone ( <i>H. diversicolor aquatili</i> ) (B).....	31
Fig. 14. Intermediate of cultured adherent diatoms. ....	32
Fig. 15. Fertilization of abalone for each interval (A) and fertilized eggs of abalone (B).	33
Fig. 16. Corrugated sheet spat collection with cultured diatoms .....	35
Fig. 17. Measurement of growth rate.....	36
Fig. 18. Culture of spat food organisms.....	41
Fig. 19. Embryonic development of fertilized eggs. Bar=100 $\mu\text{m}$ .....	43
Fig. 20. Development time of fertilized eggs disk abalone ( <i>H. discus discus</i> ) after the exposure of gamma radiation.....	43
Fig. 21. Development time of fertilized eggs small abalone ( <i>H. diversicolor aquatili</i> ) after the exposure of gamma radiation.....	44
Fig. 22. Number of disk abalone ( <i>H. discus discus</i> ) fertilized eggs(A) and fertility(B) for each gamma ray dose.*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ ).....	46
Fig. 23. Number of small abalone ( <i>H. diversicolor aquatili</i> ) fertilized eggs (A) and fertility (B) for gamma ray dose.*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ ).....	48
Fig. 24. Incidence rate of disk abalone ( <i>H. discus discus</i> ) abnormal eggs for each gamma ray dose. *Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ ). ....	49

Fig. 25. Incidence rate of small abalone ( <i>H. diversicolor aquatili</i> ) abnormal eggs for gamma ray dose. *Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ ).....	50
Fig. 26. Disk abalone ( <i>H. discus discus</i> ) Hatching rate (A) and attachment rate (B) for each gamma ray dose. *Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ ).....	52
Fig. 27. Small abalone ( <i>H. diversicolor aquatili</i> ) Hatching rate (A) and attachment rate (B) for each gamma ray dose. *Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ ). .....	54
Fig. 28. Variations of shell length (cm) for juvenile disk abalone ( <i>H. discus discus</i> ) reared with different dose radiation in the farm. *Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ ). .....	55
Fig. 29. Variations of shell length (cm) for juvenile small abalone ( <i>H. diversicolor aquatili</i> ) reared with different dose radiation in the farm. *Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ ). .....	56
Fig. 30. Effect of gamma radiation on $\beta$ -actin mRNA and myostatin mRNA of gill in disk abalone ( <i>H. discus discus</i> ) reared with different dose radiation. *Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ ). .....	57
Fig. 31. Survival of disk abalone ( <i>H. discus discus</i> ) reared with different dose radiation at 12 h after exposure to high-water temperature (30°C) stress.*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ ). .....	73

Fig. 32. Change of superoxide dismutase (SOD; A) and catalase (CAT; B) high-water temperature stress on activity in disk abalone (*H. discus discus*) reared with different dose radiation. \*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ ). ..... 75

Fig. 33. Effect of high water-temperature stress on Respiratory burst activity in disk abalone (*H. discus discus*) reared with different dose radiation. \*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ ). ..... 76

Fig. 34. Effect of high water-temperature stress on Phenoloxidase activity in disk abalone (*H. discus discus*) reared with different dose radiation. \*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ ). ..... 77

Fig. 35. Effect of high water-temperature stress on Lysozyme activity in disk abalone (*H. discus discus*) reared with different dose radiation. \*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ ). ..... 78

Fig. 36. Survival of small abalone (*H. diversicolor aquatili*) reared with different dose radiation at 12 h after exposure to high-water temperature(30°C) stress. \*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ ). ..... 79

Fig. 37. Change of superoxide dismutase (SOD; A) and catalase (CAT; B) high-water temperature stress on activity in small abalone (*H. diversicolor aquatili*) reared with different dose radiation. \*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ ). ..... 81

Fig. 38. Effect of high water-temperature stress on Respiratory burst activity in small abalone ( <i>H. diversicolor aquatili</i> ) reared with different dose radiation.*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ ). .....	82
Fig. 39. Effect of high water-temperature stress on Phenoloxidase activity in small abalone ( <i>H. diversicolor aquatili</i> ) reared with different dose radiation.*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ ). .....	83
Fig. 40. Effect of high water-temperature stress on Lysozyme activity in small abalone ( <i>H. diversicolor aquatili</i> ) reared with different dose radiation.*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ ). .....	84
Fig. 41. Survival of disk abalone ( <i>H. discus discus</i> ) reared with different dose radiation at 24 h after exposure to low-salinity(25‰) stress. *Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ )	85
Fig. 42. Change of superoxide dismutase (SOD; A) and catalase (CAT; B) low-salinity stress on activity in disk abalone ( <i>H. discus discus</i> ) reared with different dose radiation. *Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ ). .....	87
Fig. 43. Effect of low-salinity stress on Respiratory burst activity in disk abalone ( <i>H. discus discus</i> ) reared with different dose radiation.*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ )	88
Fig. 44. Effect of low-salinity stress on Phenoloxidase activity in disk abalone ( <i>H. discus discus</i> ) reared with different dose radiation.*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ )	89

Fig. 45. Effect of low-salinity stress on Lysozyme activity in disk abalone (*H. discus discus*) reared with different dose radiation.\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ )90

Fig. 46. Survival of small abalone (*H. diversicolor aquatili*) reared with different dose radiation at 24 h after exposure to low-salinity (25‰) stress.\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ ). ..... 91

Fig. 47. Change of superoxide dismutase (SOD; A) and catalase (CAT; B) low-salinity stress on activity in small abalone (*H. diversicolor aquatili*) reared with different dose radiation.\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ ). ..... 93

Fig. 48. Effect of low-salinity stress on Respiratory burst activity in small abalone (*H. diversicolor aquatili*) reared with different dose radiation.\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ ). ..... 94

Fig. 49. Effect of low-salinity stress on Phenoloxidase activity in small abalone (*H. diversicolor aquatili*) reared with different dose radiation.\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ ). ..... 95

Fig.50. Effect of low-salinity stress on Lysozyme activity in small abalone (*H. diversicolor aquatili*) reared with different dose radiation.\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ ). ..... 96



Fig. 51. Effect of gamma radiation on  $\beta$ -actin mRNA and Caspase-8 mRNA of gill in disk abalone (*H. discus discus*) reared with different dose radiation.\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ ) ..... 97

Fig. 52. Effect of high water-temperature stress on  $\beta$ -actin mRNA and HSP 70 mRNA of gill in disk abalone (*H. discus discus*) reared with different dose radiation.\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ ) ..... 98

Fig. 53. Effect of low water-salinity stress on  $\beta$ -actin mRNA and HSP 70 mRNA of gill in disk abalone (*H. discus discus*) reared with different dose radiation.\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ ) ..... 99



## Abstract

Climate change by global warming has raised the surface temperature of South Korea up by 1.03°C for the last 40 years, which is the fastest rate in the world. Furthermore, the rise of temperature in the sea is also found more obviously than ever. The rise causes the lead to subtropical climate. As evidence, it has been observed that butter fish (finny tribe in the Pacific) was caught in the net on Korean Peninsula. More fishes that have origin in subtropical climate regions and turbulence kind are captured. Furthermore, mitra squid *Loligo chinesis*, which used to be caught during July and August, is now caught on September. Judging from these, considerable changes are taking place in marine ecology. The rise of water temperature works as a physical and chemical stress factor to marine life. Particularly on abalone which is one kind of Gastropoda, the rise has a great impact because the species is limited to mobility and thus has very weak resistance to environmental change.

Therefore, National Fisheries Research and Development Institute (NFRDI) crossbred male *Haliotis discus hannai* with female *Haliotis sieboldii* in 2004, both of which grow fast and are firmly resistant to environmental change, in an attempt to develop an ew species that is resistant to sudden change in environment. The developed species was sea *Haliotis discus hannai*. Sea *Haliotis discus hannai* grows 20% faster than

*Haliotis discus hannai* and as fast as *Haliotis sieboldii*. In addition, it was found that sea *Haliotis discus hannai* has higher level of resistance to low water temperature(7°C) and high temperature (28°C) than *Haliotis discus hannai* in water temperature resistance test.

For breeding methods, there are hybrid breeding, selection breeding and mutation breeding. NFRDI used hybrid breeding to develop an abalone that grows fast and has high resistance.

Mutation breeding processes organism with radiation and chemicals because mutation takes place very rarely in organism. And mutants are selected from their posterior filial generation. When radiation is applied to it, the method is called radiation breeding.

When exposed to radiation, organism is mutated by the damage to part of its chromosome and DNA, so that its information signaling system is confused. Mutants are generated from the cells in which such change brings about. Radiation breeding method is a very excellent technique in developing new breeds and creating useful genetic resources. The method has steadily produced good outputs for about 70 years since 1930s. Currently about 2,600 mutated species are registered in FAO-LAEA database (Kim, 2008). After the Convention on Biological Diversity, securing biological genetic resources was considered to be the base of national competitiveness. In this respect, we can say that it is urgent to secure source technologies related to new agriculture biotechnology

that uses radiation and biotechnology.

The merits of radiation breeding include advantage of developing one or two genetic traits, excellence in improving inferior traits of a superior breed, more yields, better quality and higher resistance to harmful insects than those of existing breeds. Unlike GMO that artificially incorporates foreign genes into existing breeds, radiation breeding has been verified for its safety. It has been widely used in developing crops such as rice and bean, flowers like rose and chrysanthemum and fruit trees. In addition, radiation breeding requires less developing cost than other breeding technologies.

Furthermore, radiation breeding can be applied to plant breeds, to where hybrid breeding can't be applied or for which GMO breeding method hasn't been established. Therefore radiation breeding can be expected to develop native plants and foreign plant breeds that South Korea lacks, contributing to expanding the resource of breeds (genetic resources). (Kang, 2007)

To determine the impact of low-dose irradiation with gamma ray on *Haliotis discus discus*, the growth was observed through the physiological change and breeding. The death of parent abalones by irradiation with gamma ray has not occurred in all the experimental plots from the domestication period to the egg collection period. However, it was observed that the activity decreased in some of the

parent shellfishes of the 20Gy and 25Gy experimental plots. It seems that this phenomenon was due to the damage of DNA caused by irradiation with gamma ray. Also, it is estimated that this phenomenon was caused because it would consume energy to restore the damage of DNA.

As for those fertilized eggs that had been obtained by the artificial egg collection, the presence of mutation of fertilized eggs were observed under the microscope every hour after transferring the seawater of 1L that contained the fertilized eggs for each experimental plot. The mutation of fertilized eggs has not occurred at the control plot, 10, 15 and 20Gy; however, it has occurred at the 25Gy experimental plot. In the developmental process of fertilized eggs, the form of mutated eggs was observed at the 15, 20 and 25Gy with the exception of the control plot and 10Gy, whereas the occurrence has not progressed further.

The extent of occurrence delay could be related to the spawning of non-fertilized eggs in accordance with gamma ray amount and the sex maturity ratings of abalone for irradiation with gamma ray. Also, this experiment could verify the increase in the probability of mutation for the fertilized eggs by the irradiation; however, it could not verify that the morphological mutation of fertilized eggs was related to the mutation of Juvenile abalone.

To measure the hatching rate and attachment rate, the fertilized eggs were measured as they were housed and bred in the water tank that had

been set for each experimental plot. In the case of hatching rate, it was found to be approximately 50 percent at the control plot and the experimental plots of 10 and 15Gy; however, it was found to be approximately 30 percent at the experimental plots of 20 and 25Gy dose. This study produced F1 Juvenile abalone by irradiating abalone with gamma ray for the first time in South Korea and even applied for the relevant patent.

Also, the analysis on the remaining amount in Juvenile abalone that had been produced after being irradiated with gamma ray was performed. As for the production of genes, the oligonucleotide primer as to Myostatin, Caspase-8, HSP-70 mRNA that had been registered at NCBI in relation with abalone were produced and synthesized, and then the expression level and so on were investigated. As a result, no remaining amount of gamma ray was detected in all the experimental plots of 10Gy, 15Gy and 20Gy, which had been irradiated with gamma ray. It is believed that there would be no residual substance because gamma ray was a light rather than a substance residing in the body.

The expression of Caspase-8 mRNA that was immune gene expression in accordance with irradiation with gamma ray was found in all the experimental plots. Also, it was possible to confirm that the expression level was higher in the 20Gy experimental plot than the other experimental plots. It is believed from these results that the

experimental plot that had been irradiated with gamma ray 20Gy would have a better environmental tolerance.

The expression of Myostatin mRNA that was growth gene was not found in the control experimental plot; however, it could be confirmed that it was expressed at a high level in the gamma ray 20Gy experimental plot. It is believed from these results that a rapid growth of abalone development would be possible by irradiation with gamma ray of 20Gy.

Moreover, it could be confirmed that the expression of heat shock protein (HSP 70) mRNA, which was a stress protein, was found in the 20Gy experimental plot for water temperature and the 20Gy experimental plot for salinity. It is believed that the experimental plot that had been irradiated with gamma ray of 20Gy had a better environmental tolerance at 30°C as for the stress of water temperature, whereas the experimental plot that had been irradiated with gamma ray of 20Gy at 25psu as for the stress of salinity had a better self-immune mechanism ability.

At last, it was confirmed that marine organisms had a good result by using gamma ray as terrestrial organisms. Thus, it would be required to conduct a study in breeding and immune function for other more breeds. It should be necessary to conduct more diverse experimental analysis and long-term studies for comprehensive review on various changes.

## I. 종합서론

지구 온난화에 따른 기후 변화로 한반도 주변 해역은 수온 상승, 해수면의 수위가 변화되고 있으며 가시파래, 불가사리 및 해파리가 대량 발생되고 있고 유해적조가 자주 발생하고 있으며 특히 갯녹음 현상이 증가되고 있다(Kim, 2010). 이러한 현상은 해양 생태계에도 많은 영향을 미쳐 제주도 주변해역에 참다랑어 등 난류성 어종이 증가하고 7~8월에 어획되던 한치가 9월이 되어서야 어획되는 등 다양한 생태계의 변화를 유발시키고 있다. 생태계의 변화는 주요 수산 품종들의 자원 감소로도 이어져 양식산업의 중요성이 더욱 대두되고 있는 실정이다. 양식산업의 주요 품종으로는 넙치(*Paralichthys olivaceus*), 조피볼락(*Sebastes schlegeli*) 등과 같은 어류가 대부분을 차지하고 있으며, 어류를 제외하면 전복, 굴 등과 같은 패류 및 새우류와 같은 갑각류 등이 양식되고 있다. 그 중 전복은 세계 수산시장 변화에 대응한 미래 수산분야의 10대 양식산업 품종중의 하나로, 남해안 일대에서 많이 양식되고 있으며, 어류 양식과 비교할 때 충분한 경제적 가치와 경쟁력이 있는 품종으로 알려져 있다(Kim *et al.*, 2006).

이러한 전복류는 한류계인 북방전복(*H. discus hannai*), 난류계 대형종인 말전복(*H. gigant*), 왕전복(*H. gigantea*), 둥근전복(*H. discus discus*) 그리고 소형종인 오분자기(*H. diversicolor aquatilis*)가 우리 나라에서 서식하는 것으로 알려져 있다. 이들 중 북방전복은 전복 양식 생산량의 대부분을 차지하고 있으며 2010년에는 양식산 전복 6,228톤을 생산하여 세계 2위의 전복 생산국으로 세계의 주목을 받고 있다(KNSO, 2011). 전복 양식에 관한 연구는 국립수산물과학원에서 1971년 여수 근해산 북방전복의 준계 채묘시험을 실시하여 산



란유발자극, 수정률, 유생발생, 부착재료 및 치패의 생존율 등에 관한 연구를 수행하여 전복 종묘의 대량생산체제 기술을 확립하였지만(NFRDI, 2008), 제주도에만 서식하는 특산품인 오분자기에 관한 연구로는 생식주기 및 성분화와 생식소 발달(Kim *et al.*, 2012)등에 관한 연구가 진행되어 왔다. 제주도에 서식하는 오분자기의 생산량은 1990년대 150톤을 넘었으나, 최근에는 과도한 남획과 마을어장 환경변화로 인해 5톤 내외로 생산량이 급감하고 있는 실정이다(Kang, 2011). 전복과 오분자기는 성장속도가 느리고 상품이 되기까지 장기간을 필요로 하며 여름철 고수온 및 저염분에 의한 폐사 등의 여러가지 문제점을 가지고 있다.

이에 전복 양식 산업에 있어 성장률 향상을 위한 다양한 육종연구가 국내외적으로 수행되고 있으며(Hara and Kikuchi, 1992; Vinna, 2002; Park *et al.*, 2012), 특히 선발육종의 방법은 양식생물의 생산성 향상을 위한 가장 효과적인 방법으로서 진행되어 왔다(Gjedrem, 1983, 1997, 2000; Argue *et al.*, 2002; Gjerde *et al.*, 2004; Lucas *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2006). 일반적으로 전복을 포함한 패류 등은 자손수가 많아 육상동물 보다 선발육종의 효과가 큰 것으로 보고되고 있다(Olesen *et al.*, 2003). 선발육종법 이외에도 외래종의 도입이나 새로운 사육기술의 도입 및 잡종유도에 의한 교잡종의 생산 등으로 이용한 방법을 통하여 신품종의 개발 및 우량형질의 유도를 꾀하고 있다. 그 중 교잡유도 기술을 이용한 육종법은 속·종·품종 간의 서로 다른 장점이 하나의 개체로 합쳐진 다양한 잡종강세적 특징(heterosis, hybrid vigor)을 이용하여, 단기간에 적은 노력으로 유용생물의 생산량 및 이용부분의 증대, 내병성 및 관리의 적합성

등의 중요형질을 향상시키는 신품종 개발 기법이다(Gu *et al.*, 2000). 이러한 교잡육종에 의해 생산된 어종으로는 잉어류(Bakos *et al.*, 1978; Hulata, 1995), 메기류(Hume *et al.*, 1983)등의 담수어종과 연어류(Boeuf and Harache, 1984), 넙치류(Imslund and Jonassen, 2001), 돌돔류(Harada *et al.*, 1986; Kumai, 1984)등의 해수어종이 있으며 산업적으로 중요한 위치를 차지하고 있다.

한편, 본 연구에서 진행하고자 하는 육종방법중의 하나인 돌연변이 육종법은 자연에서의 돌연변이는 매우 낮은 빈도로 발생하므로 방사선 및 화학제를 생물체에 처리하여 그 후대에서 발생하는 유용한 변이체를 선발하여 육성하는 것을 돌연변이육종(mutation breeding)이라고 한다. 돌연변이 발생원인은 생물체에 방사선을 조사하면, 염색체나 DNA 의 일부변형에 의한 유전자 정보전달 신호체에 변화가 발생하며, 이러한 변화가 일어난 세포에서 개체가 발생하면 돌연변이체가 형성되는 것으로 생각된다. 이러한 돌연변이 육종기술은 신품종 개발 및 유용 유전자원을 창출하여 활용하는 것에 아주 뛰어난 기술이라고 할 수 있다.

돌연변이 육종은 1930 년대부터 약 70 년간 꾸준한 성과를 내오고 있어 FAO-LAEA 데이터베이스에 등록된 돌연변이 육성 품종만도 2,600 여종에 달한다(Kim, 2008). 생물다양성 협약 이후 생물유전자원의 확보가 국가 경쟁력의 근간으로 인식되고 있어 신규 유전자원 확보를 위한 방사선과 생물공학 기술을 이용한 새로운 농업생명공학 관련 원천기술 확보가 시급하다. 돌연변이 육종법의 장점으로는 1~2 개의 형질(유전자)의 개량에 유리하며, 기존 유망 품종의 단점형질을 개량하는데 뛰어나며 현재 재배하고 있는

품종보다 수확량의 증가, 품질의 향상 및 병충해에 강한 품종을 인위적으로 촉진시키는 방법을 가리킨다. 하지만 인위적으로 외래 유전자를 집어넣은 유전자변형기술(GMO)과는 달리 안전성이 입증되어 벼, 콩 등 식량작물 개량과 장미, 국화 등 화훼류 및 과수류 신품종 개발에 활발하게 이용되고 있으며 다른 육종 기술에 비교하여 상대적으로 개발비도 저렴한 편이다. 또한 감마선육종 기술은 교잡육종이 불가능하거나 GMO 육종기술이 미확립된 식물 육종이 가능하며 유전자원이 빈약한 자생식물 및 외국도입 식물 등의 품종 개발과 육종 소재(유전자원)의 확대에 기여할 수 있을 것으로 기대되고 있다(Kang, 2007). 일반적으로 육상 및 수생의 척추동물의 경우, 방사선 조사를 하였을 때 발생하는 생물 그 자체에 대한 유해성이 높을 뿐만 아니라 다음 세대를 생산 하기까지 태반을 통하여 모체에서 변이된 다양한 영향을 지속적으로 장기간 받을 수 있기 때문에 방사선을 이용한 돌연변이 유도는 윤리적인 측면에서도 많은 문제점을 가지고 있어 돌연변이 실험 대상으로 활용되기에는 매우 제한적일 수 밖에 없다. 그러나 해양의 무척추동물은 체내에서 성숙된 알을 대상으로 방사선을 조사하여 한번에 많은 개체를 확보할 수 있다는 장점 등 식물을 대상으로 하는 방사선 조사에서 가지는 유용한 특성을 가지고 있어 돌연변이 유도의 기법을 활용한 신품종의 개발이 충분히 가능할 것으로 판단된다. 그러나 현재까지 해양동물을 활용한 방사선 조사 돌연변이의 연구는 전무한 상태이다.

따라서 본 실험에서는 최근 자원이 급격하게 감소되고 경제성 확보에 많은 어려움을 가지고 있는 둥근전복(*H. discus discus*)과 오분자기(*H.*

*diversicolor aquatili*)를 이용하여 감마선 조사를 통한 속성장 및 환경 내성이 강한 전복류의 생산을 위하여 연구를 실시하고자 하였다.



## II. $^{60}\text{Co}$ 감마선 조사가 등근전복과 오분자기에 미치는 영향

### 1. 서론

체르노빌 방사능 누출사고와 일본의 후쿠시마 원전사고 등 최근 큰 방사능 유출 사건이 일어났다. 이러한 이유로 원자력 발전소를 세우거나 방사능을 이용한 기술은 국민들에게 인식이 좋지 않다. 하지만 방사선 기술은 많은 산업분야에서 활발히 이용하고 있고 안전성도 입증되고 있다.

감마선은 우리가 알고 있는 에너지의 한 가지 형태이고 자연 환경에서 언제나 접할 수 있으며 생물의 진화에도 지대한 영향을 끼쳐왔다. 또한 감마선 영향은 X-선이 발견된 이래 계속 주목되어 왔으며, 최근 들어 감마선 물질의 이용이 의료용과 공업용 등 다각적인 용도로 활용하면서 직·간접적으로 감마선에 노출될 기회가 많아졌고(Hall, 2000), 생활방사선 또한 날로 증가함에 따라 환경적인 측면에서도 관심이 높아짐으로써, 방사선 생물학 분야에 대한 올바른 이해가 절실히 요구되는 실정이다.

감마선은 입자가 갖는 에너지가 높기 때문에 세포가 조사받으면 세포내 분자는 이온화되거나 들뜬 상태로 되어, 흡수된 감마선 에너지가 소량일지라도 조사량에 따른 화학변화가 일어난다. 이러한 변화는 각 성분에 균일하게 일어나지만, DNA 에서 일어나는 변화는 세포의 기능에 중대한 영향을 미치기 때문에 DNA 의 작은 변화에도 세포는 죽거나 암세포로 변화는 등, 치명적인 장애를 받는다(Belli *et al.*, 2002; Smith and Fornace, 1995). 생물체를 구성하고 있는 분자가 감마선과의 화학반응으로 핵산, 단백질, 효소 등 생체고분자의 구조 및 기능이 변화하게 되고 나아가 염색체나 기타 세포내 구조의 손상을 초래하게 된다(Kang, 2004). 이런 작용은 감마선에 대한

감수성의 차이로 세포 및 조직의 종류에 따라 다르고, 특히 정원세포와 백혈구 등은 감수성이 높은 반면 근육세포와 신경세포 등은 감수성이 낮은 것으로 알려져 있으며, 실험동물에 따라서도 다양한 감수성의 차이를 나타내는 것으로 알려져 있다(Lee, 1994). X 선과  $\gamma$  선 같은 이온화 감마선은 UV 와 달리 DNA 손상을 초래하는데, 단일가닥 절단(SSB), 이중가닥 절단(DSB), DNA-DNA cross links 및 DNA-단백질 cross links 들을 유발하는데, 특히 이중가닥 DNA 절단은 감마선에 의해 초래되는 염색체 이상(chromosome aberration), 미소핵 발생, 세포사 및 변이(transformation) 등을 유발시키는 주된 요인으로 작용하는 것으로 보고되고 있다(Belli *et al.*, 2002). 또한 이중가닥 DNA 손상은 DNA 복구기전(DNA repair mechanism), 세포주기의 지연(cell cycle arrest) 및 세포고사(apoptosis) 등과 같은 신호전달 경로를 자극하는 것으로 알려져 있다(Smith and Fornace, 1995). 그 동안 감마선이 생식에 미치는 영향에 대한 평가는 생식세포에서 일어나는 생화학적, 형태학적 생식 능력의 변화 및 유전적 영향 등이 연구되었으며(Lindop, 1969), 감마선으로 인한 세포고사(apoptosis)와 세포 변형이 발암작용, 기형형성과 변이 유발(Bentur *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 2001)에 대해서도 광범위한 연구가 이루어져 왔다.

한편, 감마선의 각종 장애 경감물질의 효과 측정에 가장 많이 사용되고 기본이 되는 지표는 혈액의 변화이다. 사람에게 있어서도 방사선 치료시 치료계획의 판단 기준으로 혈액 수치, 특히 림프구의 수치 변화를 사용하고 있으며, 원폭피해자 및 방사선 사고에 의한 피폭자에 대한 연구에서도 조혈기관 장애와 관련된 보고가 주를 이룬다(Kyoizumi *et al.*, 1989; Finch,

1987; Langlois *et al.*, 1987; Gale, 1990; Adams, 1984). 이상에서와 같이 감마선에 의한 연구는 육상 식물, 동물을 활용하여 세포에서의 생화학적, 형태학적, 유전적 영향 및 혈액의 수치 변화 등에 대한 연구가 대부분이다. 하지만 해양동물에 대한 방사선 조사 연구는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 등근전복과 오분자기의 방사선 돌연변이 유도를 위한 일환으로 선량별 감마선 조사를 실시하여 생존율 변화, 혈림프 수 변화, 항산화 효소 변화 등을 조사하고 hormesis 효과를 분석하여 돌연변이 육종법의 가능성 평가를 위하여 실험을 실시하였다.



## 2. 재료 및 방법

### 1) 모패관리

#### 1-1) 등근전복

감마선 조사가 등근전복에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험에 사용된 등근전복은 제주도 소재의 개인 양식장에서 구입하여 사용하였으며 등근전복의 경우 평균 각장  $8.86 \pm 0.06$  cm, 각폭  $6.01 \pm 0.11$  cm, 전중량  $103.07 \pm 2.26$  g 의 개체를 사용하여 감마선 조사 전 1 주 동안 수온  $23 \pm 0.3^\circ\text{C}$ , 염분  $32 \pm 0.2$  psu 의 수조에서 순치시켰으며 순치기간 중 먹이의 공급을 중단하였다.

#### 1-2) 오분자기

감마선 조사가 오분자기에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험에 사용된 오분자기는 제주도 소재의 어촌계에서 구입하여 사용하였으며 오분자기의 경우 평균 각장  $6.25 \pm 0.2$  cm, 각폭  $4.5 \pm 0.2$  cm, 전중량  $32.5 \pm 1.5$  g 의 개체를 사용하여 감마선 조사 전 1 주 동안 수온  $23 \pm 0.3^\circ\text{C}$ , 염분  $32 \pm 0.2$  psu 의 수조에서 순치시켰으며 순치기간 중 먹이의 공급을 중단하였다.



## 2) 감마선 조사용 케이스 제작

전복은 해양 무척추동물로서 장시간 공기중에 노출 시 폐사하게 되고, 이동성을 지니고 있으며 부착생활을 한다. 감마선 돌연변이를 유발하기 위해 전복의 이동성 제한과 전복의 부착 및 탈착시 스트레스를 최소화하는 케이스를 제작하였다. 케이스의 규격은 가로 10 cm, 세로 10 cm, 높이 5 cm 의 속이 빈 아크릴 상자로 전복의 부착 및 탈착을 쉽게 하기 위하여 앞면부를 이탈식으로 제작하였다. 이를 위하여 아크릴 박스 양 옆에 홈을 만들어서 앞면판의 이탈을 용이하게 하였다(Fig. 1).

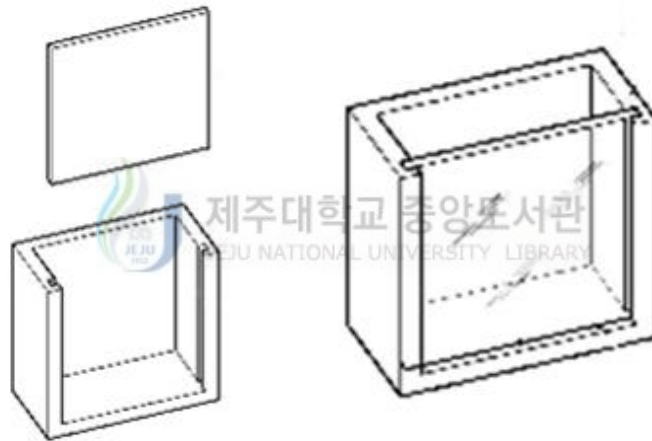


Fig. 1. Case for irradiation with gamma ray.

### 3) 감마선 조사

감마선 조사는 제주대학교 원자력과학기술연구소의 협조를 받아 저준위 조사시설( $^{60}\text{Co}$ )을 이용하여 실시하였다. 감마선조사를 위하여 제작된 케이스의 앞면부에 전복 모패가 부착될 수 있도록 하여 한 마리씩 부착시킨 후 이동을 제한하기 위하여 고무줄로 고정 시켰다. 등근전복 감마선 조사 실험구는 10, 15, 20 및 25 Gy 로 설정하여 조사하였다.

오분자기는 본 연구진에서 수행한 전복의 결과 중 성장이 가장 우수한 20 Gy 를 설정하여 조사하였다. 등근전복과 오분자기는 각 실험구별 암컷 25 마리, 수컷 10 마리를 사용하였고 조사선량은 Fricke dosimeter 로 측정하였다. control 로 감마선을 조사하지 않은 등근전복과 오분자기는 감마선 조사 시간 동안 공기 중에 노출시켰다(Fig. 2).



Fig. 2. Gamma irradiation to abalones.

#### 4) 혈림프(Hemolymph) 수 측정

감마선에 의한 장애를 파악하고 장애 경감 물질의 효과를 측정하기 위하여 가장 많이 사용되고 기본이 되는 지표는 혈액의 변화를 평가하는 것이며, 사람에게 있어서도 방사선 치료시 치료계획의 판단 기준으로 혈액 수치, 특히 림프구의 수치 변화를 사용하고 있으며, 원폭피해자 및 방사선 사고에 의한 피폭자에 대한 연구에서도 조혈기관 장애와 관련된 보고가 주를 이루고 있다(Kyoizumi *et al.*, 1989; Finch, 1987; Langlois *et al.*, 1987; Gale, 1990; Adams, 1984).

본 실험에서의 혈림프 수 측정은 실험 개시 후 0, 1, 2, 3, 4, 5 및 6 주째에 전복의 심장 옆 혈관으로부터 바늘 규격 26GX 1/2 인 1 ml 주사기를 이용하여 혈액을 채취한 후 0.9% 생리식염수로 10 배 희석하여 혈구 계수관을 이용하여 살아있는 혈구를 계수하였다.



#### 5) 항산화 효소 측정

항산화효소는 간부위를 적출하여 SOD 및 CAT 를 각각 분석하였다. 간부위를 적출 후 약 0.1 g 을 0.9% NaCl 에 3 회 세척한 다음 KCl (1.17%)을 함유한 100 mM phosphate buffer (pH 7.4)를 첨가하여 균질화 하였고, 균질화된 시료는 원심분리(1,000 rpm, 15 min, 4°C)에 의해 지방 및 침전물을 제거하였다. 균질액은 다시 원심분리(13,000 rpm, 20 min, 4°C)한 후 상등액을 항산화 효소 측정용 시료로 사용하였다(Fig. 3). 단백질 함량은 Lowry *et al.* (1951)의 방법에 따라 표준 단백질효소 BSA(bovine serum albumin)를 사용하여 spectrophotometer 를 이용 750 nm 에서 측정하였다(Fig. 4). SOD 는 pyrogallol 의 자동 산화율이 억제되는 양을 측정하는 Marklund and Marklund (1974)의 방법으로 측정하였으며, 50 mM phosphate buffer (pH 8.24) 1.3 ml에 간장 균질액 25  $\mu$ l을 넣은 후 45  $\mu$ l의 3mM progallol 용액을 첨가하여 spectrophotometer 를 이용하여 325 nm 의 파장에서 측정하였고, 효소활성의 1 단위는 반응액 중의 pyrogallol 의 산화를 50% 억제하는 효소의 양으로 정하였다(Fig. 5). CAT 활성도 측정은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 를 기질로 사용하여 spectrophotometer 에 의해 240 nm 파장에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 가 환원되어 감소하는 흡광도로서 효소 활성도를 측정하는 Nelson and Kiesow (1972)의 방법에 의하여 측정하였으며, 효소 활성도의 단위는 1 분간 1 mg 의 단백질이 반응하여 환원시킨 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 nmol 로 나타내었다(Fig. 6).

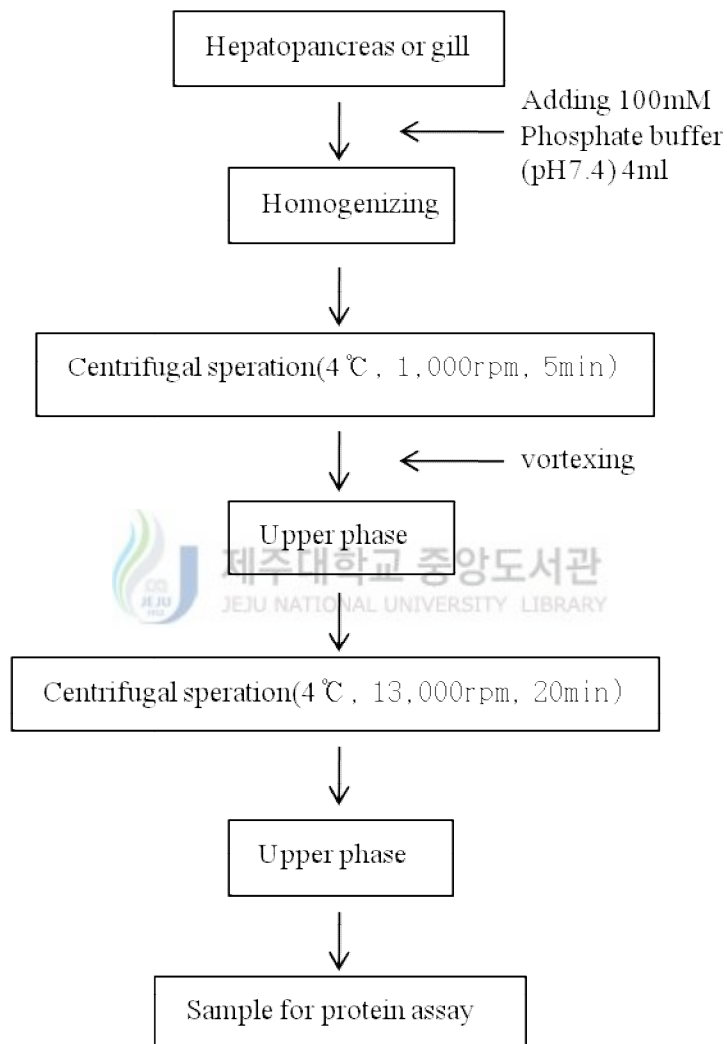


Fig. 3. Procedures for extraction of protein

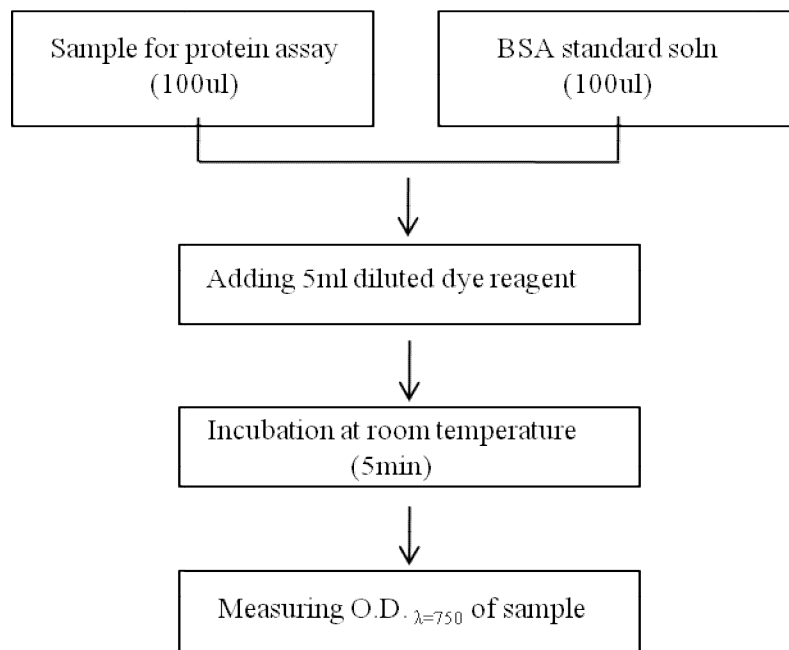


Fig. 4. Procedures for protein assay by Lowery method.

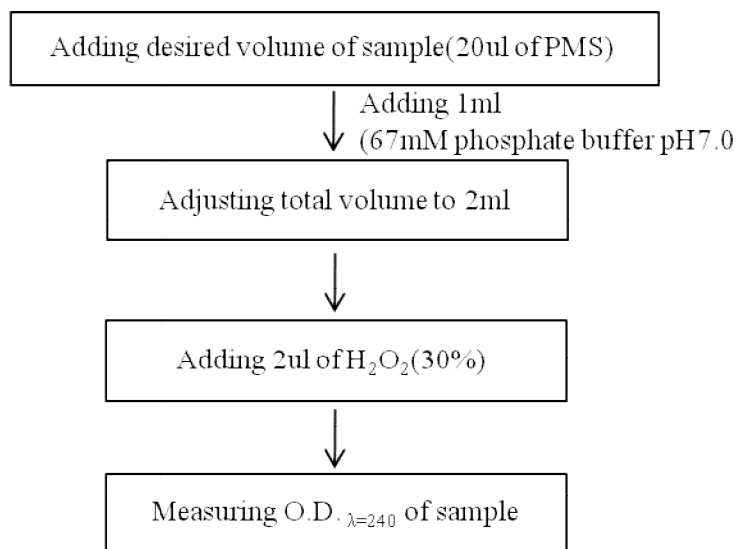


Fig. 5. Procedures for measurement of catalase activity.

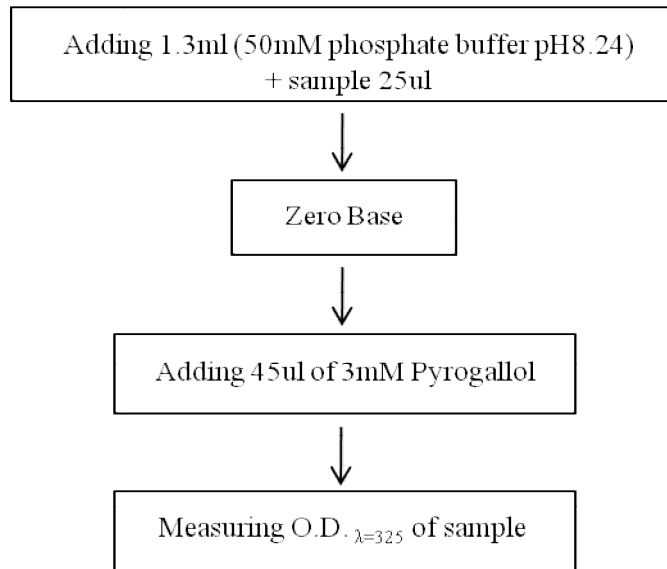


Fig. 6. Procedures for measurement of SOD activity.

#### 6) 통계처리

각 실험에서 얻어진 자료에 대한 값의 유의차 유무는,  $P$  값이 0.05 보다 작은 경우를 유의 하다고 판정하였다. 반복 실험의 SPSS 통계 패키지에 의한 ANOVA 로 분석하여 Student's t-test 로 분석하여 결과는 평균±표준오차로 나타내었다.

### 3. 결과

#### 1) 감마선 선량에 따른 둥근전복 hormesis 변화

##### 1-1) 생존율 변화

감마선 조사를 위한 전복 순치 기간 및 채란 시까지 모든 실험구에서 100%의 생존율을 나타내었다. 하지만 감마선 조사 후 2 주까지는 폐사하는 개체가 발생하지 않았으나 3 주째부터 폐사하는 개체가 발생하였고 control, 15 Gy, 20 Gy 에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 하지만 10 Gy 와 25 Gy 에서는 3 주째부터 폐사량이 증가함에 따라서 6 주째에 10 Gy 에서는 82%의 생존율을 나타내었고 25 Gy 에서는 62%의 생존율을 나타내어 다른 실험구에 비하여 유의적으로 생존율이 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 7). 이러한 결과를 보면 15 Gy, 20 Gy 에서 hormesis 현상이 나타나 방사선 조사 후에 오히려 생존율이 높아지는 결과로 추정된다.

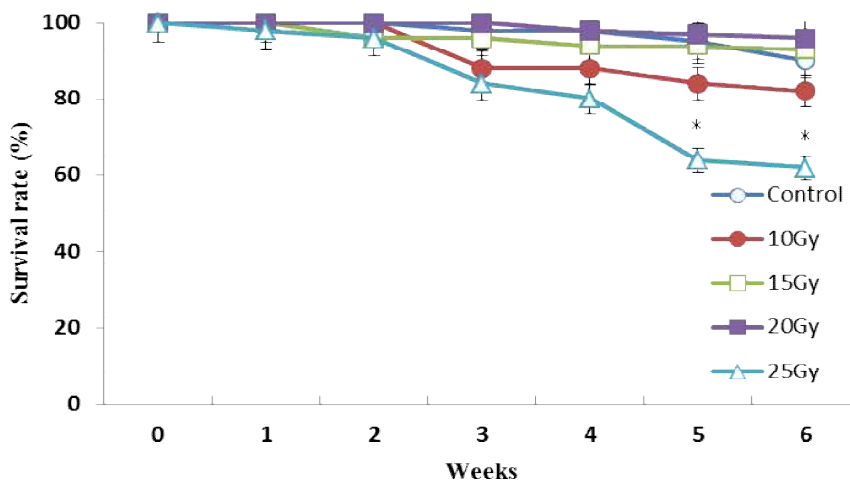


Fig. 7. Survival rate of disk abalone (*H. discus discus*) after the exposure of gamma radiation.

\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P < 0.05$ ).



1-2) 혈림프수 변화

감마선 선량별로 인한 혈구수의 변화는 감마선 조사 0 주에서 6 주까지 관찰하였다. 모든 실험구에서 1 주까지는 감소하는 경향을 나타내었으나 2 주부터 15 Gy, 20 Gy 에서는 증가하는 경향을 나타내었다. 특히 20 Gy 에서는 6 주까지 유의적으로 증가하는 경향을 나타내었고, 6 주째에 15 Gy 는 control 과 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 이에 반해 10 Gy, 25 Gy 에서는 기간이 지남에 따라 서서히 감소하는 경향을 나타내었으며 실험 개시 후 4 주째부터는 유의적으로 감소하는 현상을 나타내었다( $P < 0.05$ , Fig. 8).

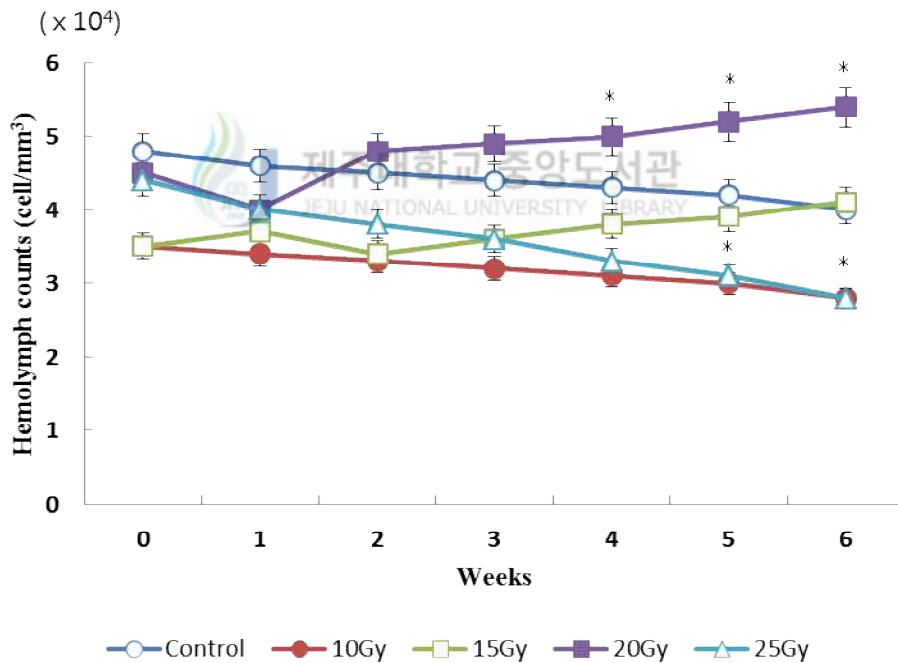


Fig. 8. Variations of hemolymph factors of disk abalone (*H. discus discus*) reared with different dose radiation.

\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P < 0.05$ ).

### 1-3) 항산화효소 변화

감마선 선량별 조사에 의한 SOD 와 CAT 효소를 확인해 본 결과, SOD 효소인 경우에는 20 Gy 에서 실험 개시 이후, 전반적으로 control 에 비해 높은 수치를 유지하는 경향을 나타내었다( $P < 0.05$ , Fig. 9-A)).

CAT 효소인 경우에는 15 Gy 와 20 Gy 에서 control 에 비해 2 주 후부터 지속적으로 높은 수치를 나타내었다. 이러한 결과는 15 Gy 와 20 Gy 의 감마선 조사를 통하여 생체내의 유해한 활성산소의 농도를 낮추기 위하여 SOD 와 CAT 의 활성을 높여서 생존에 좋은 영향을 미친 결과라고 판단된다( $P < 0.05$ , Fig. 9-B)).



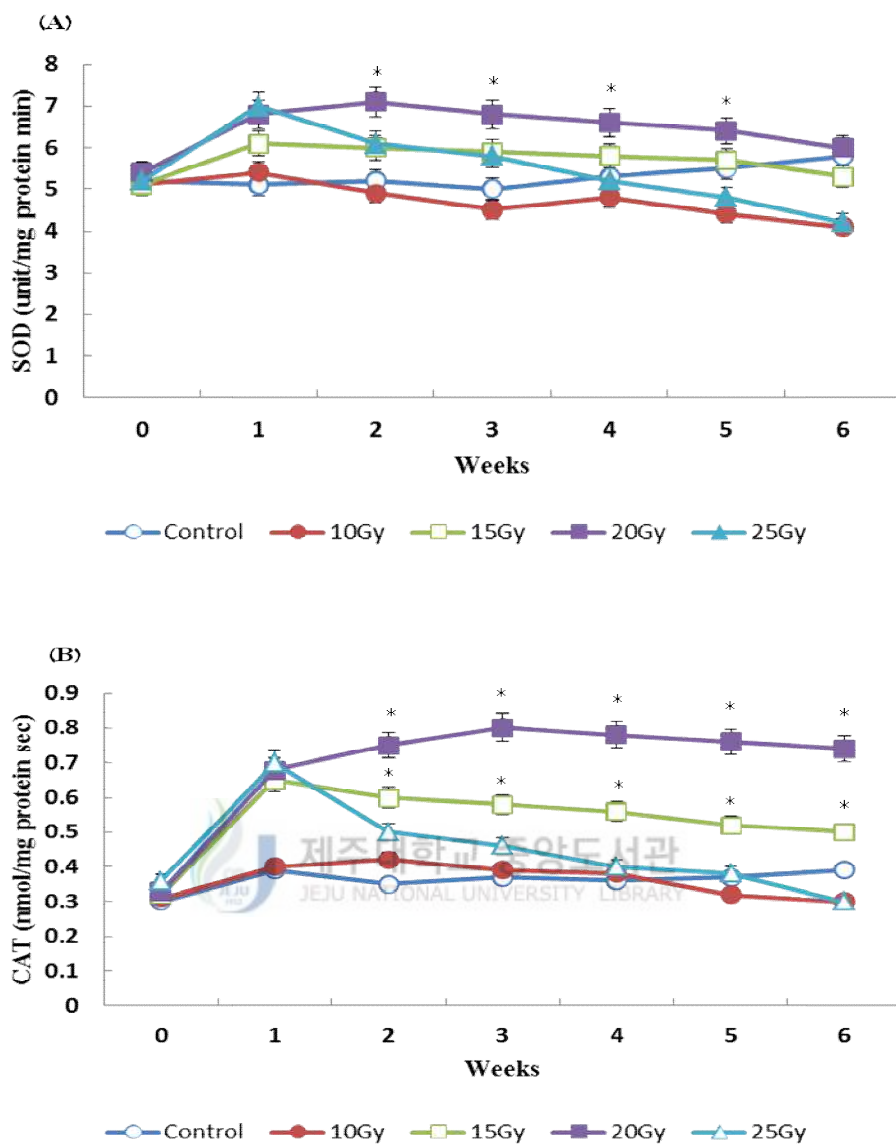


Fig. 9. Change of superoxide dismutase (SOD; A) and catalase (CAT; B) activity in disk abalone (*H. discus discus*) reared with different dose radiation. \*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P < 0.05$ ).

## 2) 감마선 조사에 따른 오분자기 hormesis 변화

### 2-1) 생존율 변화

감마선 조사를 위한 오분자기 순치 기간 및 채란 시까지 모든 실험구에서 100%의 생존율을 나타내었다. 하지만 감마선 조사 후 6 주 동안 양성과정 중 control 에서는 3 주째부터 폐사하는 개체가 발생하여 6 주째에 82%의 생존율을 나타내었고, 20 Gy 에서는 96%의 생존율을 나타내어 control 에 비해 20 Gy 에서 유의적으로 높은 생존율을 나타내었다(Fig. 10). 이러한 결과를 보면 등근전복과 마찬가지로 오분자기에서도 20 Gy 에서 hormesis 가 나타나는 것을 추정할 수 있다.

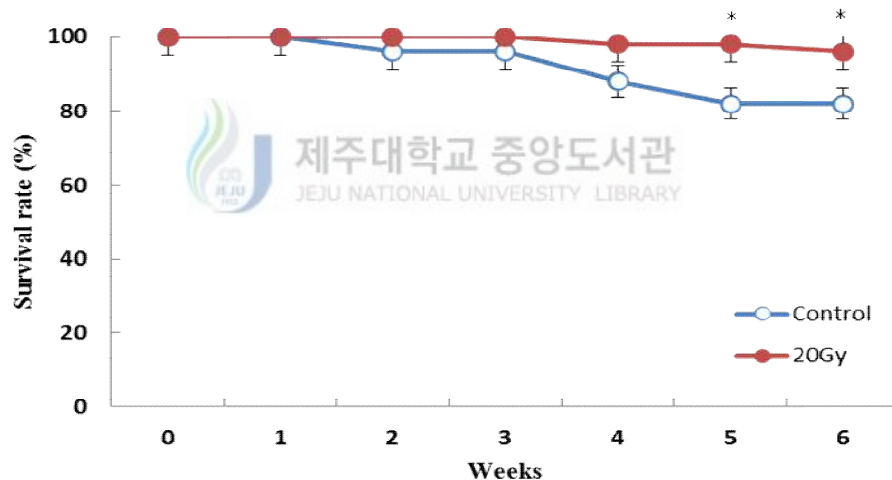


Fig. 10. Survival rate of small abalone (*H. diversicolor aquatili*) after the exposure of gamma radiation.

\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P < 0.05$ ).

## 2-2) 혈림프수 변화

control 실험구와 감마선 20 Gy 를 조사한 오분자기 혈구수의 변화를 감마선 조사 0 주에서 6 주까지 관찰하였다. control 에서는 1 주부터 4 주까지 급격하게 감소하였다가 안정화 되는 현상을 나타내었고 20 Gy 에서는 1 주까지 감소하였다가 control 에 비해 4 주 후부터 유의적으로 증가하는 현상을 나타내었다( $P < 0.05$ , Fig. 11).

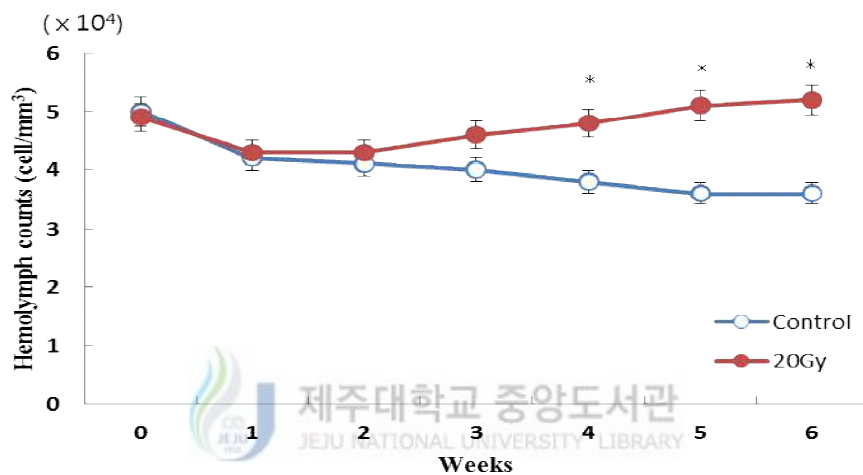


Fig. 11. Variations of hemolymph factors of small abalone (*H. diversicolor aquatili*) reared with different dose radiation.

\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P < 0.05$ ).

### 2-3) 항산화효소 변화

control 실험구와 감마선 20 Gy 를 조사한 오분자기 SOD 와 CAT 효소를 확인해 본 결과, SOD 효소인 경우 control 과 20 Gy 에서 1 주째에 급격히 증가하였다가 2 주째에는 감소하는 경향을 나타내었으나 2 주부터 6 주까지 control 에 비하여 20 Gy 에서 유의적으로 높게 나타나는 경향을 나타내었다( $P < 0.05$ , Fig. 12-A).

CAT 효소 역시 control 과 20 Gy 에서 1 주째에 증가하였다가 감소하는 경향을 나타내었고 6 주째까지 유의적인 차이는 나타나지 않았다( $P < 0.05$ , Fig. 12-B).



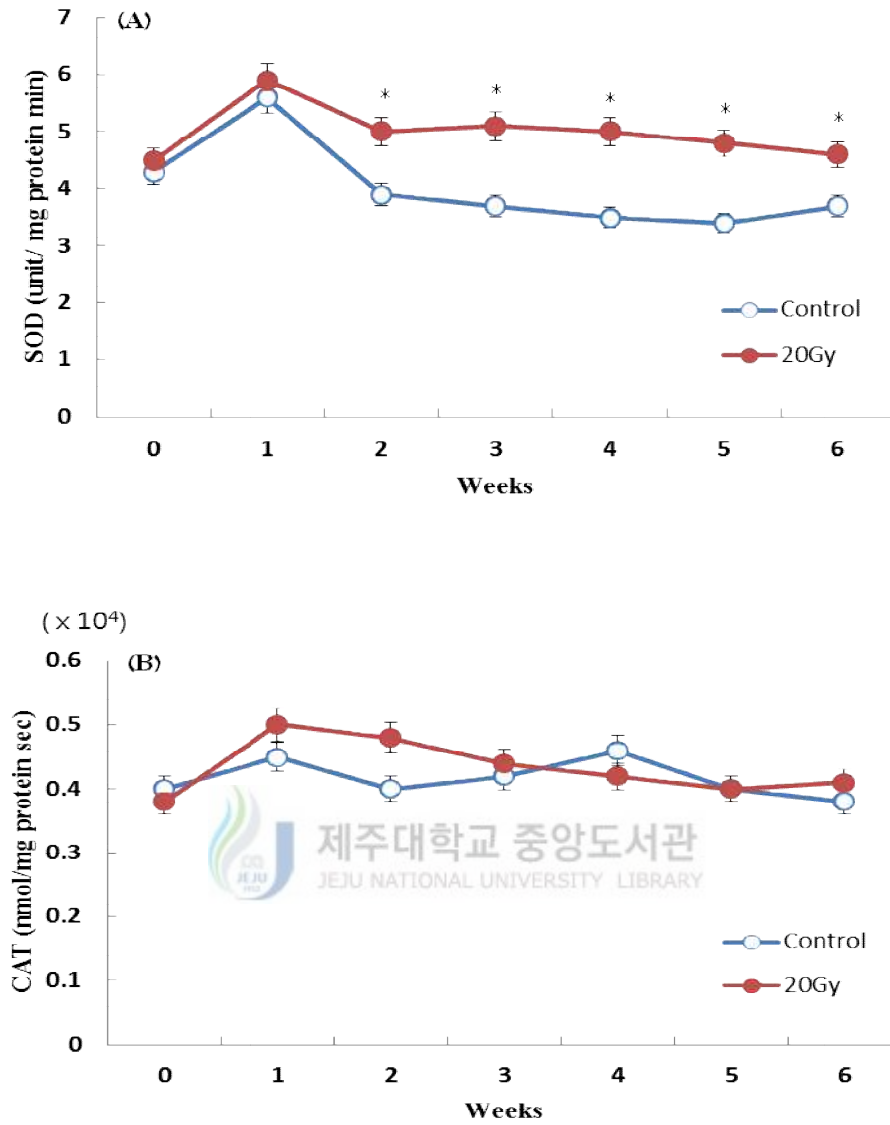


Fig. 12. Change of superoxide dismutase (SOD; A) and catalase (CAT; B) activity in small abalone (*H. diversicolor aquatili*) reared with different dose radiation. \*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P < 0.05$ ).

#### 4. 고찰

Hormesis란 자극 또는 축진을 의미하며 해롭지 않은 수준의 가벼운 스트레스, 미량의 독소 등 다양한 물리적, 화학적, 생물학적 방법으로 생명체에 자극을 주면 면역기능 증진, 질병 감소, 수명연장과 같이 생체기능에 유익한 효과를 주는 현상을 말한다. 감마선의 조사는 동물의 성장, 발달, 생식 능력 향상, 수명연장, 방사선 방호, 병원성 감염에 대한 저항력 획득, 면역력의 증강 및 암 발생억제 등을 유발하는 hormesis 현상을 유발시킨다(Lucky, 1982). 본 연구에서는 감마선 조사선량에 의한 hormesis의 영향을 알아보기 위하여 등근전복과 오분자기에 선량별로 감마선을 조사하여 생존율, 혈림프 수, 항산화 효소 변화 등을 관찰하였다. 그 결과 감마선 조사 후 저선량인 10 Gy와 고선량인 25 Gy에서 폐사율이 높게 나타났으나 15 Gy 및 20 Gy에서 폐사율이 다른 실험구에 비하여 낮게 나타나 15 Gy 및 20 Gy에서 등근전복에 hormesis 작용한 것으로 사료된다. 이러한 결과는 Kim *et al.* (2007)에서도 참전복에 감마선을 조사하여 생존율 및 성장 등을 조사한 결과 30 Gy 미만의 선량에서 hormesis의 효과를 유발한다고 보고한 것과 동일한 결과로 여겨지며 생존율 이외에도 hormesis의 효과 측정을 위하여 가장 많이 사용되고 기본이 되는 혈액을 측정하였다. 그 결과, 등근전복과 오분자기의 모두 감마선 조사 직후에는 혈림프 수가 감소하였다가 시간이 경과함에 따라 회복되는 경향을 나타내었다.

Seung *et al.* (1975)은 흰 쥐에 저선량인 3~5 Gy의 방사선을 조사했을 때 혈액세포가 감소하였다가 점차 회복되는 경향을 나타내었다고 보고하였고



Olivieri *et al.*(1984)에서도 림프구를 이용한 실험에서 저선량 방사선에 노출된 림프구가 고선량의 방사선에 의해 유도되는 염색체 이상에 저항성을 갖게 된다는 적응 반응(adaptive response)을 보고하고 있다.

또한, 저선량 방사선에 노출된 작업자의 혈액 림프구에서 염색체 이상이 감소한다는 보고 등에서 알 수 있는 바와 같이 저항성이 유도는 저선량 감마선에 국한하지 않고 p90RSK, c-Fos 와 같은 미량의 각종 DNA 손상물질에 의해서도 유도되어 교차적응의 유발도 관찰되고 있다(Tuschl *et al.*, 1980; Liu *et al.*, 1987; Cai and Liu, 1990; Liu *et al.*, 1992; Wojcik and Streffer, 1994; Cai and Wang, 1995; Flores *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1996; Cai, 1999).

한편, 생물에서는 각종 스트레스에 의해 생성된 활성산소는 어떤 유해물질이나 약물 등에 노출되었을 때 병적 상태에서는 이들이 과다하게 생성되어 조직에 치명적인 손상을 입힐 수 있다(Goldberg and stern, 1977; Simon *et al.*, 1981; Moody and Hassan, 1982). 이러한 활성산소에 대하여 체내에서는 항산화 효소인 superoxide dismutase (SOD)와 catalase(CAT) 등을 생성하여 세포기능 손상을 막는 것으로 알려져 있으며, 그 중 SOD 는 superoxide radical( $O_2^-$ )를  $H_2O_2$  와  $O_2(2O_2^-+2H^+ \rightarrow H_2O_2+O_2)$ 로 전화시키며, 이 전환된  $H_2O_2$  를 CAT 가  $O_2$  와  $H_2O(2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O+O_2)$ 로 분해하여 활성산소가 형성하기 전에 생체에 무해한 분자로 전환시킨다(Forman and Fridovich, 1973). Zyuzikov *et al.*(2001)에 의하면 일반적으로 세포에 감마선 에너지를 조사하면 물리학적 변화 단계를 거쳐 수소원자(hydrogen, H), 수화전자(hydrated electron), 그리고 수산화기(hydroxyl radical  $\cdot OH$ ) 와 같은

일차 유리 기들이 형성된다 한다. 이러한 유리기들은 세포 내에서 단백질의 SH 기나 DNA 와 반응, 화학결합의 절단이나 가교결합의 형성 등 구조적 변화를 야기시키고 이로 인해 효소 활성화의 저하와 세포막의 불포화 지방산과 일련의 연쇄반응을 통하여 지질의 산화가 유발된다고 보고 하였다(Ozkan *et al.*, 2001). 모든 생체계에 있어서 효소활성에 변화를 일으키는데 소요되는 선량은 유전자 돌연변이나 염색체 손상 또는 세포생장이나 세포분열을 억제하는데 필요한 선량에 비하여 훨씬 크다. 그러나 생체의 효소를 변형시킬 수 있는 것보다 적은 선량의 방사선을 조사하여 효소의 양과 활성도를 측정해 보면 많은 변화가 나타난다. 식물의 양배추에서는 저선량 방사선 조사로 양배추의 CAT 효소 증가가 보고 되고 있다(Kim, 1999). 둥근전복과 오분자기에서도 감마선 조사 후 항산화 효소인 SOD 와 CAT 효소는 모든 실험구에서 급격하게 증가하였다가 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 감마선이 생체의 효소에 직접적으로 영향을 미쳐 감마선 조사 직후에는 스트레스에 의하여 SOD, CAT 가 증가 하였지만 점차 외부 스트레스에 대한 생체 방어 작용으로 인하여 감소한 것으로 판단된다.

이상에서와 같이 감마선 20 Gy 전후의 조사가 둥근전복 및 오분자기의 생존율, 혈액성상의 변화 및 항산화 효소의 활성증대 등의 효과를 나타내어 hormesis 작용을 유발하는 것으로 판단된다. 이러한 hormesis 의 효과는 두 종의 새로운 품종 개발을 위한 중요한 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 평가된다.

그러나 감마선 조사의 hormesis 현상에 대한 또 다른 지표의 평가와 수산의 주요 양식생물인 두 종의 경제성에 얼마나 큰 효과를 가지는지에 대해서는

보다 더 세밀한 연구가 이루어져야 할 것으로 판단된다. 그리고 이러한 hormesis 의 작용이 다음 세대로의 유전 여부에 대해서도 평가해야 할 것으로 여겨져 이에 대한 연구를 다음 장에서 진행하고자 한다.



### Ⅲ. $^{60}\text{Co}$ 감마선 조사 후 생산된 전복류 치패의 형질 변화

#### 1. 서론

인구 증가와 환경 변화 등에 의한 식량 자원의 고갈과 증가하는 수요를 대처하기 위해서는 자원의 개발과 종자의 발아력 향상 및 생육 증진을 통한 식량 생산성 향상 방법의 개발이 필수적이다(Kim *et al.*, 2007). 이러한 시급한 문제를 해결하기 위해 다양한 연구가 진행되어져 왔으며 최근에는 유해성 물질로 분류된 물질의 적정 처리에 의해 생물활성의 긍정적 효과를 유도할 수 있다는 hormesis 연구법으로 접근하고 있다(Lee *et al.*, 2002). Hormesis 영향으로는 발아와 출아 및 생장과 발육 촉진, 수량구성요소의 증가 등이 여러 작물에서 보고 되었는데(Luckey 1980; Miller and Miller 1987), 그 중 농업적 가치가 있는 배추(Kim *et al.*, 2000)의 경우, 종자 저장기간에 따라 적정선량은 다르지만 초기생육과 수량이 증가되었고, 고추(Lee *et al.*, 1998)와 참박(Kim *et al.*, 2000)에서도 초기생육이 증가 되었다. 이러한 방사선 hormesis 작용은 대상 식물, 종자상태 환경 및 재배조건, 측정하는 생리적 기능 및 선량률과 선량에 따라 다르게 나타난다. 해양동물인 참전복(*Haliotis discus hannai*)의 경우에도 30 Gy 이하의 선량에서 hormesis 를 가기는 것으로 보고되고 있다(Kim *et al.*, 2007). 하지만 hormesis 의 생물활성 메커니즘은 아직까지 확실히 정립되지 않았지만 몇가지 가능성은 제시되고 있다. 저선량의 방사선에 의해 DNA 복구 과정에 관련이 있는 단백질이 생성되거나 DNA 합성과정의 일시적으로 저해를 받아 조사된 세포가 회복될 수 있는 충분한 시간이 제공되고 동시에 자유 라디칼 소거종 등이 형성되어 저항성이 증가되는 것으로 알려져 있다(Ikushima *et al.*, 1996;

Feinendegen *et al.*, 1987). 그러나 이러한 이론들은 육상동물 및 식물의 실험 결과를 토대로 정립된 것이며 해양 동물의 경우에는 연구 결과가 거의 없는 실정이다. 이는 해양동물에 조사되는 방사선의 적정 선량 기준이 확립되지 않았고 방사선에 대한 윤리적인 측면에서도 많은 문제점을 가지고 있어 실험 대상으로 활용되기에는 매우 제한적일 수 밖에 없다. 따라서 해양동물에서 hormesis 현상에 대한 메커니즘을 정립하기 위해서는 많은 통계학적인 실험 자료와 다양한 수준에서의 연구자료를 수집하고 분석 해야 할 필요성이 있다. 이를 위하여 본 연구에서는 충분한 연구기간을 통하여 전복류인 등근전복과 오분자기의 모패에 감마선을 조사하여 산란, 수정란의 발생과정, 부화율, 부착률, 성장률 등 초기성장 형질변화를 조사하여 F1 세대의 돌연변이 형질의 유도 및 발현 정도에 대하여 분석하였다.



## 2. 재료 및 방법

### 1) 실험재료 및 사육관리

#### 1-1) 둥근전복

감마선 조사에 사용된 둥근전복은 제주시 소재의 개인 양식장에서 산란기에 가장 성숙한 모패를 구입하였고 평균 각장  $8.86 \pm 0.06$  cm, 각폭  $6.01 \pm 0.11$  cm, 전중량  $103.07 \pm 2.26$  g 의 개체를 사용하였다(Fig 13-A). 실험 전복은 감마선 조사 전 1 주 동안 수온  $23 \pm 0.3^\circ\text{C}$ , 염분  $32 \pm 0.2$  psu 의 수조에서 순치시켰으며 순치기간 중 먹이의 급이는 중단하였다.

#### 1-2) 오분자기

감마선 조사에 사용된 오분자기는 제주시 한림읍 어촌계에서 산란기에 가장 성숙한 모패를 구입하였고(Fig. 13-B), 평균 각장  $5.65 \pm 0.2$  cm, 각폭  $4.1 \pm 0.2$  cm, 전중량  $30.5 \pm 1.2$  g 실험 오분자기는 감마선 조사 전 1 주 동안 수온  $23 \pm 0.3^\circ\text{C}$ , 염분  $32 \pm 0.2$  psu 의 수조에서 순치시켰으며 순치기간 중 먹이의 급이는 중단하였다.

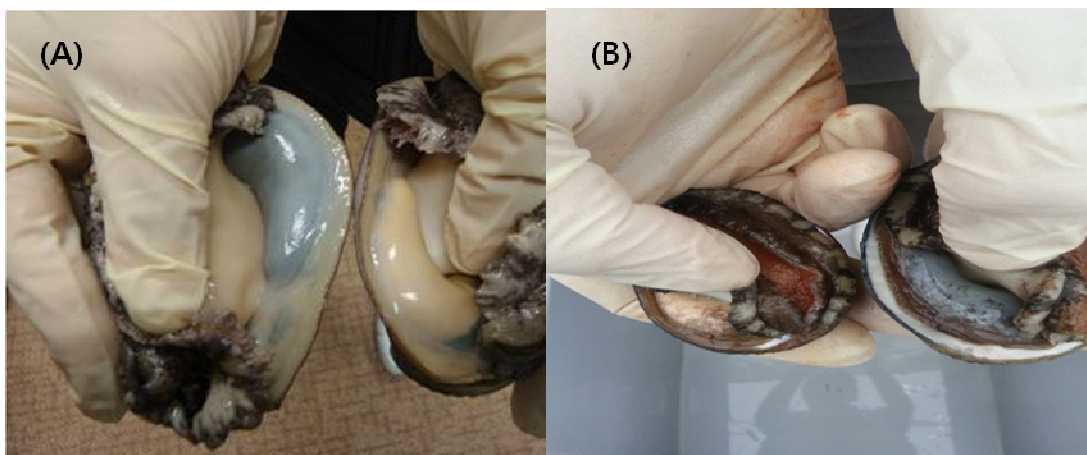


Fig. 13. Mature disk abalone (*H. discus discus*) (A) and small abalone (*H. diversicolor aquatili*) (B)

## 2) 부착 규조류 배양

전복의 천연 먹이생물인 부착 규조류 배양은 제주특별자치도 해양수산연구원에서 중간 배양한 원종 *Navicula sp*와 *Cocconeis suctellum*을 분양받아투명 염화비닐판 평과판(40×40cm)에 접종하였다. 부착규조류 접종 전에는 과판을 수조에 넣고 차염소산나트륨 1ℓ을 넣어 4 시간동안 소독하였으며 티오황산나트륨 200g을 넣어 중화시켰다. 해수는 1 μm 백필터로 여과하여 공급하였고 배양에 사용된 배지는 conwy 배지와 규산나트륨 등을 공급하면서 과판 표면에 부착 규조류를 발생 시켰다(Fig. 14).



Fig . 14. Intermediate of cultured adherent diatoms.

### 3) 감마선 조사 후 종자생산

감마선을 조사한 전복, 오분자기 모패는 일주일간 수온  $23\pm 0.3^{\circ}\text{C}$ 에서 1 주일간 순치 사육한 후 개인 전복 양식장의 도움을 받아 인공채란을 실시하였다. 인공채란 방법으로는 기온  $30^{\circ}\text{C}$ 에서 1 시간 동안 간출 자극 후 자외선조사해수 자극을 실시하여 모패의 인공산란을 유도하였다. 감마선 조사 선량별 정자와 난자를 수정 시킬 때에는 타 실험구와의 혼합을 방지하기 위하여 선량별로 구간을 설정하여 수정시켰으며(Fig. 15-A), 수정된 수정란은  $100\ \mu\text{m}$  물러가체를 사용하여 회수하였다(Fig. 15-B).

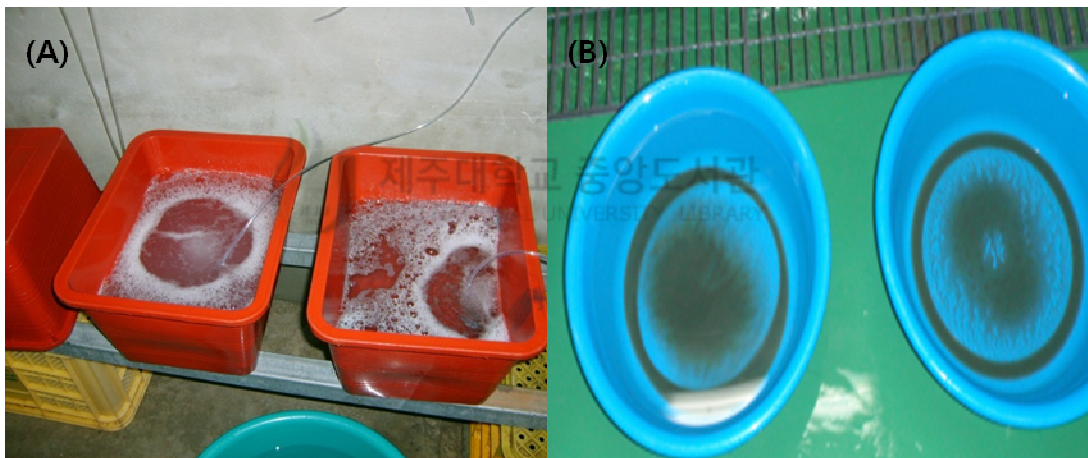


Fig. 15. Fertilization of abalone for each interval (A) and fertilized eggs of abalone (B).



#### 4) 난발생 과정 조사

감마선 조사 선량별로 수정된 수정란은 100  $\mu\text{m}$  물러가제를 사용하여 회수하였고 감마선 선량별 수정란의 일부를 실험실로 옮겨와 수정란의 발생 단계를 광학현미경(x400)으로 관찰하였다.

#### 5) 수정률 및 부화율 측정

수정률은 선량별로 회수된 수정란을 50 ml 유리비커에 옮겨 1 ml을 계수하여 전체 수정률을 구하였으며 부화율은 선량별로 수정란을 20 l 원형 플라스틱 용기에 수용한 후 부화한 유생과 부화하지 않은 유생을 각각 수거하여 1 l 유리비커에 옮겨 1 ml을 계수하여 전체 부화율을 측정하였다.

#### 6) 유생관리



전복의 수정란은 4 ton FRP(가로 1 m×세로 6 m×높이 70 cm) 15 개 수조에 각 실험구 별로 3 개의 수조에 수정란을 수용하였으며, 사육해수의 수온은 등근전복은  $20\pm 0.6^{\circ}\text{C}$ , 오분자기는  $24\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  이었다. 유각이 완전히 형성된 후 에어공급 및 유수식 시스템으로 유생을 사육하였으며, 채묘는 유생을 회수하여 미리 규조류가 배양된 파관에 실시하였다(Fig. 16).



Fig. 16. Corrugated sheet spat collection with cultured diatoms

#### 7) 부착률 측정

부착률은 선량별로 채모한 파판에서 각각 3 개의 파판을 무작위로 선택하여 파판에 부착한 전복, 오분자기를 계수하여 측정하였다.

#### 8) 성장률 측정

성장률은 부화 후 육안으로 확실히 식별이 가능한 90 일 후부터 버니아캘리포스를 이용해 각 실험구별 수조 파판에 부착하여 있는 전복 치패를 무작위 선별하여 크기를 측정하였다(Fig. 17).

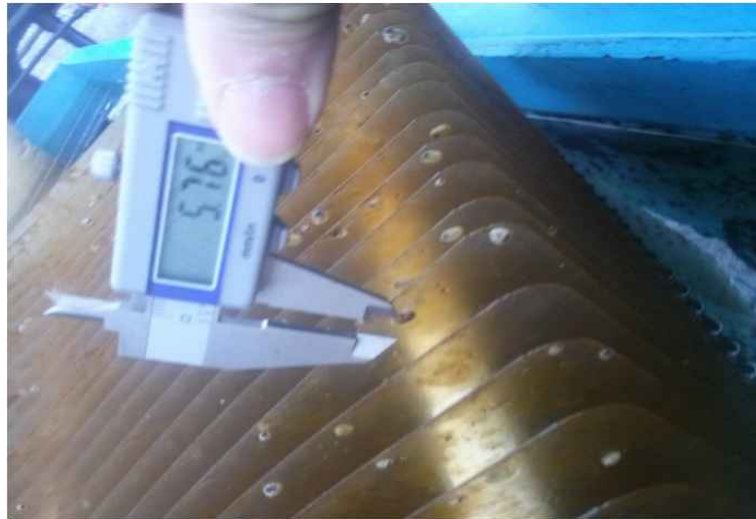


Fig. 17. Measurement of growth rate

#### 9) 성장유전자 mRNA 발현분석

전복의 성장유전자 발현을 위한 재료는 control 실험구, 10 Gy 실험구, 15 Gy 실험구, 20 Gy 실험구 치패 중 성장이 가장 빠른 개체를 30 마리씩 선별하여 실험을 실시하였다. 샘플링은 선택된 각각 3 마리의 아가미 조직을 채취하여  $-70^{\circ}\text{C}$ 로 보관하며 분석에 이용하였다.

## 10) RT-PCR 분석

동결된 아가미 조직에 Tri-reagent 500  $\mu\text{l}$ 를 가한다. 호모겐아이저로 시료를 균질화한 후 상온에서 5 분간 방치하였다. Chloroform 100  $\mu\text{l}$  가한 후 혼합하여 상온에서 3 분간 방치하였다. 원심분리(13,000 rpm, 4°C, 10 min) 후 상청액을 다른 tube 에 옮겨 동량의 차가운 isopropanol 을 넣어서 혼합하였다. 10 분간 상온에 방치 후 원심분리(13,000 rpm, 4°C, 10 min) 하였다. 상청액을 제거하고 차가운 75% ethanol 을 1 ml 넣어서 혼합 후 원심분리(13,000 rpm, 4°C, 5 min)하였다. 이를 3 회 반복하고 상청액을 제거하고 실온에서 1 시간동안 방치하여 ethanol 을 증발시켰다. 여기에 DEPC 25  $\mu\text{l}$  넣어서 total RNA 를 놓았다. 추출된 total RNA 는 -70°C에서 보관하여 실험에 사용하였으며, PROMEGA 사의 cDNA 합성 kit 인 ImProm reverse transcriptase kit A3800 을 이용하여 cDNA 를 합성하였다. 합성된 cDNA 를 증폭시키기 위해서 cDNA 2  $\mu\text{l}$ , 10x PCR buffer 5  $\mu\text{l}$ , MgCl 3  $\mu\text{l}$ , dNTP 1  $\mu\text{l}$ , primer (sence) 1  $\mu\text{l}$  (50 pmol), antisence 1  $\mu\text{l}$ , Taq DNA polymerase 0.5  $\mu\text{l}$  및 Nuclease-Free water 36.5  $\mu\text{l}$ 를 혼합하여 94°C에서 5 분간 predenaturation 시켜준 후 94°C에서 1 분간 denaturation, 50°C에서 45 초간 annealing, 72°C에서 1 분간 extension 조건으로 35 회 증폭하고, 이 후 72°C에서 5 분간 더 반응시켰다.

Myostatin mRNA 에 대한 oligonucleotide primer 를 제작 합성하였고, 양성대조로 사용하기 위해  $\beta$ -actin mRNA 를 제작하였다(Table 1). PCR 로 증폭된 산물은 1% agarose gel 에서 100V 로 전기영동 하여 분리하였으며, 100 bp DNA ladder 를 size marker 로 사용하여 UV transilluminator 하에서

사진을 촬영하여 이미지 분석 프로그램(Labworks 4.5)을 이용하여 mRNA 의 발현량을 정량하였다.

Table 1. Oligonucleotide of primers for RT-PCR

RNA species	Expected size	Primer sequence
β-actin mRNA	520bp	5'-GACHCAGATCATGTTYGARACC-3'
		5'-CCTTCTGCATRCGGTCAGC-3'
myostatin	432bp	5'-AACAAAGTGTTGACTGTGTGGCTGC-3'
		5'-AGTAGAGCATGTTGATGGGCGACA-3'

bp : base pairs

#### 11) Thermoluminescence(TL) 측정

TL 이란 열 발광측정법이며 재료를 넣고 가열하면 축적된 에너지로부터 빛이 나오게 되어 측정이 가능한 방법이다. 방사선은 우리나라 국민들에게 인식이 좋지 않지만 방사선 기술은 많은 산업분야에서 활발히 이용하고 있고 안전성도 입증되고 있다. 따라서 본 실험에서는 안전성을 입증하기 위하여 감마선 조사 후 생산된 치폐에 감마선 잔류량 남아 있는지 확인하기 위하여 측정하였다. TL 실험을 위한 재료는 감마선 조사한 10 Gy, 15 Gy 및 20 Gy 실험구에서 감마선 조사 후 생산 된 치폐를 각 10 마리씩을 살아있는 상태로 냉동하여 한국 원자력 연구원에 감마선 조사 잔류량 분석을 의뢰하였다.

## 12) 통계처리

각 실험에서 얻어진 자료에 대한 값의 유의차 유무는,  $P$  값이 0.05 보다 작은 경우를 유의 하다고 판정하였다. 반복 실험의 SPSS 통계 패키지에 의한 ANOVA 로 분석하여 Student' s t-test 로 분석하여 결과는 평균±표준오차로 나타내었다.



### 3. 결과

#### 1) 사육관리

##### 1-1) 등근전복

감마선 조사 후 전복 모패를 실험실로 옮겨 수온  $23\pm 0.3^{\circ}\text{C}$ , 염분  $32\pm 0.2$  psu 의 수조에 순치시켰으며, 폐사는 발생하지 않았으나 그 날 저녁에 산란하는 개체가 발견 되었다. 특히 20 Gy, 25 Gy 의 전복 모패에서 다른 실험구에 비하여 산란량의 유의적으로 높았으며 이는 선량이 높을수록 모패의 산란 자극원이 되었다고 판단된다.

##### 1-2) 오분자기

오분자기 모패 역시 감마선 조사 후 모패를 실험실로 옮겨 수온  $23\pm 0.3^{\circ}\text{C}$ , 염분  $32\pm 0.2$  psu 의 수조에 순치시켰으며, 폐사는 발생하지 않았으나 그 날 저녁에 산란하는 개체가 발견 되었다. 이는 등근전복과 마찬가지로 감마선 20 Gy 조사가 오분자기에 산란 자극원이 되는 것으로 판단된다.

## 2) 먹이생물의 공급

제주특별자치도 해양수산연구원에서 분양받은 부착규조류 *Navicula sp* 와 *Cocconeis suctellum* 의 초기 접종농도는 각각 200,000cell/mL 였다. 부착규조류를 파관에 초기 접종 후 질 좋은 규조류 배양을 위하여 conwy 배지와 규조류의 필수 영양염류인 규산나트륨을 공급하고 조도 5,000 lux 에서 지수상태로 배양관리 하였다. 부착 규조류의 성장을 파관 1cm × 1 cm 를 절단하여 도립현미경으로 관찰한 결과 파관 cm<sup>2</sup> 당 100×10<sup>4</sup> ~ 150×10<sup>4</sup> 의 밀도로 *Navicula sp.*와 *Cocconeis suctellum*가 배양 되었다(Fig. 18.)

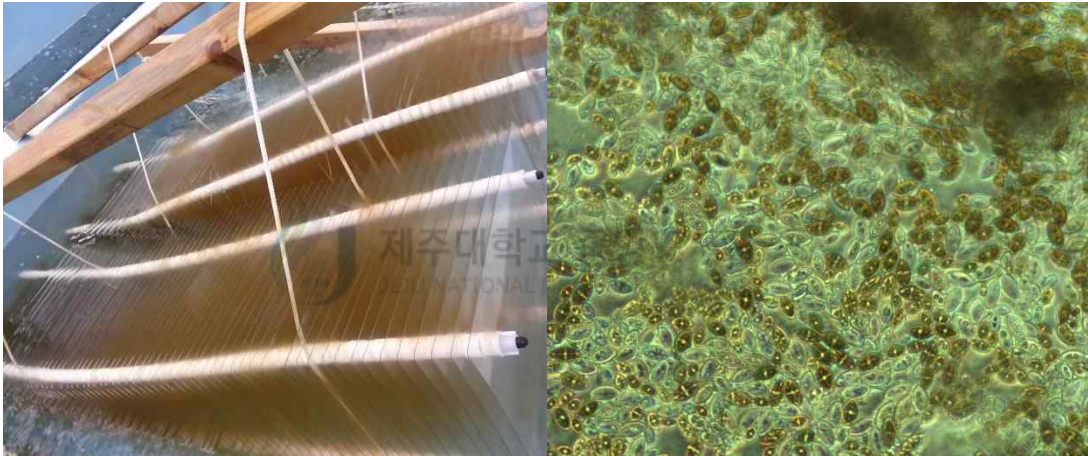


Fig. 18. Culture of spat food organisms.



### 3) 난 발생과정 변화

전복류의 알은 두터운 한천질에 쌓여 구형으로 되어 있으며 서로 분리되어 가라 앉는 분리 침성란이다. 실험구별 전복의 수정란의 초기 발생과정 속도를 조사한 결과 모든 실험구에서 수정란이 수정 되었다(Fig. 19). 모든 실험구에서 1 시간 30 분 후에는 2 세포기로 발생하였고 10 시간 후에는 control, 10 Gy, 15 Gy 에서만 담륜자기 유생으로 발생 하였고 20 Gy 는 12 시간, 25 Gy 는 14 시간 후에 담륜자기 유생으로 발생하였다. 또한 21 시간 후에는 control 과 10 Gy, 15 Gy 에서만 섬모를 이용해 수중을 부유하는 벨리저 유생으로 발생하였고 20 Gy 는 24 시간, 25 Gy 는 26 시간 후에 발생하여 Control 에 비하여 발생 속도가 늦어지는 결과가 관찰되었다. 또한 72 시간 후에도 control, 10 Gy, 15 Gy 에서만 부착기 유생으로 발생하였고 20 Gy 는 74 시간, 25 Gy 는 76 시간에 부착기 유생으로 발생되어 control 에 비해 발생속도가 늦어지는 결과를 나타내었다(Fig. 20). 오분자기 수정란 역시 수정 후 바로 현미경으로 관찰하였으며 control 과 20 Gy 실험구에서 수정란이 수정되었다. 1 시간 30 분 후에는 2 세포기로 발생하였고 8 시간 후에는 담륜자기 유생, 16 시간 후에는 벨리저기 유생으로 발생하였다. 하지만 부착기 유생으로는 control 실험구에서만 56 시간에 발생하였고, 20 Gy 실험구에서는 58 시간에 부착기 유생으로 발생하여 control 실험구에 비해 2 시간이 늦게 발생하는 것을 관찰하였다(Fig. 21). 전복은 담륜자기, 벨리저, 부착기 유생이 모두 늦게 발생 하였으나 오분자기는 부착기 유생 단계에서만 발생이 늦게 나타났다. 세포에 방사선을 조사하면 방사선은 세포분열을 지연시키는 효과를 나타내며 증식중인 세포에 방사선을 조사하면 분열지수의

감소와 총세포수 증가가 일시적으로 정지한다. 전복, 오분자기 모두 감마선 조사 후 수정란의 난발생 과정 중 20 Gy, 25 Gy 에서 다른 실험구에 비해 부착기 유생으로의 발생이 2 시간 정도 길어졌다. 이는 감마선 조사로 인해 세포분열이 지연된 것으로 사료 된다.

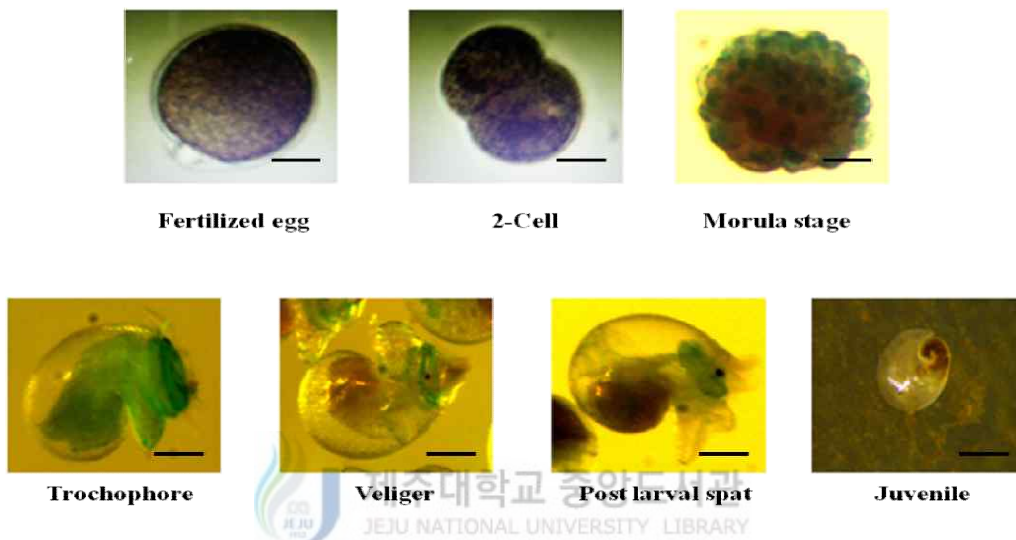


Fig. 19. Embryonic development of fertilized eggs. Bar=100  $\mu\text{m}$

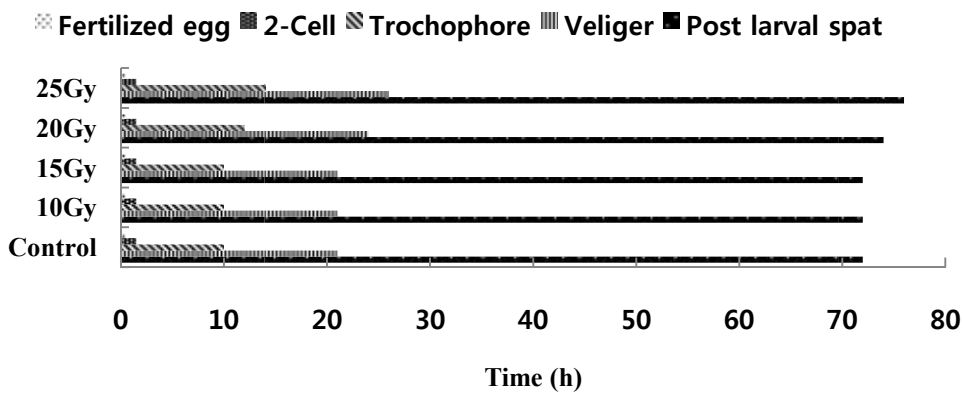


Fig. 20. Development time of fertilized eggs disk abalone (*H. discus discus*) after the exposure of gamma radiation.

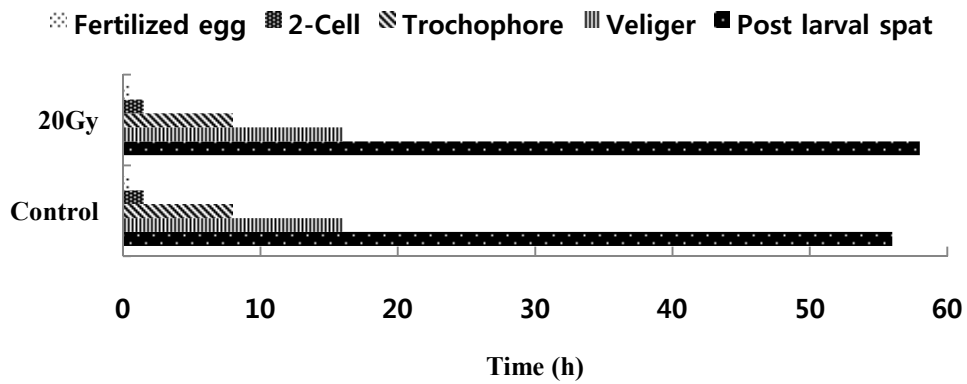


Fig. 21. Development time of fertilized eggs small abalone (*H. diversicolor aquatili*) after the exposure of gamma radiation.

#### 4) 수정란 수 및 수정률 변화

##### 4-1) 둥근전복

각 실험구별로 산란한 난의 수를 1 ml 피펫을 이용하여 광학현미경 Nikon PROFILE PROJECTOR V-12B 로 측정하였다. 산란한 난의 수는 control 에서는 약 700 만 개체, 10 Gy 에서는 약 570 만 개체, 15 Gy 에서는 약 550 만 개체, 20 Gy 에서는 약 440 만 개체, 25 Gy 에서는 약 210 만 개체가 산란한 것으로 확인되어 control 에 비하여 20 Gy, 25 Gy 에서 산란한 난의 수가 유의적으로 낮게 나타났다( $P < 0.05$ , Fig. 22-A).

산란한 난을 각 실험구마다 약 20 만 개체를 수거하여 수정된 것과 수정되지 않은 것을 계수하여 수정란과, 수정률을 각각 조사한 결과 control 에서는  $170,000 \pm 110$  개체, 10 Gy 에서는  $170,000 \pm 150$  개체, 15 Gy 에서는  $160,000 \pm 130$  개체, 20 Gy 에서는  $120,000 \pm 130$  개체, 25 Gy 에서는  $100,000 \pm 100$  개체의 수정란이 확인되어 산란한 난의 수와 마찬가지로 수정란 역시 control 에 비해 20 Gy, 25 Gy 에서 유의적으로 낮게 나타났다. 수정률은 control 과 10 Gy 에서 85%, 15 Gy 에서는 80%, 20 Gy 에서는 65%, 25 Gy 에서는 50%의 수정률이 확인되었다( $P < 0.05$ , Fig. 22-B).

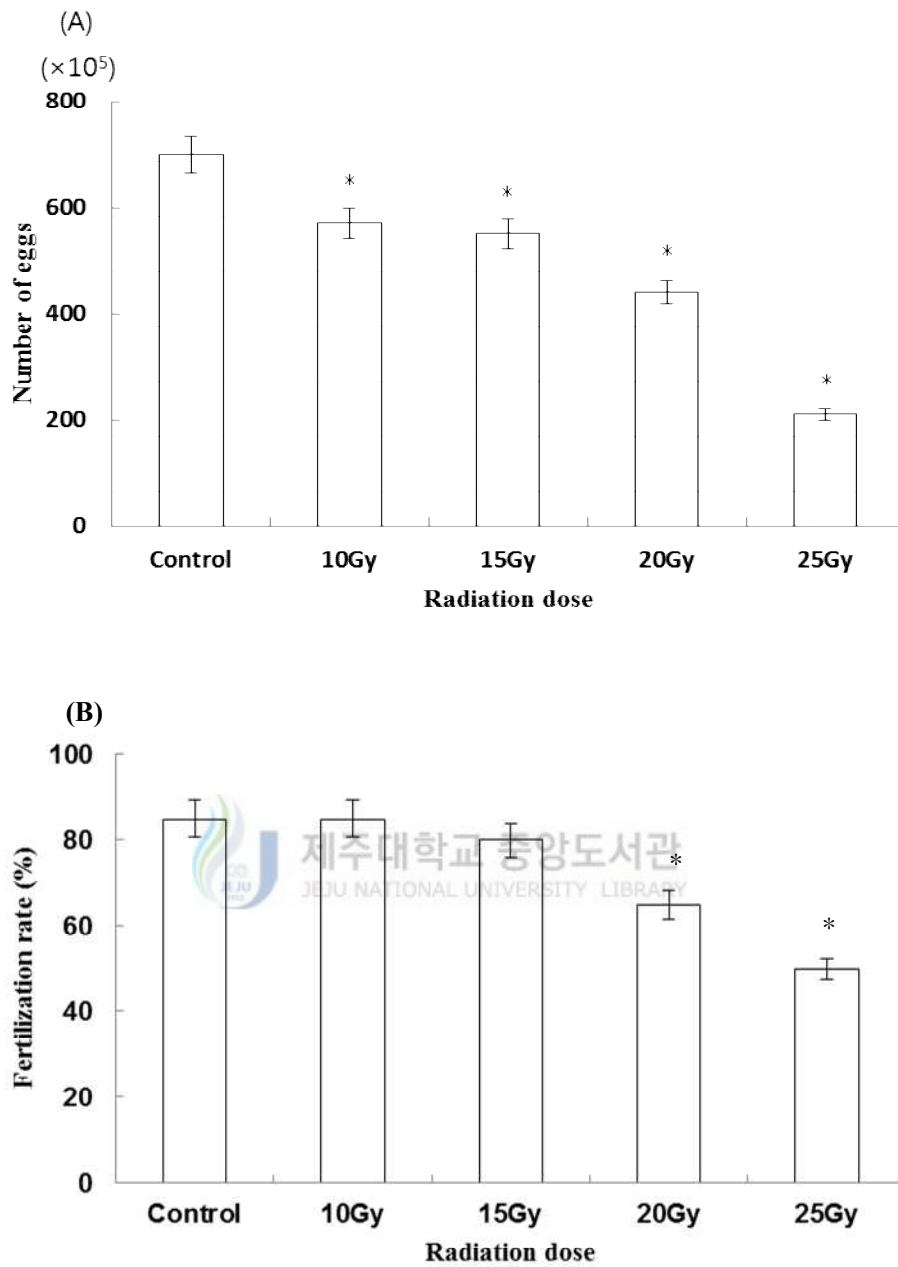


Fig. 22. Number of disk abalone (*H. discus discus*) fertilized eggs(A) and fertility(B)

for each gamma ray dose.

\*Significant difference between control group and gamma radiation group

based on the Student's t-test ( $P < 0.05$ ).

#### 4-2) 오분자기

오분자기 역시 각 실험구별로 산란한 난의 수를 1 ml 피펫을 이용하여 광학현미경 Nikon PROFILE PROJECTOR V-12B 로 측정하였다. control 에서는 약 200 만 개체, 20 Gy 에서는 약 100 만 개체가 확인되어 control 에 비하여 20 Gy 에서 유의적으로 낮게 나타났다( $P < 0.05$ , Fig. 23-A).

산란한 난을 각 실험구마다 약 20 만 개체를 수거하여 수정란과, 수정률을 각각 조사한 결과 control 에서는  $185,000 \pm 170$  개체, 20 Gy 에서는  $110,000 \pm 150$  개체의 수정란이 확인되어 등근전복과 마찬가지로 control 에 비하여 20 Gy 에서 유의적으로 낮게 나타났다.

수정률 역시 control 실험구에서는 85%, 20 Gy 에서는 55%로 control 에 비해 유의적으로 낮게 나타났다( $P < 0.05$ , Fig. 23-B).



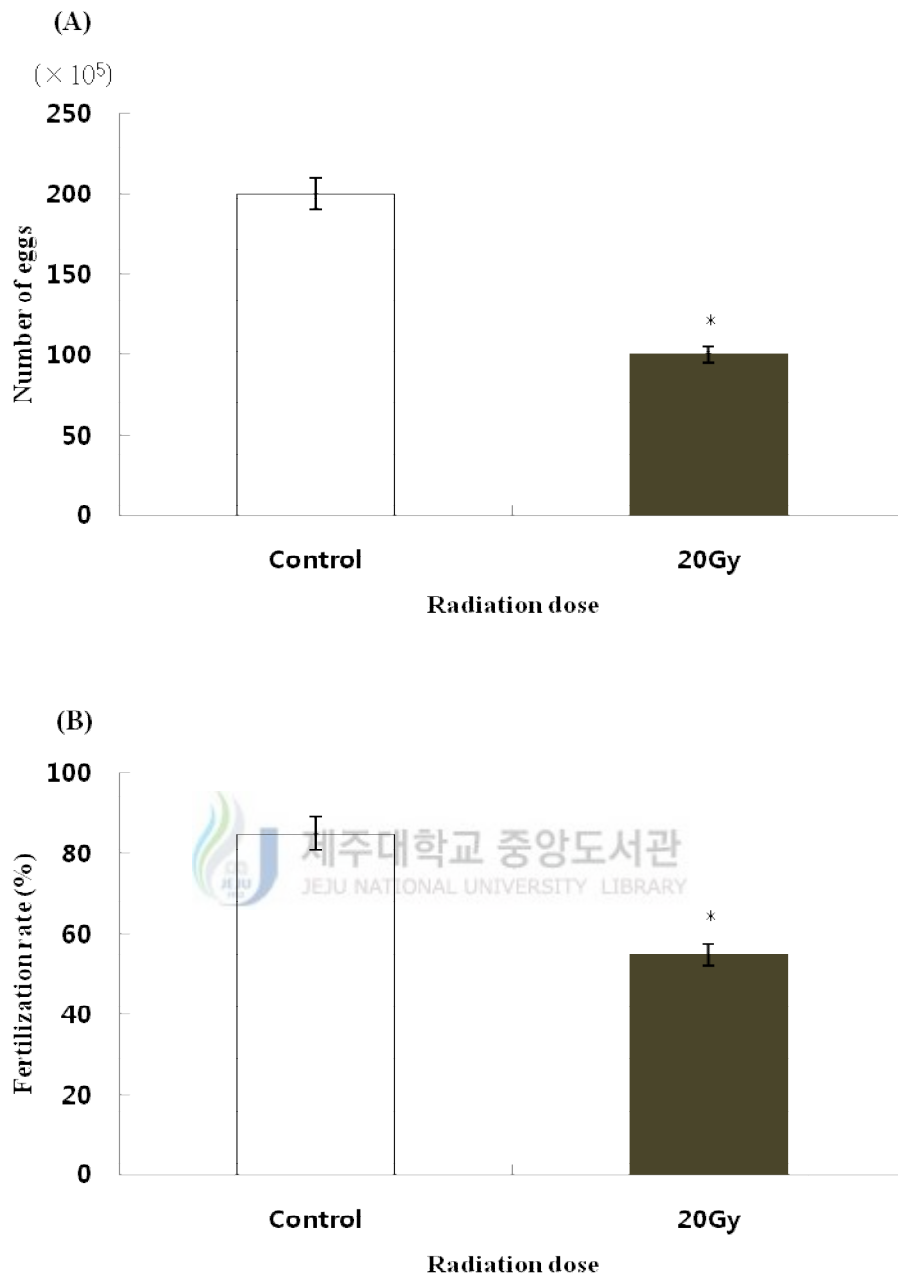


Fig. 23. Number of small abalone (*H. diversicolor aquatili*) fertilized eggs (A) and fertility (B) for gamma ray dose.

\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P < 0.05$ ).

## 5) 비정상 발생 난의 계수

### 5-1) 둥근전복

감마선 선량별로 수정된 난을 광학현미경(x400)으로 관찰하였다. control 에서는 7%, 10 Gy 에서는 12%, 15Gy 에서는 16%, 20 Gy 에서는 22%, 25 Gy 에서는 26% 비정상 발생 난으로 control 에 비하여 감마선 조사 실험구에서 비정상 발생 난의 유의적으로 높게 나타났다(Fig. 24). 이는 고선량에 따라 세포분열이 정상적이지 못해 돌연변이 난의 증가하는 것으로 사료된다.

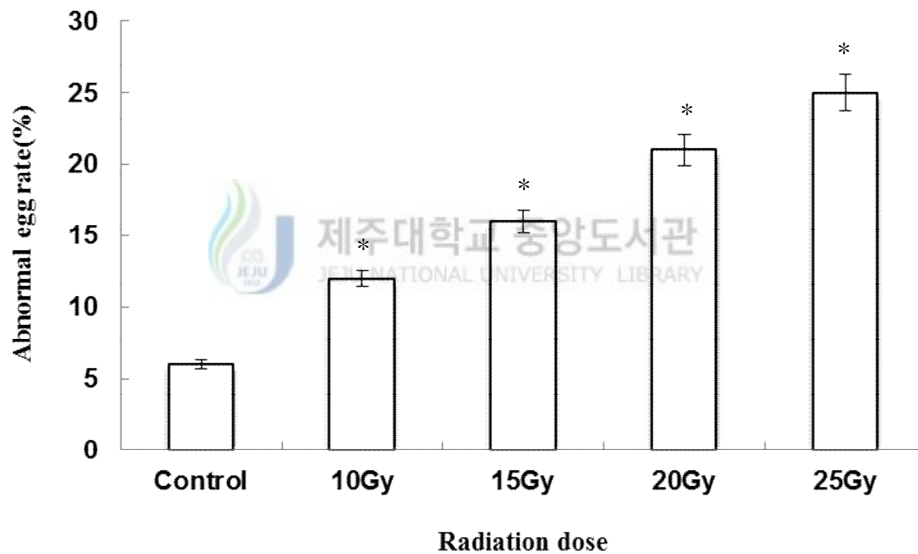


Fig. 24. Incidence rate of disk abalone (*H. discus discus*) abnormal eggs for each gamma ray dose.

\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P < 0.05$ ).



## 5-2) 오분자기

감마선 조사 후 수정된 수정란을 광학현미경(x400)으로 관찰하였다. control 에서는 6%, 20 Gy 에서는 37%가 비정상 발생 난으로 전복과 마찬가지로 감마선 조사 실험구에서 비정상 발생 난이 유의적으로 높게 나타났다 (Fig. 25). 이는 전복과 마찬가지로 고선량에 따라 세포분열이 정상적이지 못해 돌연변이 난의 증가하는 것으로 사료된다.

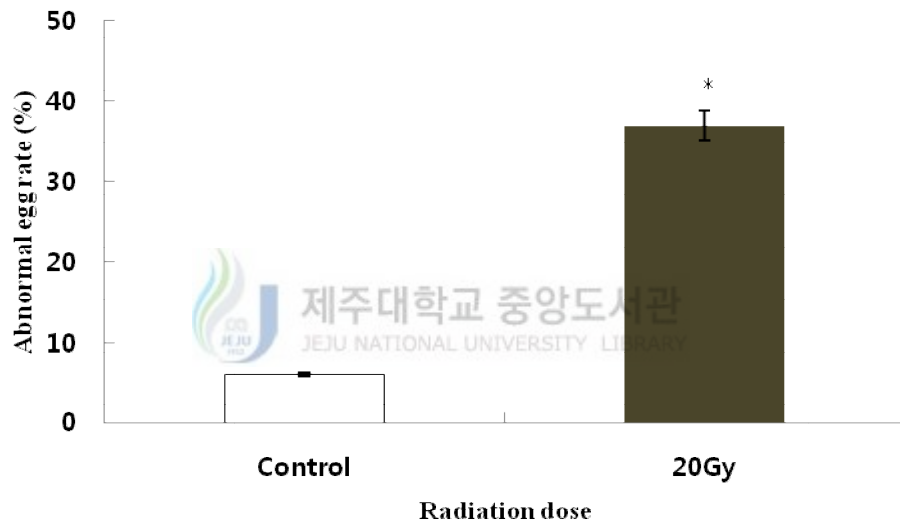


Fig. 25. Incidence rate of small abalone (*H. diversicolor aquatili*) abnormal eggs for gamma ray dose.

\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P < 0.05$ ).

## 6) 부화율 및 부착률 변화

### 6-1) 둥근전복

부화율 및 부착률을 측정하기 위하여 각 실험구 별로 세팅된 수조에 수정란을 수용, 사육하며 측정한 결과는 Fig.26 과 같다.

부화율은 control, 10 Gy, 15 Gy 에서는 약 50%정도의 부화율을 나타내었으나, 20 Gy, 25 Gy 선량 에서는 약 30%의 부화율을 나타내어 control, 10 Gy, 15 Gy 에 비하여 부화율의 유의적으로 낮게 나타나는 것으로 확인되었다(Fig. 26-A). control, 10 Gy, 15 Gy 에서는 평균 수온 20℃에서 수정부터 부화까지는 약 10 시간, 유각 형성까지는 약 21 시간, 채묘 단계까지는 72 시간이 소요되었으나 20 Gy 에서는 74 시간, 25 Gy 에서는 76 시간이 소요되어 각 실험구별로 유의적인 차이를 확인 할 수 있었다( $P<0.05$ ).

부착률의 경우에도 control, 10 Gy, 15 Gy 에서는 약 60%정도의 부착률을 나타내었으며, 20 Gy, 25 Gy 에서는 약 40%정도의 부착률을 나타내었다(Fig. 26-B). 특히 20 Gy, 25 Gy 에서 수정란의 수와 수정률, 부화율 및 부착률이 낮아 치패의 수가 타 실험구에 유의적으로 낮게 나타났다( $P<0.05$ ).

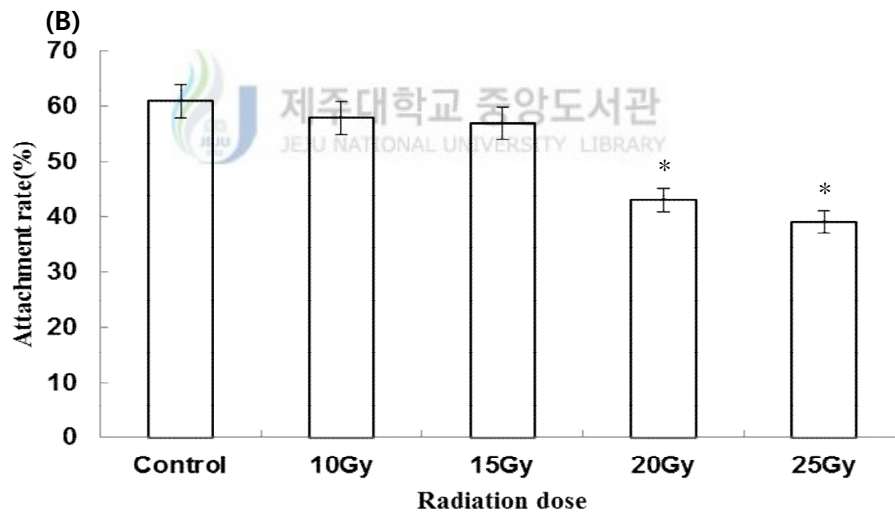
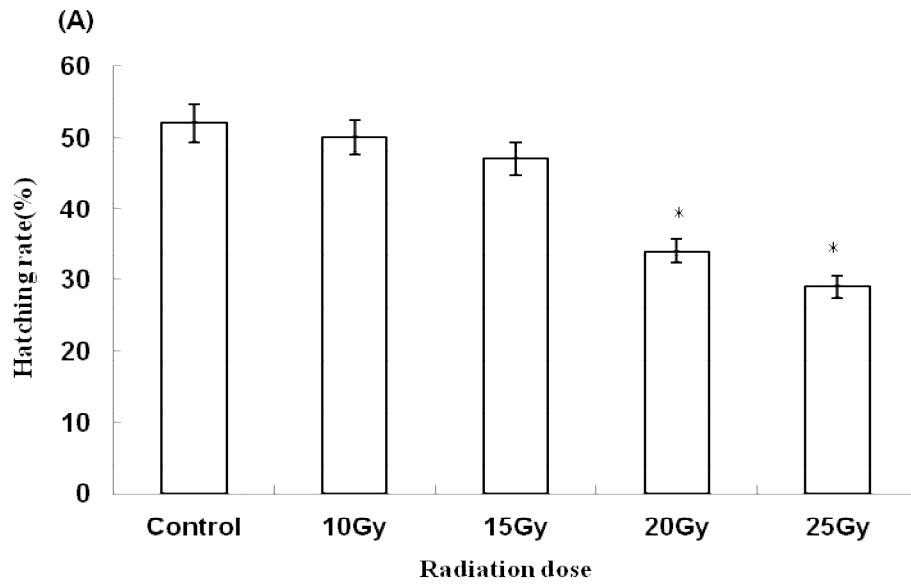


Fig. 26. Disk abalone (*H. discus discus*) Hatching rate (A) and attachment rate (B) for each gamma ray dose.

\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P < 0.05$ ).

## 6-2) 오분자기

부화율 및 부착률을 측정하기 위하여 각 실험구 별로 세팅된 수조에 수정란을 수용, 사육하며 측정한 결과는 Fig. 27 과 같다. 부화율은 control 에서는 약 70%정도의 부화율을 나타내었으며, 20 Gy 에서는 약 30%의 부화율을 나타내었다(Fig. 27-A). Control, 20 Gy 에서는 평균 수온 24℃에서 수정부터 부화까지는 약 8 시간, 유각 형성까지는 약 16 시간, 채묘 단계까지는 56 시간이 소요되었으나 20 Gy 에서는 58 시간이 소요되어 유의적인 차이를 확인 할 수 있었다( $P < 0.05$ ).

부착률의 경우에는 control 에서는 약 80%정도의 부착률을 나타내었고, 20 Gy 에서는 약 65%정도의 부착률을 나타내었다(Fig. 27-B). 오분자기는 하계산란형 동물이며 여름철에는 수온이 높아 전복에 비하여 부화, 유각형성 및 채묘단계 시간이 빠르게 나타났다. 또한 유생 사육기간이 짧아 사육하기가 쉬어 부착률이 전복에 비하여 높게 나타난 것으로 사료된다.

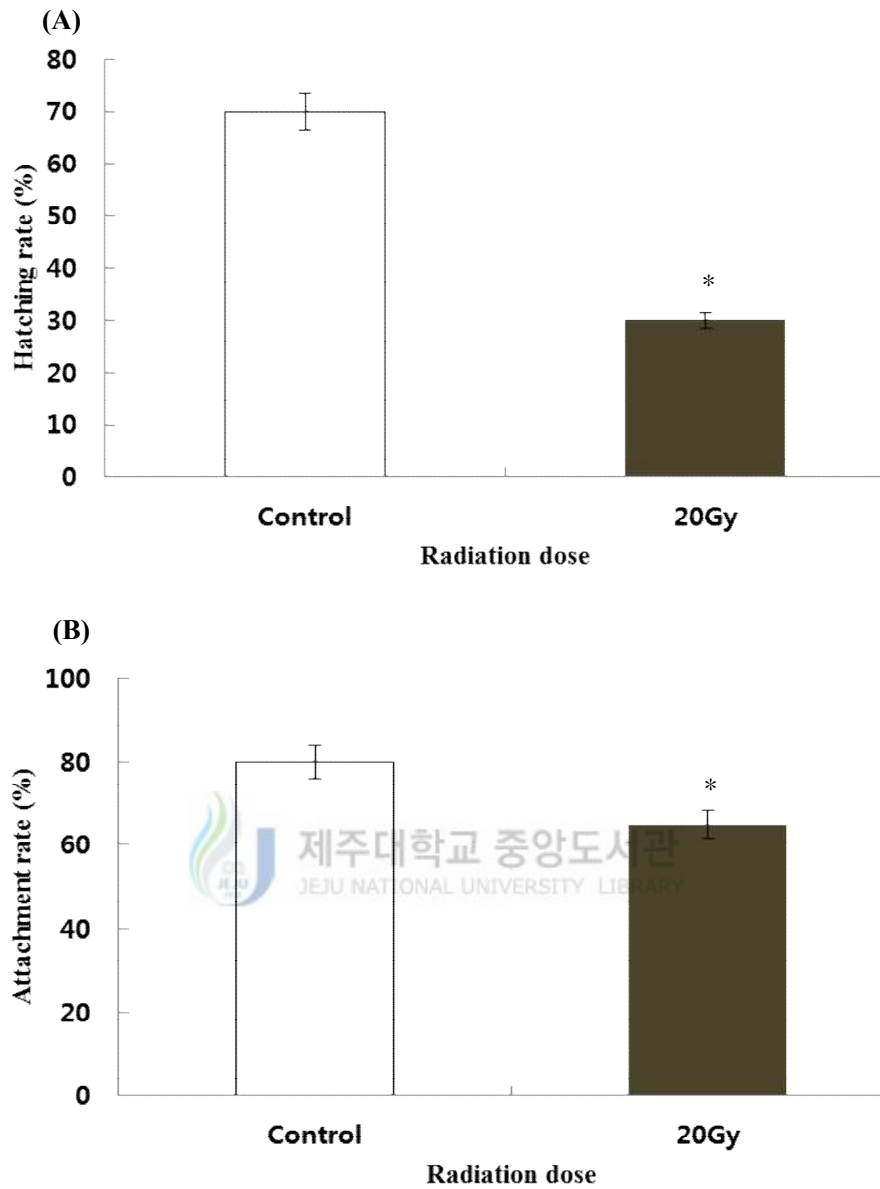


Fig. 27. Small abalone (*H. diversicolor aquatili*) Hatching rate (A) and attachment rate (B) for each gamma ray dose.

\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P < 0.05$ ).

## 7) 성장률 변화

### 7-1) 둥근전복

2012 년 7 월부터 2013 년 6 월까지 48 주 동안 양식장에서 사육한 각 실험구별 둥근전복 치패의 성장 결과는 Fig. 28 과 같다. 전복 치패의 각장 크기의 변화를 살펴보면, 실험 시작시 각 실험구의 평균 각장은  $1.1 \pm 0.2$  cm ~  $1.1 \pm 0.5$  cm 로 control 과는 유의적인 차이는 없었다. 사육 4 주째에도 각장이  $1.3 \pm 0.5$  cm ~  $1.5 \pm 0.3$  cm 로 control 과 다른 실험구간에 유의적인 성장 차이는 없었으나 8 주부터 48 주까지 15 Gy 는  $4.95 \pm 0.5$  cm, 20 Gy 는  $5.8 \pm 0.2$  cm 로 control 과 다른 실험구에 비하여 유의적인 성장 차이가 나타났다. 하지만 25 Gy 는 12 주까지는 생존 및 성장 하였지만 여름철 고수온 및 급격한 수온 변화에 의하여 치패가 대량으로 전량 폐사하여 24 주부터는 개체의 크기를 확인 할 수 없었다( $P < 0.05$ ).

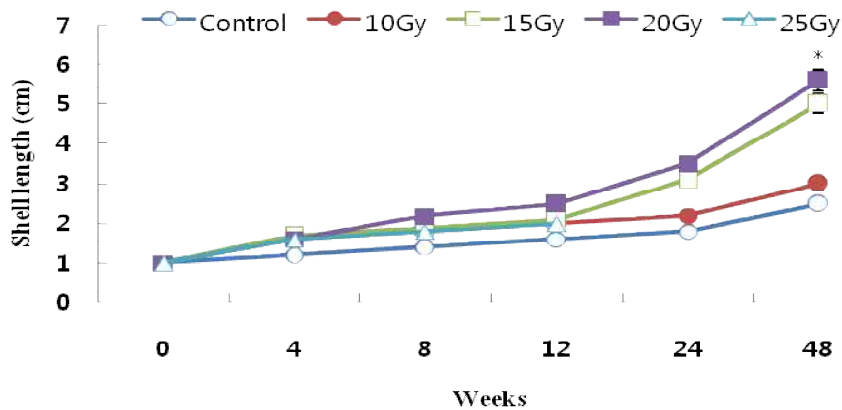


Fig. 28. Variations of shell length (cm) for juvenile disk abalone (*H. discus*) reared with different dose radiation in the farm.

\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P < 0.05$ ).

## 7-2) 오분자기

2013 년 7 월부터 2014 년 6 월까지 48 주 동안 양식장에서 사육한 각 실험구별 오분자기 치패의 성장 결과는 Fig. 29 와 같다. 오분자기 치패의 각장 크기의 변화를 살펴보면, 실험 시작시 각 실험구의 평균 각장은  $0.5 \pm 0.2$  cm ~  $0.5 \pm 0.5$  cm 로 control 과는 유의적인 차이는 없었으나 48 주 후에 20 Gy 는  $2.5 \pm 0.2$  cm, control 은  $1.7 \pm 0.1$  cm 로 성장하여 20 Gy 에서 control 에 비하여 성장율이 유의적으로 높게 나타났다( $P < 0.05$ ).

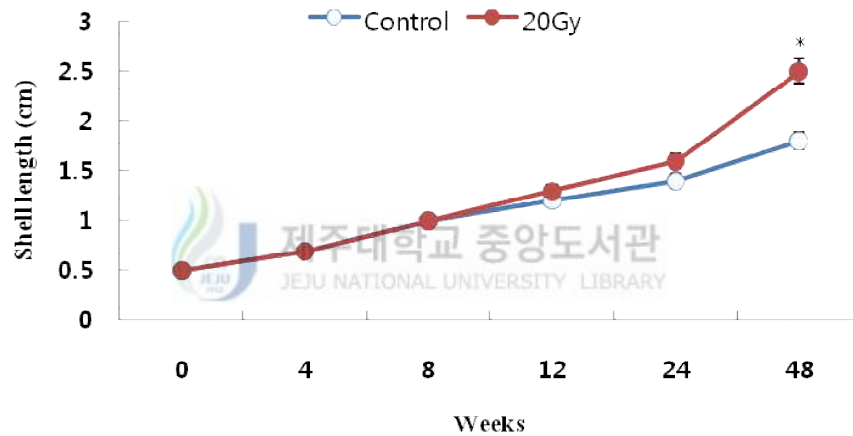


Fig. 29. Variations of shell length (cm) for juvenile small abalone (*H. diversicolor aquatili*) reared with different dose radiation in the farm.  
\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P < 0.05$ ).

8) 성장유전자 MYOSTATIN mRNA 변화

감마선 조사에 따라 myostatin mRNA 발현을 알아보기 위하여 실험구 아가미 조직에서 샘플을 적출하여 RT-PCR 을 실시하였다.

그 결과 control 실험구에서는 발현하지 않았으며 감마선 15 Gy 실험구와, 20 Gy 실험구에서 높게 발현하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 30). 이러한 결과로 보았을 때 감마선 15 Gy, 20 Gy 를 조사함으로써 성장 유전자의 발현량이 증가되고 이를 통해 속성장이 유도되는 것으로 추정되어 저선량의 방사선 조사를 이용한 속성장 전복 개발이 가능하다고 판단된다.

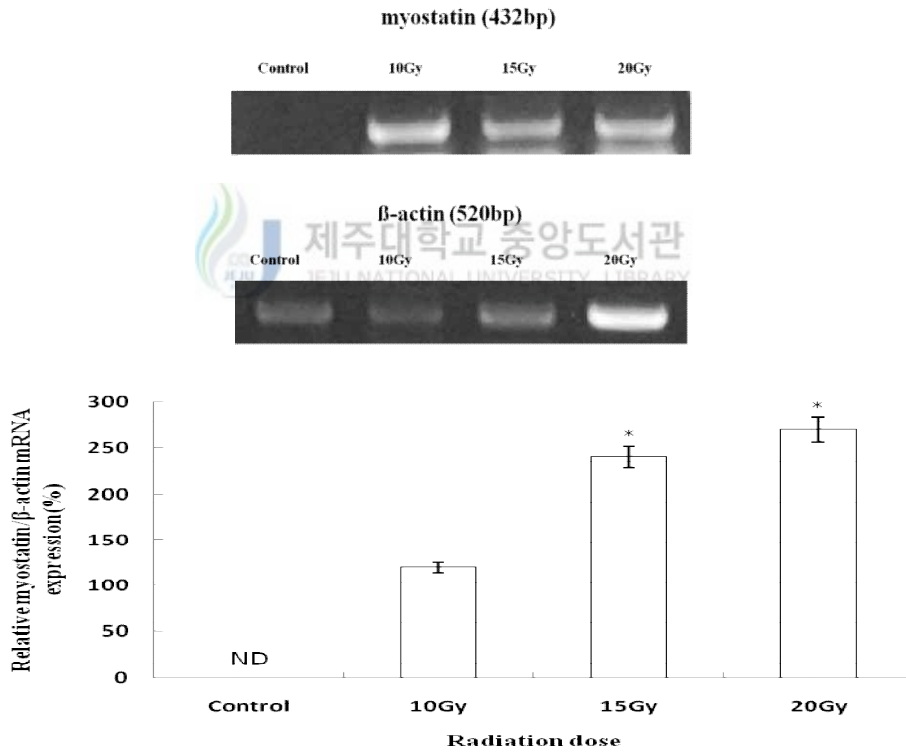


Fig. 30. Effect of gamma radiation on  $\beta$ -actin mRNA and myostatin mRNA of gill in disk abalone (*H. discus discus*) reared with different dose radiation.  
\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P < 0.05$ ).



9) Thermoluminescence(TL) 변화

감마선 조사 후 생산된 치패의 잔류량 분석을 위하여 10 Gy, 15 Gy 및 20 Gy 실험구에서 생산된 치패를 한국 원자력연구원에 분석을 의뢰한 결과 모든 실험구에서 감마선 잔류량이 검출되지 않았다(Table 2). 따라서 감마선 조사에 따라 생산된 치패가 안전한 것으로 입증되었으며 식용으로 사용하여도 인체에 무해한 것으로 판단된다.

Table 2. Results of detection for the remaining amount in the Juvenile disk abalone that had been produced after being irradiated with gamma ray

<sup>60</sup> CO Gamma irradiation	10 Gy	15 Gy	20 Gy
Presence of residual	×	×	×



#### 4. 고찰

돌연변이 유도를 통한 육종연구는 농업을 중심으로 많은 연구가 되어져 왔으며 그 효과 및 경제적 가치가 매우 높은 것으로 평가되고 있다(Kim *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013). 본 연구에서는 저선량 감마선을 둥근전복과 오분자기 모패에 조사하여 육종학적 가치에 대한 평가를 위하여 감마선 조사에 의해 생산된 차세대 전복류 치패의 생리적인 변화와 사육을 통하여 성장을 관찰하였다. 일반적으로 생물체에 감마선 조사를 실시할 경우, 세포내 물분자의 수산화기 과다생산에 의한 세포의 산화적 스트레스 발생이 유발되는 것으로 보고하고 있다(Dubner *et al.*, 1995). 본 연구 결과에서는, 감마선 조사 후 전복과 오분자기 모두 고농도의 감마선 조사 구간인 20 Gy 및 25 Gy 에서 모패의 폐사는 일어나지 않았으나 활동성이 저하되는 현상이 나타났다. 따라서 본 연구에서 설정한 감마선의 선량은 모패에 대한 스트레스 유발은 일부 나타날 수 있으나 다음세대의 번식에는 큰 영향을 미치지 않아 돌연변이 유도에 적합한 선량으로 판단된다.

감마선 조사된 전복 모패로부터 생산된 수정란의 부화율과 부착율은 control, 10 Gy, 15 Gy 에서는 부화율 약 50%, 부착율 약 60%를 나타내었으며, 20 Gy, 25 Gy 에서는 부화율 약 30%, 부착율 약 40%를 나타내었다. 20 Gy, 25 Gy 에서는 수정란의 수와 수정율, 부화율 및 부착율이 낮아 치패의 수가 타 실험구에 비해 적어지는 결과를 나타내었다. 또한 오분자기는 수정란의 부화율과 부착율은 control 에서는 부화율 약 70%, 부착율 약 80%를 나타내었으며, 20 Gy 에서는 부화율 30%, 부착율 65%를 나타내었다. Kang *et al.*, (1996)에 따르면 감마선 조사는 어린 개체일수록 DNA 및 RNA 손상을

강하게 유발시켜 생리적 장애를 유발하는 것으로 보고하고 있다. 본 연구결과에서 나타난 고선량에서의 부화율과 부착률의 감소 또한 모패의 체내에 존재한 난자에 대한 유전자 손상 유발에 의해 농도 의존적으로 나타난 결과로 추정된다.

한편, Lee *et al.*, (1998)은 저선량의 감마선을 고추 작물의 종자에 조사하여 각 선량별로 나타나는 hormesis 효과를 조사한 결과 control 에 비해 저선량에 감마선 조사구에서 발아율이 증가되는 것을 관찰하였고, 생육 양상 등에 영향을 미치는 적정선량을 1 Gy 에서 20 Gy 사이임을 보고 하였다. Kim *et al.*, (2000a, 2000b, 1999a)도 종자에 저선량 감마선을 조사하여 자란 옥수수, 참박, 배추등의 생육이나 수량이 증가하는 것을 관찰하였으며, Koepf and Kramer(1981)는 저선량 감마선이 조사된 옥수수의 발아율이나 생육의 증가는 종자의 종피를 투과한 저선량 감마선이 지베렐린이나 앱시스산 등의 식물 호르몬의 양적평형에 영향을 미쳐 발아율 및 유식물의 성장을 촉진시키고 결국에는 광합성 기구 및 순광합성량 환경 스트레스에 대한 저항성을 증가 시킨다고 보고하였다. 본 연구에서도 48 주 동안 전복류의 성장을 확인한 결과 15 Gy 와 20 Gy 에서 control 과 다른 실험구에 비하여 8 주부터 유의적인 성장이 확인된 바 hormesis 효과라 판단된다. 이러한 결과는 본 연구진에서 연구된 참전복의 성장에 대한 감마선의 영향에 대한 hormesis 효과가 30 Gy 미만의 선량에서 발생하는 것으로 보고한 것과 유사한 결과라고 판단된다(Kim *et al.*, 2007).

한편, 근육에서 특이적으로 많이 발현되는 myostatin 은 transforming growth factor  $\beta$ (TGF- $\beta$ ) superfamily 의 하나로서 골격 근육의 성장과

발달을 억제하는 조절자로서 알려져 있다. 소와 생쥐 등에서 myostatin 유전자의 돌연변이는 과도한 근육축적을 유도한다고 보고되었고 근섬유 발달과정에서 myostatin 의 기능들이 확인되었다(McPherron *et al.*, 1997). 또한 Lee *et al.*,(2009)은 육상동물의 경우 대부분 근육에서 발현이 되고, 근육을 제외한 다른 조직에서는 발현이 나타나지 않으나, 해양동물의 경우에는 모든 조직에서 발현이 되지만, 일반적으로 근육에서 가장 많이 발현된다고 보고 하였다. Cho *et al.*,(2005)에 의하면 돼지 myostatin 유전자는 근아세포의 분화와 근육발달에 핵심적인 역할을 수행하는 것으로 보고하고 있다. 이처럼 myostatin 은 생물체의 성장과 밀접한 관련이 있는 물질로서 등근전복의 경우 아가미에서 주로 그 발현이 나타나는 것으로 조사되어졌다. 이에 본 연구에서 속성장의 지표로서 감마선 조사 후 생산된 치패 중 성장이 빠른 개체를 선별하여 성장유전자 myostatin mRNA 발현량을 측정 한 결과 control 에서는 성장유전자가 발현을 하지 않았으나 감마선 조사 후 생산된 치패 실험구에서는 그 발현량이 증가되는 것을 확인하였으며, 특히 20 Gy 에서 높은 발현량을 나타내는 것으로 조사되어졌다. 따라서 방사선 조사에 의해 생산된 개체에서는 특이적으로 myostatin 유전자의 발현량이 증가되어 속성장을 유도할 가능성이 높은 것으로 판단된다.

이처럼 본 연구에서 무척추 해양생물인 등근전복과 오분자기를 이용한 감마선 조사가 생리학적으로 미치는 영향을 조사한 결과 기존의 육상식물을 이용한 돌연변이 유도의 결과와 같이 등근전복과 오분자기 역시 저선량 감마선 조사에서 성장율이 높게 나타나는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 해양동물에 있어서도 감마선을 이용한 돌연변이 유도를 통한 새로운

육종기법으로의 도입 가능성을 제시할 수 있을 것으로 기대된다. 하지만 생리학적 지표는 다양한 환경변화, 개체 및 종에 따라서도 매우 민감하게 반응하므로 추후 이에 대한 세부적인 실험을 통하여 그 지표설정을 위한 연구를 실시하고자 한다.



## IV. 감마선 조사 후 생산된 전복류 F1 치패의 환경내성 변화 연구

### 1. 서론

모든 생물체는 생활환경에 존재하는 다양한 화학물질과 물리적, 화학적, 사회적 요인의 영향을 받으며 특히 수서생물은 주위 환경으로부터 직접적인 영향을 받는다고 볼 수 있다. 수서생물의 노출 가능한 요인으로는 수중으로 흘러 들어온 중금속, 농약과 수온, pH, 빛, 유속 등의 물리적 요인, 각종 요인들 간의 화학적 반응, 각 생물 간의 생태적 상호작용 등에 의해 영향을 받게 된다(Han *et al.*, 2009). 특히 양식환경에서 주로 받는 스트레스로는 크게 화학적 요인과 물리적 요인 등으로 나눌 수 있는데, 이들 중 물리적 요인으로는 수온, 염분, 용존산소, 소음, 진동 등이 있으며 화학적 요인으로는 어류의 기생충 구제제로 사용되는 포르말린(Cho and Yang, 1996) 및 황산동(Varanka *et al.*, 2001)과 같은 소독약제 투여 등이 있다. 이러한 환경변화에서 발생하는 물리적 스트레스 및 화학적 스트레스는 사육시 성장, 번식, 대사 및 삼투압조절 등 생리적 변화를 일으킬 수 있으며, 결국에는 질병 및 폐사 등의 문제점을 유발할 수 있다(Wedemyer and Mcleay, 1981). 일반적으로 스트레스를 받게 되면 생체 내에 활성산소(superoxide, hydrogen peroxide, peroxy radical, hydroxyl radical 등)가 발생하는 것으로 알려져 있으며, 활성산소는 생체 내에서 다른 물질과 결합하려는 화학적 산화력이 강해서 세포나 기관의 막을 공격하여 세포의 기능을 손상시킨다. 이러한 활성산소에 대하여 체내에서는 항산화 효소인 superoxide dismutase(SOD)와 catalase(CAT) 등을 생성하여 세포기능 손상을 막는 것으로 알려져 있으며(Chance *et al.*, 1979; Wendel and Feuerstein, 1981), 이러한 항산화

효소는 온도 변화에 의해 효소활성이 증가하는 것으로 보고되고 있다(Parihar *et al.*, 1996, 1997). 또한 무척추동물의 면역계는 대부분 선천성 면역계로 이루어져 있다(Mullen and Goldsworthy, 2003). 면역반응의 초기 단계는 호흡폭발로 알려져 있는 phagocytic activity 로 이때, 혈구세포에서  $H_2O_2$  와  $O_2^-$  와 같은 활성산소종이 발생한다(Pipe, 1992). Phagocytosis 와 라이소자임 활성측정은 환경오염이 면역독성에 미치는 영향을 측정하기 위한 좋은 도구로 활용되어 왔으나(Anderson *et al.*, 1992; Cheng and Sullivan, 1984), 납에 직접 노출시켜 혈구세포에서 호흡폭발을 측정한 보고는 거의 없다. Phenoloxidase 는 구리를 함유하는 산화효소의 일종으로 세균이나 기생충과 같은 병원성 미생물 및 이물질이 체내에 들어왔을 때 이에 필요한 멜라닌의 합성과 상처 부위의 치유에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Jonhson *et al.*, 2003). 또한 caspase-8 은 면역세포, 손상된 세포 등을 제거하는 예정세포사(Apoptosis) 과정에 중추적인 역할을 하는 효소로, 간접적으로 세포 괴사를 막는 기능을 가진 것으로 알려져 있다. 그러나 대부분의 연구가 어류를 중심으로 연구되어 있으며 전복을 대상으로 스트레스를 조사한 연구는 미흡한 실정이다.

한편, 2006 년 하절기에는 제주 서북부연안에 중국으로부터의 저염분 해수의 유입되어 염분이 20 psu 이하로 낮아지는 현상이 발생하고 있으며, 이러한 요인으로 전복의 대량 폐사가 발생하여 60 억원에 이르는 경제적 손실을 입혔으며, 2006 년과 2007 년 집중폭우로 인한 담수 유입으로 거제와 여수해역에서 양식중인 전복이 대량 폐사하는 등 저염분 영향에 따른 피해가 속출하였다(Pang and Hyun, 1998; Hyun and Pang, 1998; Moon and Pang,

2003). 일반적으로 전복류는 성장 기간이 길고 그 기간 동안 환경 변화에 의한 성장 변수가 많은 특성을 가지고 있어 안정적인 생산을 위해서는 성장과 생존에 영향을 미치는 요인들에 대한 이해가 필요한 것으로 알려져 있다(Day and Fleming, 1992; Huchette *et al.*, 2003). 전복의 생리·생태적 변화에 관한 연구로는 참전복(*H. discus hannai*)의 유생발생 및 채묘에 미치는 아연독성(Seo *et al.*, 1999), 남조류, *Mastigocoleus* sp.에 의한 한국산 참전복의 패각괴사증(Choe *et al.*, 1998), 수온 스트레스에 의한 생리적 변화(Kim *et al.*, 2005) 등이 연구되어 졌으며, 제주도 까막전복(*H. discus discus*) 및 시볼트전복(*H. sieboldi*)의 수온 및 염분의 변화에 의한 생리학적 변화(Jwa *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2006)등의 연구가 이루어지고 있는 실정이다. 하지만 양식품종인 전복의 새로운 품종 개발을 위한 연구로서는 성장관련 형질에 대한 유전도수의 추정 등에 관한 연구는 이루어지고 있으나(Choe *et al.*, 2009), 적극적인 품종 개량에 대한 연구는 거의 전무한 상태이다. 품종개량에 관한 방법으로는 선발육종, 교잡육종, 방사선 육종과 같은 방법이 널리 사용되고 있지만 방사선을 이용한 hormesis 에 대한 연구는 육상 생물에서 많은 연구가 이루어졌을 뿐, 해양생물에 대한 연구는 거의 이루어 지지 않은 상태이다. 하지만 식물에서는 벼에 방사선을 이용한 hormesis 의 작용으로 조숙성, 내병성, 내염성, 내냉성 등에 강한 형질이 조사되었고 특히 속성장하는 변이체들을 선별하여 M8 세대까지 개발하여 산업적으로 활용되고 있다(Lee *et al.*, 2003). 하지만 본 실험에서는 속성장 전복을 생산하더라도 이처럼 물리화학적 스트레스에 약하고 생존율도 감소되기 때문에 우리가 개발한 전복을 가지고 환경내성 실험을 함으로서



환경에도 강하고 성장도 빠른 전복의 선별이 가능할 것으로 판단되기 때문에 등근전복과 오분자기에 감마선 조사 후 생산된 돌연변이 F1 치패에 고수온, 저염분 스트레스를 이용하여 면역유전자 발현량 및 열충격단백질 (HSP 70)을 측정하여, 이러한 연구를 기초로 환경내성이 강한 전복과 오분자기 신품종을 개발하여 산업적으로 이용하고자 한다.



## 2. 재료 및 방법

### 1) 수온, 염분 내성측정

전복의 수온 및 염분 스트레스 실험은 control 실험구, 10 Gy 실험구, 15 Gy 실험구 및 20 Gy 실험구, 오분자기는 control 실험구, 20 Gy 실험구의 감마선 조사 치패 중 크기가 비슷한 치패를 각각 30 마리씩 무작위 선별하여 실험을 실시하였다. 전복 치패는 평균 각장  $1.98 \pm 0.08$  cm, 각폭  $1.02 \pm 0.05$  cm, 전중량  $1.2 \pm 0.3$  g 을 사용하였다. 오분자기 치패는 평균 각장  $2.48 \pm 0.05$  cm, 평균 각폭  $1.21 \pm 0.05$  cm, 전중량  $2.1 \pm 0.3$  g 을 사용하여 수온  $23 \pm 0.2^\circ\text{C}$ , 염분  $32 \pm 0.2$  psu 의 수조에서 1 주간 순치시켰으며, 순치기간 중 먹이의 급이는 중단하였다. 수온 스트레스 실험은 본 연구진에서 이전 연구에서 진행되었던 급격한 수온 스트레스에 따른 시볼트전복의 100% 폐사를 일으켰던  $30^\circ\text{C}$ 에서 수행되었고, 샘플링은 실험 시작 시와 이전 연구에서 폐사가 발생하였던 12 h 에 실시하였다(Kim *et al.*, 2006). 염분 스트레스 실험은 이전 연구에서 진행되었던 저염분 자극에 따른 둥근전복의 폐사를 발생하였던 25 psu 에서 수행되었고, 샘플링은 실험 시작 시와 이전 연구에서 폐사가 발생하였던 24 h 에 실시하였다(Jwa *et al.*, 2009). 샘플링은 각각 3 마리의 치패로부터 혈구와 간부위의 조직 샘플을 채취하여  $-70^\circ\text{C}$ 로 보관하며 분석에 이용하였다.

### 2) 생존율 측정

실험 개시 후 3 시간 간격으로 폐사한 개체를 각각 조사하였다. 폐사 개체의 계수는 은신처(shelter)와 수조 벽면에 부착 능력이 없고, 유리봉으로 발과 촉수를 자극하여 반응이 없는 개체를 선택하여 조사하였다.

### 3) 항산화 효소 측정

항산화효소는 간부위를 적출하여 SOD 및 CAT 를 각각 분석하였다. 간부위를 적출 후 약 0.1 g 을 0.9% NaCl 에 3 회 세척한 다음 KCl (1.17%)을 함유한 100 mM phosphate buffer (pH 7.4)를 첨가하여 균질화 하였고, 균질화된 시료는 원심분리(1,000 rpm, 15 min, 4°C)에 의해 지방 및 침전물을 제거하였다. 균질액은 다시 원심분리(13,000 rpm, 20 min, 4°C)한 후 상등액을 항산화 효소 측정용 시료로 사용하였다. 단백질 함량은 Lowry *et al.*, (1951)의 방법에 따라 표준 단백질효소 BSA(bovine serum albumin)를 사용하여 spectrophotometer 를 이용 750 nm 에서 측정하였다. SOD 는 pyrogallol 의 자동 산화율이 억제되는 양을 측정하는 Marklund and Marklund (1974)의 방법으로 측정하였으며, 50 mM phosphate buffer (pH 8.24) 1.3 ml에 간장 균질액 25  $\mu$ l을 넣은 후 45  $\mu$ l의 3mM progallol 용액을 첨가하여 spectrophotometer 를 이용하여 325 nm 의 파장에서 측정하였고, 효소활성의 1 단위는 반응액 중의 pyrogallol 의 산화를 50% 억제하는 효소의 양으로 정하였다. CAT 활성도 측정은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 를 기질로 사용하여 spectrophotometer 에 의해 240 nm 파장에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 가 환원되어 감소하는 흡광도로서 효소 활성도를 측정하는 Nelson and Kiesow (1972)의 방법에 의하여 측정하였으며, 효소 활성도의 단위는 1 분간 1 mg 의 단백질이 반응하여 환원시킨 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 를 nmol 로 나타내었다.

#### 4) Respiratory burst activity 측정

Respiratory burst 활성은(Song and Hsieh *et al.*, 1994; Anderson, 1998), 의 방법을 응용하여 측정하였다. Hamocyte 의 활성산소 중 Intracellular superoxide anion ( $O_2^-$ )의 분석을 위해 혈청 500  $\mu$ l와 NBT 용액 (2mg NBT, 1  $\mu$ g PMA/ml in 50Mm Tris-HCL buffer, pH 7.5) 500  $\mu$ l을 혼합하여 10 $^{\circ}$ C 배양기에서 30 분 동안 반응 시킨 후, 120 xg, 4 $^{\circ}$ C로 10 분간 원심 분리하였다. 상청액을 버리고, 세포를 TBS buffer (pH 7.5)로 세척하는 작업을 두 번 반복한 뒤, 100% methanol 로 세포를 고정하였다. 50% methanol 로 여러 번 세척하고, 물기를 클린벤치에서 제거하였다. 물기가 없어지면 바닥에 가라앉은 pellet 에 2M KOH 600  $\mu$ l와 DMSO 700  $\mu$ l를 첨가하여 pellet 을 용해시켰다. 푸르게 발색된 용액을 파장 620nm 에서 측정하였다.



#### 5) Phenoloxidase activity 측정

phenoloxidase 의 활성은 Ashida 와 Dohke (1980)의 방법을 응용하여 측정하였다. 96 well plate 에 0.1M phosphate buffer (pH 6.0) 150  $\mu$ l에 혈청 15  $\mu$ l를 넣고 잘 혼합 한 뒤 0.01M L-DOPA 150  $\mu$ l를 넣은 후 25 $^{\circ}$ C 배양기에서 10 분 동안 반응 시킨 후 490nm 에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 최종 값은 흡광도 값이 0.001/ml 감소한 값을 1unit 으로 표시하였다.

#### 6) Lysozyme activity 측정

혈청 내 lysozyme 활성은 Parry (1965)의 방법에 따라 Turbimetric assay 로 조사하였다. *Micrococcus lysodeikticus*(0.1mg/ml PBS, pH6.8) 현탁액 90  $\mu$ l와 혈청 100  $\mu$ l를 96 well plate 에 혼합하여 25 $^{\circ}$ C 배양기에서 5 분 동안 반응 시킨 후 530nm 에서 흡광도를 측정하였다. Lysozyme 활성은 흡광도 값이 0.001/ml 감소한 값을 1unit 으로 표시하였다.

#### 7) 면역유전자 mRNA 발현 분석

전복의 면역유전자 발현을 위한 재료는 control, 10 Gy, 15 Gy 및 20 Gy, 오분자기의 면역 유전자 발현을 위한 재료는 control, 20 Gy 치패 중 수온에 대한 내성이 강한 개체는 수온 스트레스인 30 $^{\circ}$ C에서 12 h 동안 생존한 개체 30 마리를 선택하였고 염분에 대한 내성이 강한 개체는 염분 스트레스인 25 psu 에서 24 h 동안 생존한 개체 30 마리를 선택하여 실험을 실시하였다. 샘플링은 선택된 각각 3 마리의 아가미 조직을 채취하여 -70 $^{\circ}$ C로 보관하며 분석에 이용하였다

## 9) RT-PCR 분석

동결된 아가미 조직에 Tri-regent 500  $\mu\text{l}$ 를 가하였다. 호모젠아이저로 시료를 균질화한 후 상온에서 5 분간 방치하였다. Chloroform 100  $\mu\text{l}$  가한 후 혼합하여 상온에서 3 분간 방치하였다. 원심분리(13,000 rpm, 4°C, 10 min) 후 상청액을 다른 tube 에 옮겨 동량의 차가운 isopropanol 을 넣어서 혼합하였다. 10 분간 상온에 방치 후 원심분리(13,000 rpm, 4°C, 10 min) 하였다. 상청액을 제거하고 차가운 75% ethanol 을 1 ml 넣어서 혼합 후 원심분리(13,000 rpm, 4°C, 5 min)하였다. 이를 3 회 반복하고 상청액을 제거하고 실온에서 1 시간동안 방치하여 ethanol 을 증발시켰다. 여기에 DEPC 25  $\mu\text{l}$  넣어서 total RNA 를 놓았다. 추출된 total RNA 는 -70°C에서 보관하여 실험에 사용하였으며, PROMEGA 사의 cDNA 합성 kit 인 ImProm reverse transcriptase kit A3800 을 이용하여 cDNA 를 합성하였다. 합성된 cDNA 를 증폭시키기 위해서 cDNA 2  $\mu\text{l}$ , 10x PCR buffer 5  $\mu\text{l}$ , MgCl 3  $\mu\text{l}$ , dNTP 1  $\mu\text{l}$ , primer (sence) 1  $\mu\text{l}$  (50 pmol), antisence 1  $\mu\text{l}$ , Taq DNA polymerase 0.5  $\mu\text{l}$  및 Nuclease-Free water 36.5  $\mu\text{l}$ 를 혼합하여 94°C에서 5 분간 predenaturation 시켜준 후 94°C에서 1 분간 denaturation, 50°C에서 45 초간 annealing, 72°C에서 1 분간 extension 조건으로 35 회 증폭하고, 이 후 72°C에서 5 분간 더 반응시켰다.

caspase-8, HSP-70 mRNA 에 대한 oligonucleotide primer 를 제작 합성하였고, 양성대조로 사용하기 위해  $\beta$ -actin mRNA 를 제작하였다(Table 3). PCR 로 증폭된 산물은 1% agarose gel 에서 100V 로 전기영동 하여 분리하였으며, 100 bp DNA ladder 를 size marker 로 사용하여 UV transilluminator 하에서

사진을 촬영하여 이미지 분석 프로그램(Labworks 4.5)을 이용하여 mRNA 의 발현량을 정량하였다

Table 3. Oligonucleotide of primers for RT-PCR

RNA species	Expected size	Primer sequence
$\beta$ -actin mRNA	520bp	5'-GACHCAGATCATGTTYGARACC-3' 5'-CCTTCTGCATRCGGTCAGC-3'
caspase-8	704bp	5'-AGATCTGCAAGCCCTCAAGTTCCT-3' 5'-GGGTCCAGAATGCTGGCAAATTGT-3'
HSP-70	400bp	5'-CAGGACTTCTTCAACGGCAAG-3' 5'-GTGCTCTTGTCACAGCTGA-3'

bp : base pairs



### 3. 결과

#### 1) 둥근전복의 고수온 내성 변화

##### 1-1) 생존율

수온 스트레스 실험은 이전 본 연구진에서는 사전 연구된 30°C에서 12 h 쯤 100%의 폐사를 일으켰던 폐사 수온인 30°C를 이용하여 12 h 간 수행하였다. 감마선을 조사한 실험구가 control 에 비하여 생존율이 높게 나타났으며 특히 20 Gy 에서 64%의 생존율을 나타내어 다른 실험구에 비해 유의적으로 높게 나타났으나 24 h 쯤에는 모든 실험구에서 100% 폐사하였다(Fig. 31).

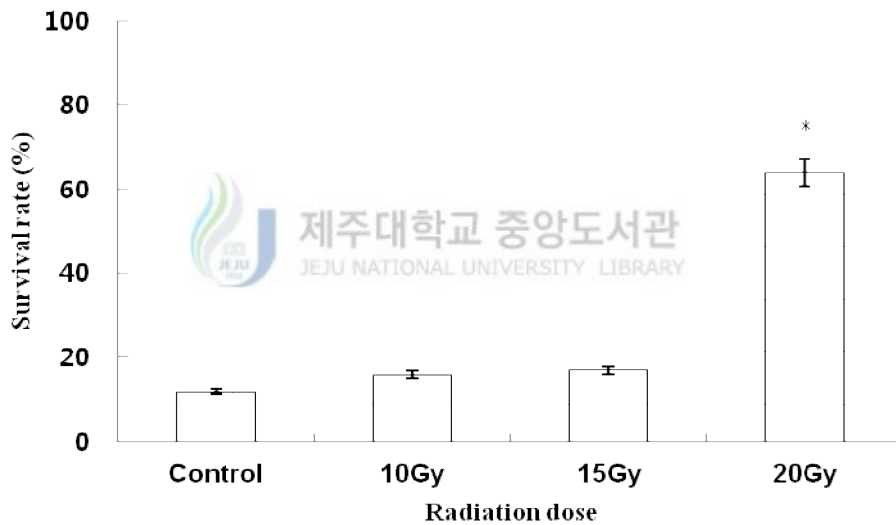


Fig. 31. Survival of disk abalone (*H. discus discus*) reared with different dose radiation at 12 h after exposure to high-water temperature(30°C) stress.

\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P < 0.05$ ).



## 1-2) 항산화 효소 변화

감마선을 조사하여 생산된 치폐를 수온 스트레스를 이용하여 SOD 와 CAT 효소를 확인하였다. SOD 효소는 0 h 짜에 control 에 비하여 20 Gy 에서 유의적으로 높게 나타났으며 10 Gy, 15 Gy 에서는 유의적으로 낮게 나타났다. 하지만 12 h 짜에는 10 Gy 를 제외한 나머지 실험구에서 control 에 비해 유의적으로 낮게 나타났다( $P < 0.05$ , Fig. 32-A). 이는 10 Gy 에서 수온스트레스에 의한 SOD 활성이 급격히 증가한 것으로 보아 생리적인 방어 기작이 작동한 것으로 판단된다.

CAT 효소는 0 h 짜에 control 에 비하여 감마선을 조사한 실험구에서 유의적으로 낮게 나타났으며 12 h 짜에는 모든 실험구에서 일정하게 유지되었다( $P < 0.05$ , Fig. 32-B). 이는 control 을 제외한 나머지 실험구에서는 스트레스에 대한 방어체계가 작동하는 것으로 판단된다.



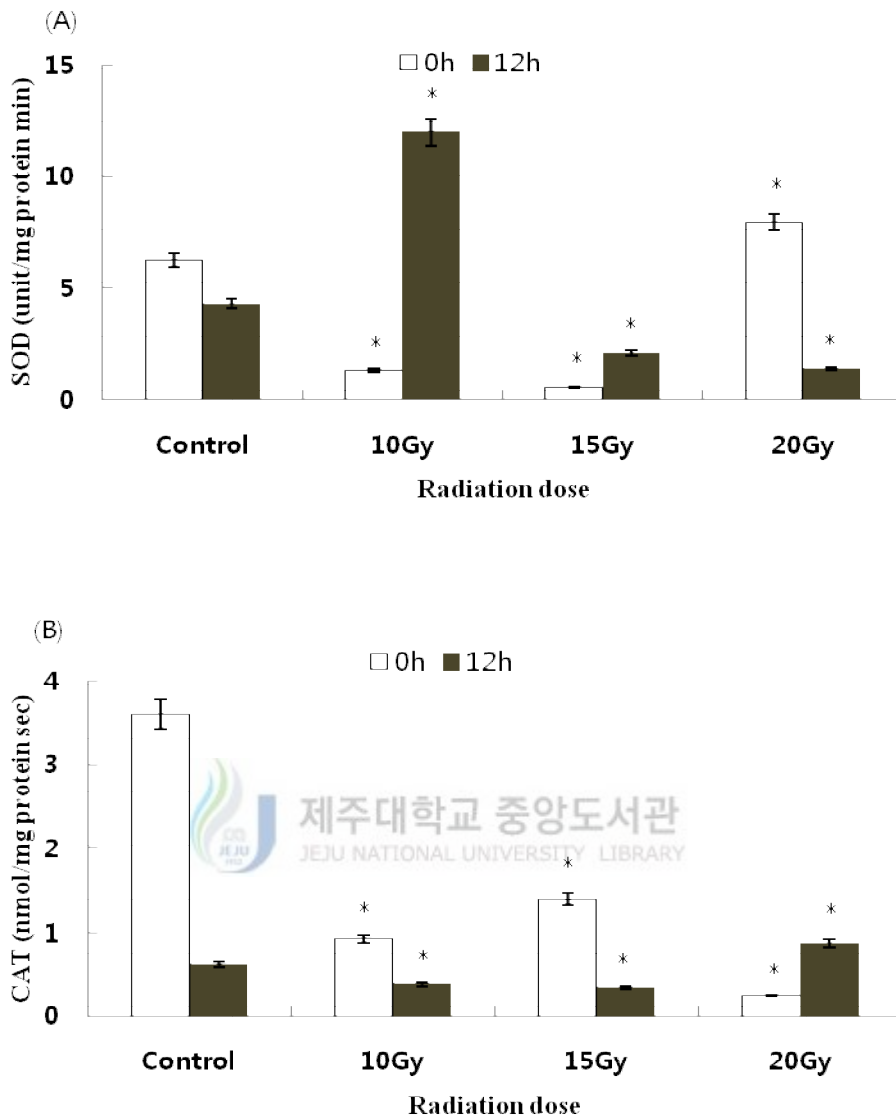


Fig. 32. Change of superoxide dismutase (SOD; A) and catalase (CAT; B) high-temperature stress on activity in disk abalone (*H. discus discus*) reared with different dose radiation.

\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P < 0.05$ ).

### 1-3) Respiratory burst activity 변화

수온 스트레스에 의한 전복의 Respiratory burst activity 변화는 0 h 에 비하여 12 h 에서 모든 실험구에서 높게 나타났으며 유의적인 차이가 나타나지 않았다(Fig. 33). 이는 모든 실험구에서 수온 스트레스에 반응하여 초기 면역력 증가로 활성산소를 발생시킨 것으로 판단된다.

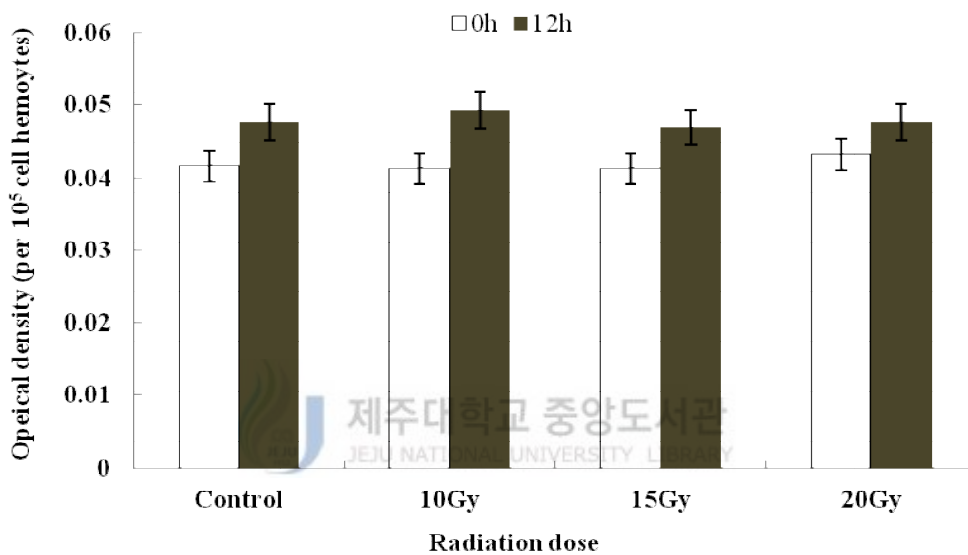


Fig. 33. Effect of high water-temperature stress on Respiratory burst activity in disk abalone (*H. discus discus*) reared with different dose radiation.

\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P < 0.05$ ).

#### 1-4) Phenoloxidase activity 변화

수온 스트레스에 의한 전복의 Phenoloxidase activity 변화는 0 h 짜에 15 Gy 에서 control 과 다른 실험구에 비하여 유의적으로 높게 나타났으며 12 h 에는 control, 15 Gy, 20 Gy 에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 하지만 10 Gy 에서 유의적으로 낮게 나타났다(Fig. 34). 이러한 결과는 15 Gy 에서 수온 스트레스에 의하여 면역력이 저하를 가져오기 때문에 생체방어 작용으로 면역활성을 증가 시킨 것으로 판단되며 다른 실험구에서는 생체방어 기작을 하지 않은 것으로 판단된다.

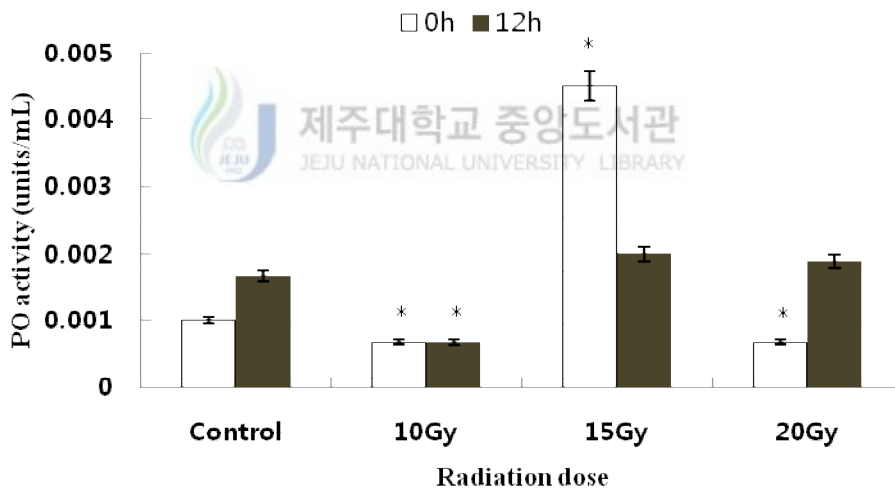


Fig. 34. Effect of high water-temperature stress on Phenoloxidase activity in disk abalone (*H. discus discus*) reared with different dose radiation.

\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P < 0.05$ ).

1-5) Lysozyme activity 변화

수온 스트레스에 따른 Lysozyme activity 변화를 알아보기 위하여 전복의 혈액을 채취하여 분석하였다. 수온 스트레스에 따른 Lysozyme activity 변화는 0 h 에 control 에 비하여 감마선 조사 실험구에서 높게 나타났으며 특히 20 Gy 에서 유의적으로 높게 나타났다. 12 h 에는 15 Gy 를 제외한 10 Gy, 20 Gy 에서 control 에 비해 유의적으로 높게 나타났다(Fig. 35). 이를 통해 수온스트레스에 Lysozyme 이 민감하게 반응하여 생체 방어작용을 하고 있음을 확인할 수 있었다.

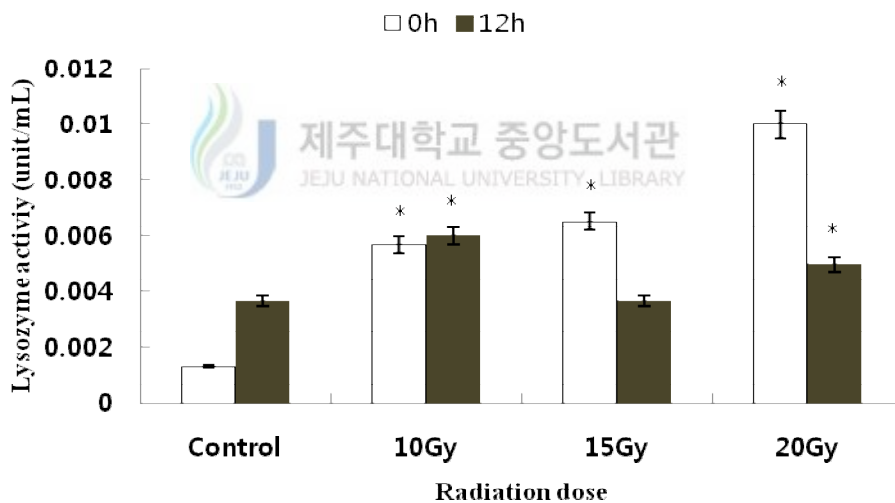


Fig. 35. Effect of high water-temperature stress on Lysozyme activity in disk abalone (*H. discus discus*) reared with different dose radiation. \*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P < 0.05$ ).

## 2) 오분자기의 고수온 내성 변화

### 2-1) 생존율

수온 스트레스 실험은 이전 본 연구진에서는 사전 연구된 30°C에서 12 h 쯤 100%의 폐사를 일으켰던 폐사 수온인 30°C를 이용하여 12 h 간 수행한 결과 control 에서는 34%, 20 Gy 에서는 56%의 생존율을 나타내었다. 전복은 30°C에서 전량 폐사하였지만 오분자기는 폐사하지 않았다. 이상의 결과를 보면 오분자기는 아열대성 패류로 고수온에 강하며 특히 20 Gy 에서 높게 생존한 것으로 보아 감마선 조사가 면역력을 증가시켜 hormesis 을 유발하는 것으로 판단된다(Fig. 36).

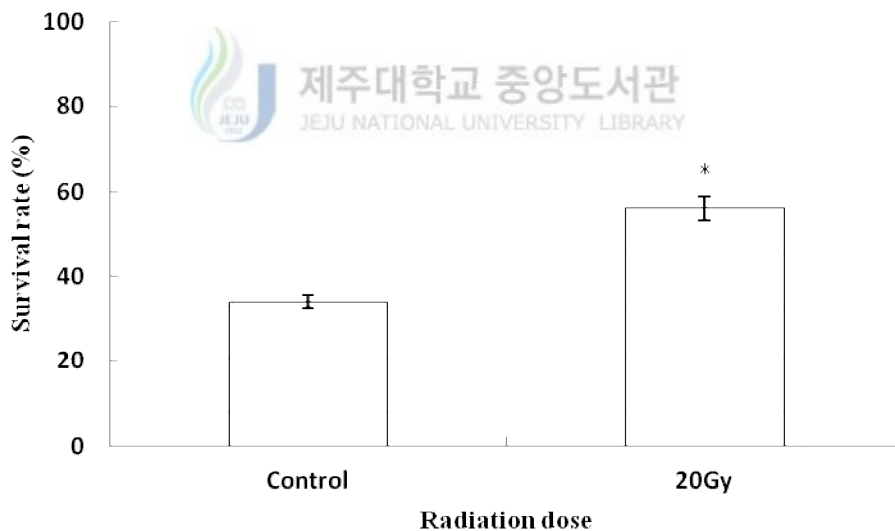


Fig. 36. Survival of small abalone (*H. diversicolor aquatili*) reared with different dose radiation at 12 h after exposure to high-water temperature(30°C) stress.

\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P < 0.05$ ).

## 2-2) 항산화 효소 변화

감마선을 조사하여 생산된 오분자기 치패를 수온 스트레스를 이용하여 SOD 와 CAT 효소를 확인하였다. SOD 효소는 0 h 짜에 control 에 비하여 20 Gy 에서 유의적으로 높게 나타났으며 12 h 에는 낮게 나타났다(Fig. 37-A). 이는 20 Gy 실험구에서 초기에 생리적인 방어 기작이 작동한 것으로 판단된다.

CAT 효소는 0 h 짜에 control 과 20 Gy 에서 유의적인 차이가 나타나지 않았으며 12 h 에는 control 에 비하여 20 Gy 에서 유의적으로 낮게 나타났다(Fig. 37-B). 이는 SOD 의 초기 활성이 증가됨으로써, 환경 스트레스에 대한 신속한 반응으로 인해 CAT 활성이 증가되지 않은 것으로 판단된다.



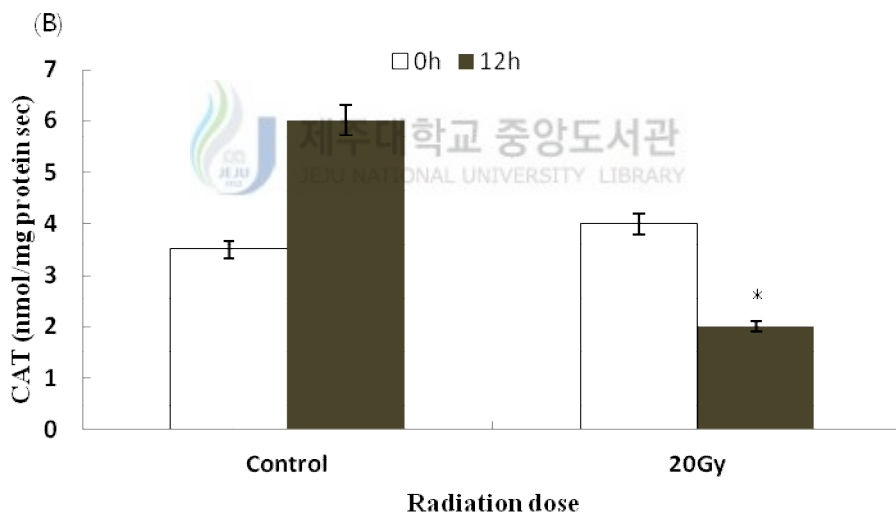
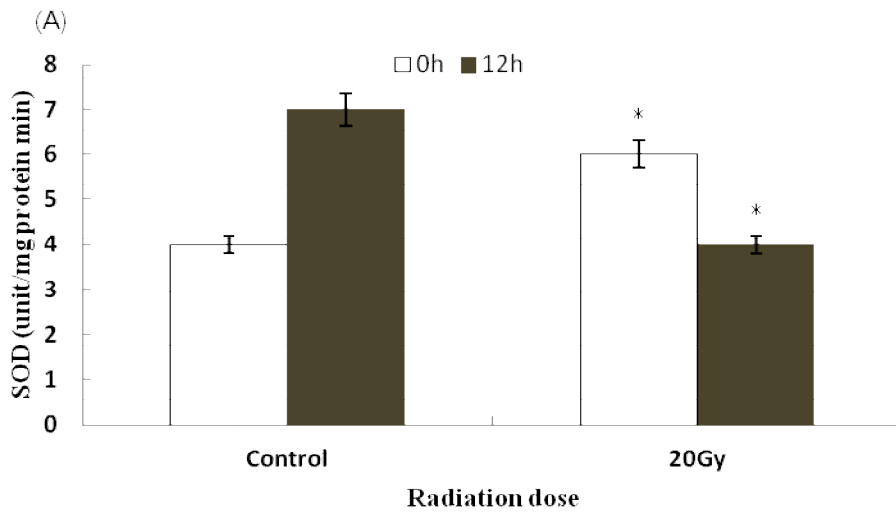


Fig. 37. Change of superoxide dismutase (SOD; A) and catalase (CAT; B) high-temperature stress on activity in small abalone (*H. diversicolor aquatili*) reared with different dose radiation.

\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P < 0.05$ ).



### 2-3) Respiratory burst activity 변화

수온 스트레스에 의한 오분자기의 Respiratory burst activity 변화는 0 h에는 control 과 20 Gy 에서 유의적인 차이는 나타나지 않았으나 12 h에는 control 에 비하여 20 Gy 에서 유의적으로 낮게 나타났다(Fig. 38). 이는 모든 실험구에서 수온 스트레스에 반응하여 초기 면역력 증가로 활성산소를 발생시킨 것으로 판단된다.

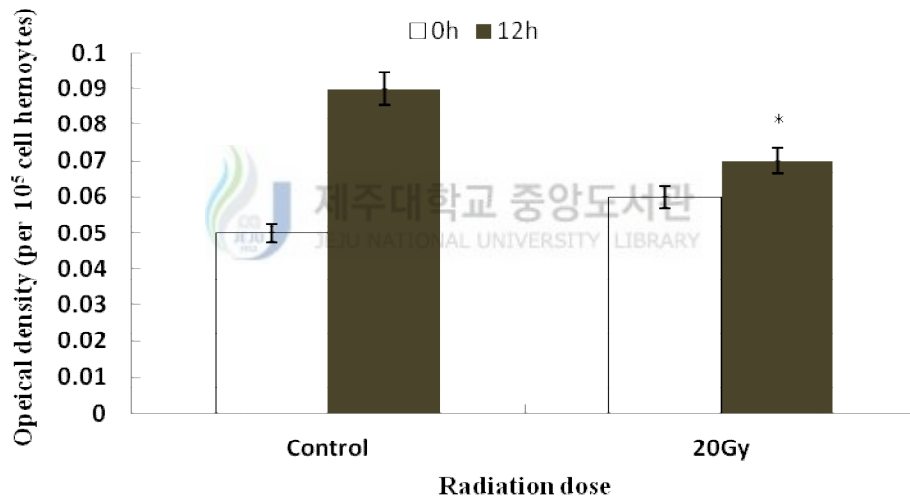


Fig. 38. Effect of high water-temperature stress on Respiratory burst activity in small abalone (*H. diversicolor aquatili*) reared with different dose radiation.

\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P < 0.05$ ).

#### 2-4) Phenoloxidase activity 변화

수온 스트레스에 의한 오분자기의 Phenoloxidase activity 변화는 0 h 쯤에 control 과 20 Gy 에서 유의적인 차이가 나타나지 않았으며 12 h 에는 control 에 비하여 20 Gy 에서 유의적으로 낮게 나타났다(Fig. 39). 이러한 결과는 20 Gy 에서 수온 스트레스에 의하여 면역력이 저하를 가져오기 때문에 생체 방어 작용으로 초기 면역활성을 증가시켜 생체방어를 한 것으로 판단된다.

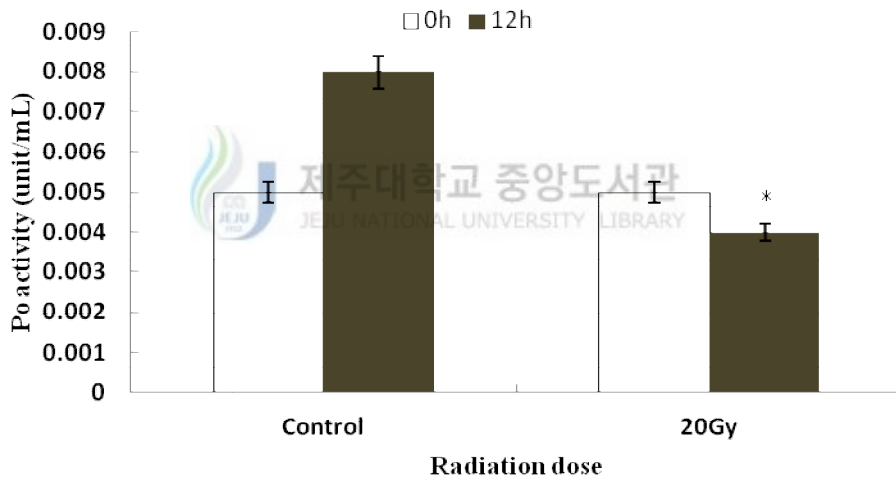


Fig. 39. Effect of high water-temperature stress on Phenoloxidase activity in small abalone (*H. diversicolor aquatili*) reared with different dose radiation.

\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P < 0.05$ ).

## 2-5) Lysozyme activity 변화

수온 스트레스에 따른 Lysozyme activity 변화를 알아보기 위하여 오분자기의 혈액을 채취하여 분석하였다. 수온 스트레스에 따른 Lysozyme activity 변화는 0 h 에 control 에 비하여 20 Gy 에서 유의적으로 높게 나타났고 12 h 에는 유의적으로 낮게 나타났다(Fig. 40). 이를 통해 20 Gy 에서 수온 스트레스에 Lysozyme 이 초기에 민감하게 반응하여 생체 방어작용을 하고 있음을 확인할 수 있었다.

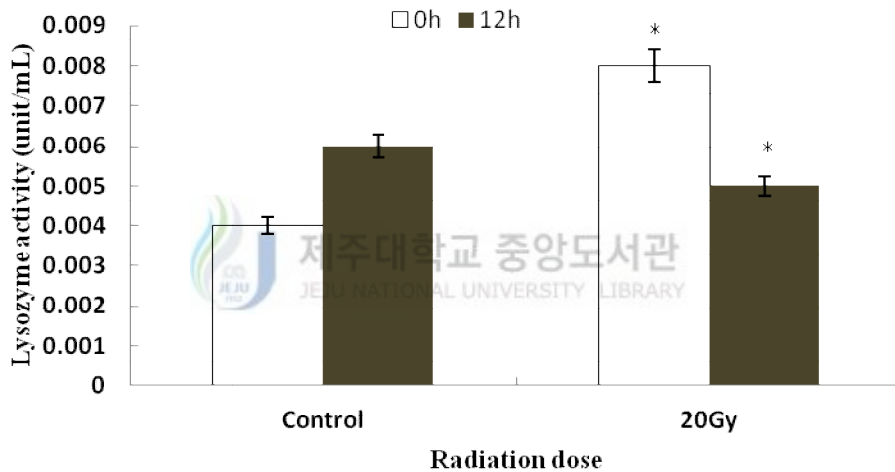


Fig. 40. Effect of high water-temperature stress on Lysozyme activity in small abalone (*H. diversicolor aquatili*) reared with different dose radiation.  
\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ ).

### 3) 둥근전복의 저염분 내성 변화

#### 3-1) 생존율

염분 스트레스 실험은 이전 연구에서 진행되었던 저염분 자극에 따른 둥근전복의 폐사를 발생하였던 25 psu 에서 24 h 간 수행하였으며 감마선을 조사한 실험구가 control 실험구에 비하여 생존율이 유의적으로 높게 나타났다.

특히 20 Gy 실험구에서 95%로 가장 높게 나타났으며(Fig. 41) 이는 감마선을 조사한 실험구에서 control 에 비하여 면역 활성이 증가한 것으로 사료된다.

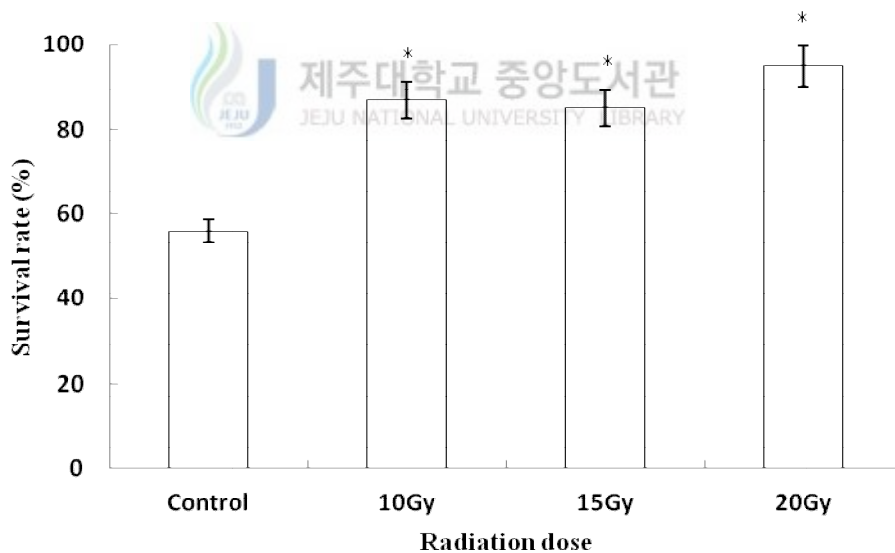


Fig. 41. Survival of disk abalone(*H. discus discus*) reared with different dose radiation at 24 h after exposure to low-salinity(25‰) stress.

\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ ).

### 3-2) 항산화 효소 변화

감마선을 조사하여 생산된 치패를 염분 스트레스를 이용하여 SOD 와 CAT 효소를 확인하였다. SOD 효소는 0 h 짜에 control 에 비하여 20 Gy 에서 유의적으로 높게 나타났으며 10 Gy, 15 Gy 에서는 유의적으로 낮게 나타났다(Fig. 42-A). 또한 24 h 짜에는 control 에 비하여 감마선 조사 실험구에서 유의적으로 높게 나타났다. 이는 control, 20 Gy 에서 염분스트레스에 의한 SOD 활성이 급격히 증가한 것으로 보아 초기 생리적인 방어 기작이 작동한 것으로 판단된다.

CAT 효소는 0 h 에 control 실험구에 비하여 감마선을 조사한 실험구에서 유의적으로 낮게 나타났으며 12 h 에는 10 Gy 에서 control 에 비하여 유의적으로 높게 나타났으며, 15 Gy, 20 Gy 에서는 유의적으로 낮게 나타났다(Fig. 42-B). 이는 10 Gy 를 제외한 나머지 실험구에서는 스트레스에 대한 방어체계가 작동하는 것으로 판단된다.

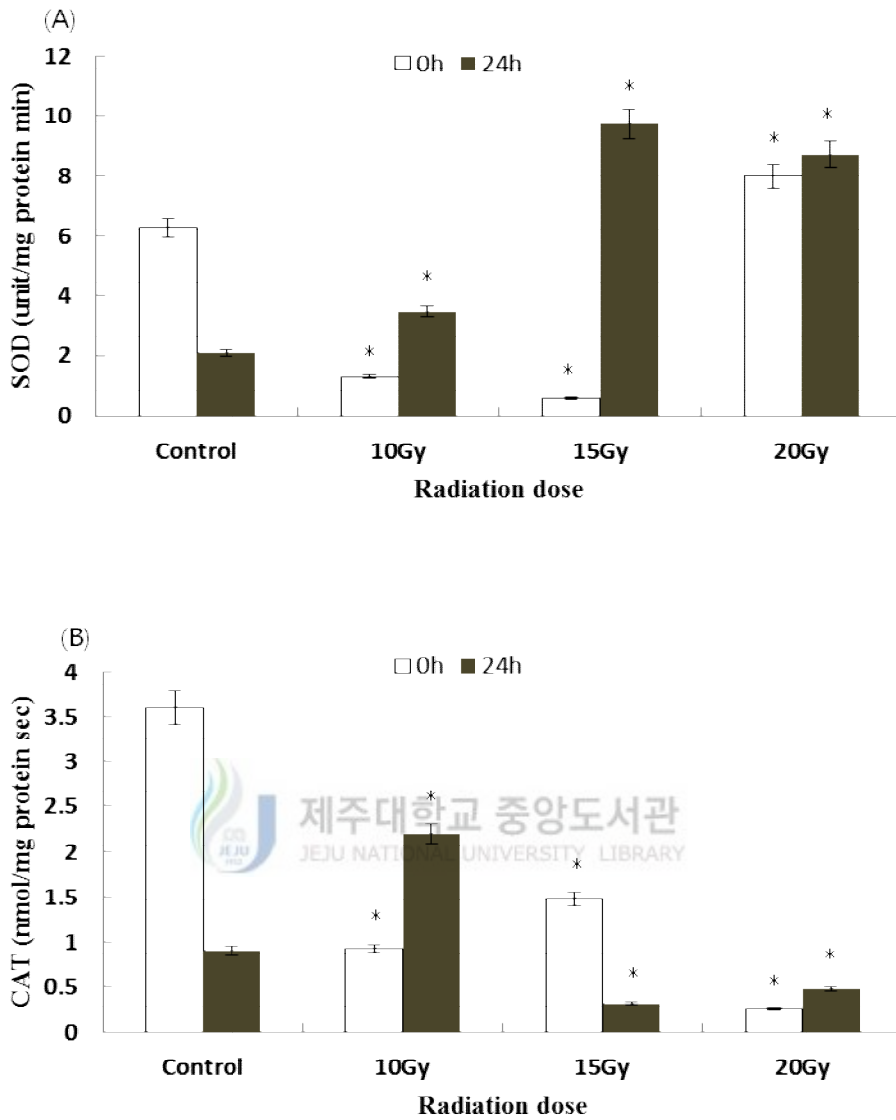


Fig. 42. Change of superoxide dismutase (SOD; A) and catalase (CAT; B) low-salinity stress on activity in disk abalone (*H. discus discus*) reared with different dose radiation.  
 \*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P < 0.05$ ).

### 3-3) Respiratory burst activity 변화

염분 스트레스에 의한 전복의 Respiratory burst activity 변화는 0 h 과 24 h 에 모든 실험구에서 유의적인 차이는 나타나지 않았다(Fig. 43). 이는 모든 실험구에서 염분 스트레스에 반응하여 초기 면역력 증가로 활성산소를 발생시킨 것으로 판단된다.

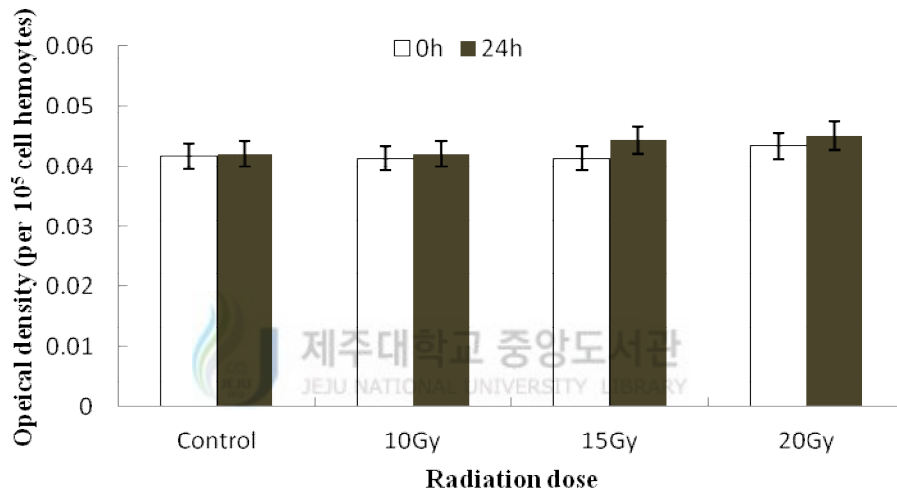


Fig. 43. Effect of low-salinity stress on Respiratory burst activity in disk abalone (*H. discus discus*) reared with different dose radiation.

\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P < 0.05$ ).

### 3-4) Phenoloxidase activity 변화

염분 스트레스에 의한 전복의 Phenoloxidase activity 변화는 0 h 에 15 Gy 에서 control 에 비하여 유의적으로 높게 나타났으며 12 h 에는 다른 실험구에 비하여 control 이 높게 나타나는 경향을 나타냈다(Fig. 44). 이러한 결과는 control 에서 염분 스트레스에 의하여 면역력이 저하를 가져오기 때문에 생체 방어 작용인 Phenoloxidase 를 증가 시킨 것으로 판단되며 다른 실험구에서는 생체방어 기작을 하지 않은 것으로 판단된다.

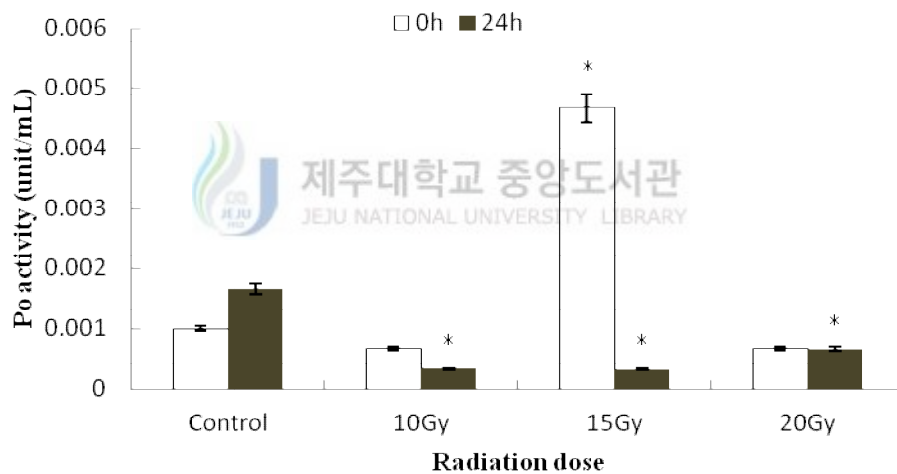


Fig. 44. Effect of low-salinity stress on Phenoloxidase activity in disk abalone

(*H. discus discus*) reared with different dose radiation.

\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P < 0.05$ ).



### 3-5) Lysozyme activity 변화

염분 스트레스에 따른 Lysozyme activity 변화를 알아보기 위하여 전복의 혈액을 채취하여 분석하였다. 염분 스트레스에 따른 Lysozyme activity 변화는 0 h 에 다른 실험구에 비하여 10 Gy 에서 유의적인 증가를 나타내었고, 12 h 에는 다른 실험구에 비하여 control 실험구에서 유의적인 증가를 나타내었다(Fig. 45). 이를 통해 control 실험구에서 염분 스트레스에 Lysozyme 이 민감하게 반응하여 생체 방어작용을 하고 있음을 확인할 수 있었다.

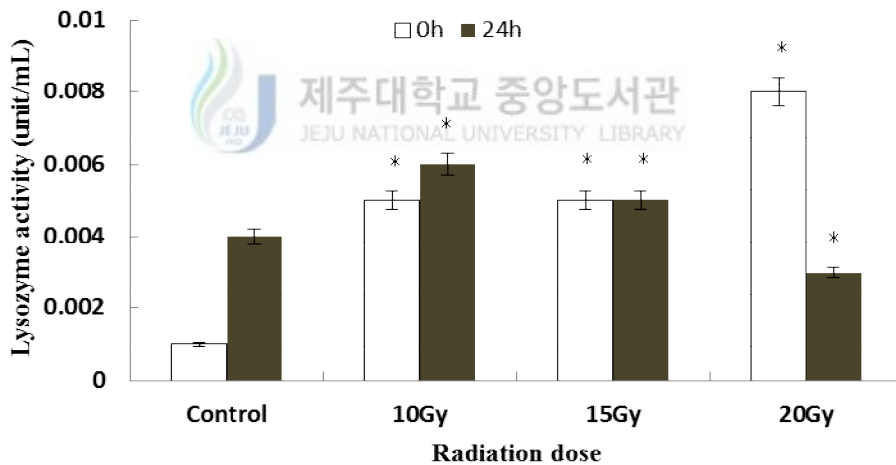


Fig. 45. Effect of low-salinity stress on Lysozyme activity in disk abalone (*H. discus discus*) reared with different dose radiation.

\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P < 0.05$ ).

#### 4) 오분자기의 저염분 내성 변화

##### 4-1) 생존율

염분 스트레스 실험은 이전 연구에서 진행되었던 저염분 자극에 따른 둥근전복의 폐사를 발생하였던 25 psu 에서 24 h 간 수행하였으며 모든 실험구에서 100%의 생존율을 나타내었다(Fig. 46). 오분자기는 바다에서도 조간대에 서식하는 패류로서 우천시에도 조간대에 부착하여 있어 둥근전복에 비하여 염분 변화에 강한 종으로 판단된다.

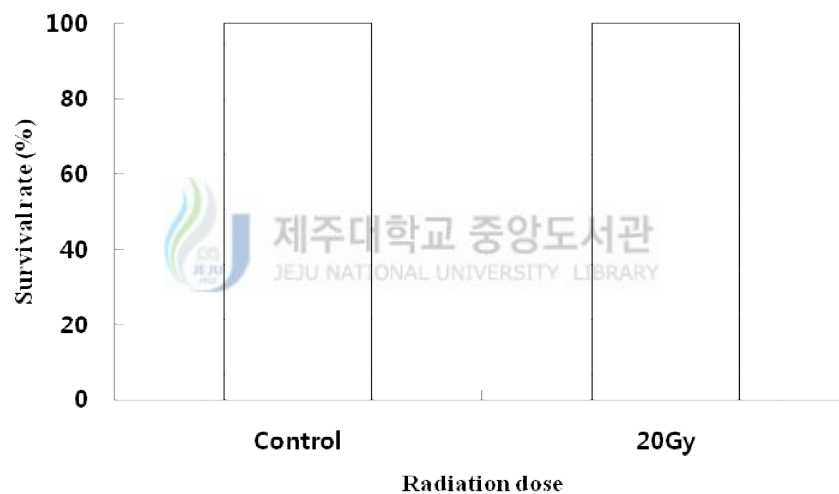


Fig. 46. Survival of small abalone (*H. diversicolor aquatili*) reared with different dose radiation at 24 h after exposure to low-salinity (25‰) stress.

\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ ).

#### 4-2) 항산화 효소 변화

감마선을 조사하여 생산된 오분자기 치패를 염분 스트레스를 이용하여 SOD 와 CAT 효소를 확인하였다. SOD 효소는 0 h 에 control 과 20 Gy 에서 유의적인 차이는 나타나지 않았으나 24 h 에는 control 에 비하여 20 Gy 에서 유의적으로 낮게 나타났다( $P<0.05$ , Fig. 47-A).

이에 반해 CAT 효소는 0 h 에 control 에 비하여 20 Gy 에서 높게 나타났으며 24 h 에는 control 에 비하여 20 Gy 에서 유의적으로 낮게 나타났다( $P<0.05$ , Fig. 47-B). 이는 20 Gy 실험구에서 염분변화 스트레스에 대한 방어체계가 작동하는 것으로 판단된다.



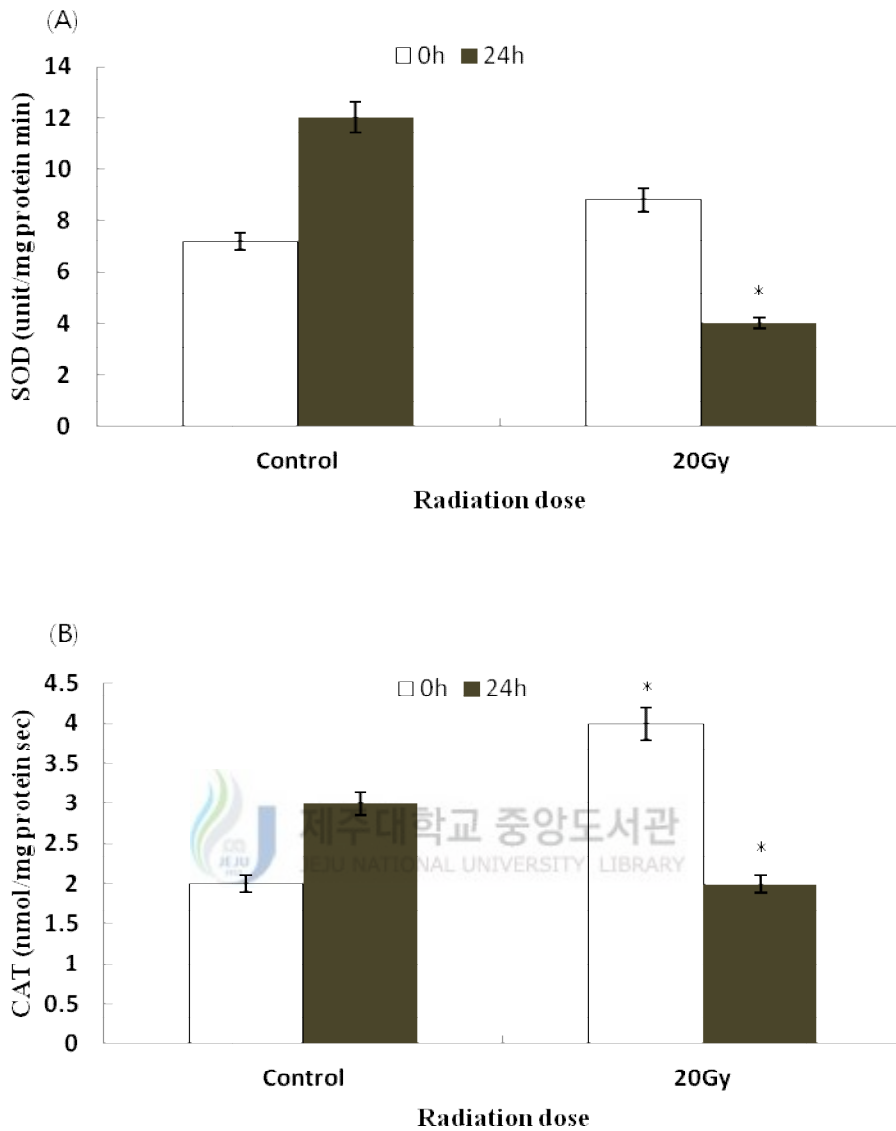


Fig. 47. Change of superoxide dismutase (SOD; A) and catalase (CAT; B) low-salinity stress on activity in small abalone (*H. diversicolor aquatili*) reared with different dose radiation.

\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P < 0.05$ ).

#### 4-3) Respiratory burst activity 변화

염분변화 스트레스에 의한 오분자기의 Respiratory burst activity 변화는 모든 실험구에서 0 h 에는 유의적인 차이는 나타나지 않았으며 24 h 쯤에는 20 Gy 에서 control 에 비하여 유의적인 감소를 나타내었다(Fig. 48). 이는 20 Gy 에서 염분 스트레스에 반응하여 초기 면역력 증가로 활성산소를 발생시킨 것으로 판단된다.

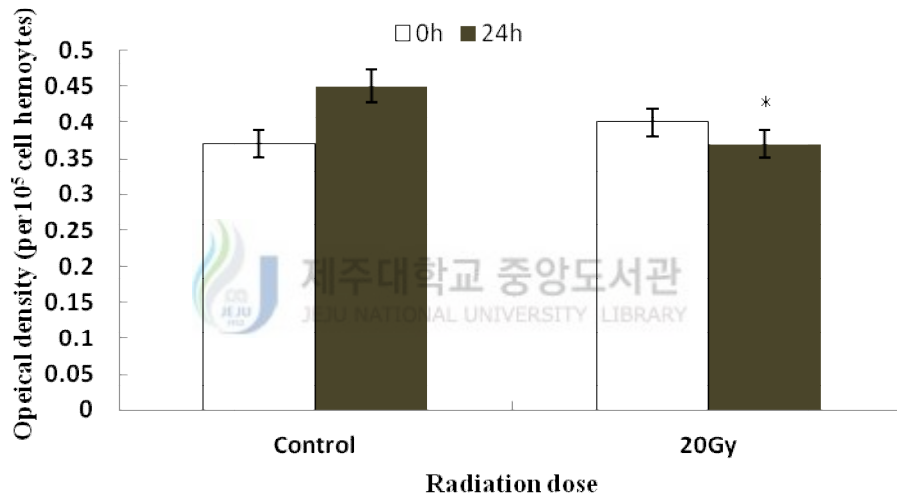


Fig. 48. Effect of low-salinity stress on Respiratory burst activity in small abalone (*H. diversicolor aquatili*) reared with different dose radiation.

\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P < 0.05$ ).

#### 4-4) Phenoloxidase activity 변화

염분변화 스트레스에 의한 전복의 Phenoloxidase activity 변화는 0 h 쯤에 control 과 20 Gy 에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았으며 24 h 에는 control 에 비하여 20 Gy 에서 유의적인 감소를 나타내었다(Fig. 49). 이는 control 에서는 염분변화 스트레스에 의하여 면역력이 저하를 가져오기 때문에 생체 방어 작용인 Phenoloxidase 를 증가 시킨 것으로 판단되며 20 Gy 에서는 염분변화에 강해 생체방어 기작을 하지 않은 것으로 판단된다.

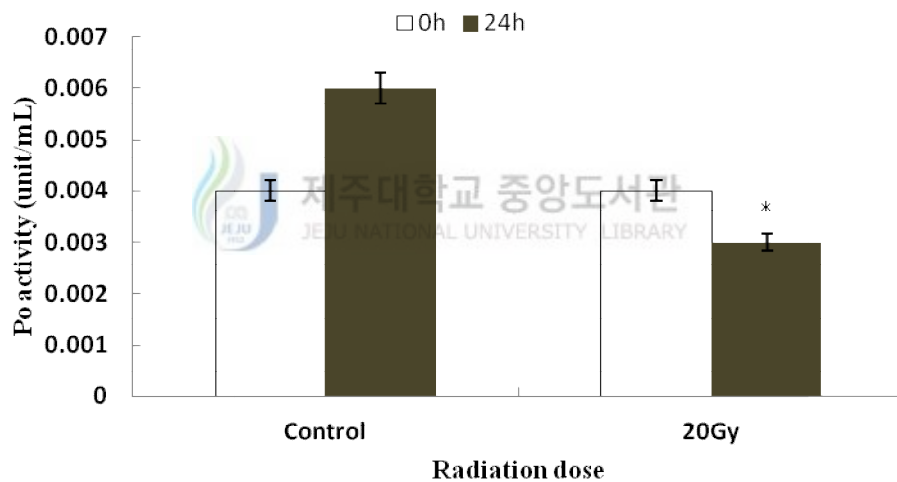


Fig. 49. Effect of low-salinity stress on Phenoloxidase activity in small abalone (*H. diversicolor aquatili*) reared with different dose radiation.

\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P<0.05$ ).

#### 4-5) Lysozyme activity 변화

염분변화 스트레스에 따른 Lysozyme activity 변화를 알아보기 위하여 전복의 혈액을 채취하여 분석하였다. 염분 스트레스에 따른 Lysozyme activity 변화는 0 h 과 24 h 에 control 에 비하여 20 Gy 에서 유의적인 증가를 나타내었다(Fig. 50). 이는 control 실험구에서 염분 스트레스에 Lysozyme 이 민감하게 반응하여 생체 방어작용을 하고 있음을 확인할 수 있었다

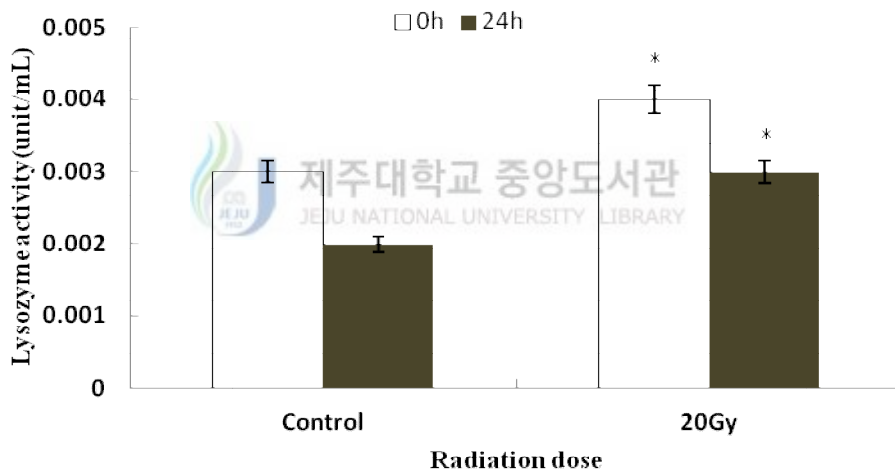


Fig. 50. Effect of low-salinity stress on Lysozyme activity in small abalone

(*H. diversicolor aquatili*) reared with different dose radiation.

\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P < 0.05$ ).

5) 면역유전자 CASPASE-8 mRNA 변화

감마선 조사에 따른 면역 유전자인 Caspase-8 mRNA 변화를 알아보기 위하여 control, 10, 15, 20 Gy 의 실험구 아가미 조직에서 샘플을 적출하여 RT-PCR 을 실시하였다. 그 결과 RT-PCR 을 통한 면역유전자 발현은 모든 실험구에서 발현하였다. 하지만 20 Gy 에서 다른 실험구에 비하여 높게 발현하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 51). 이러한 결과를 보았을 때 감마선 20 Gy 를 조사한 실험구가 환경내성이 뛰어난 것으로 판단된다.

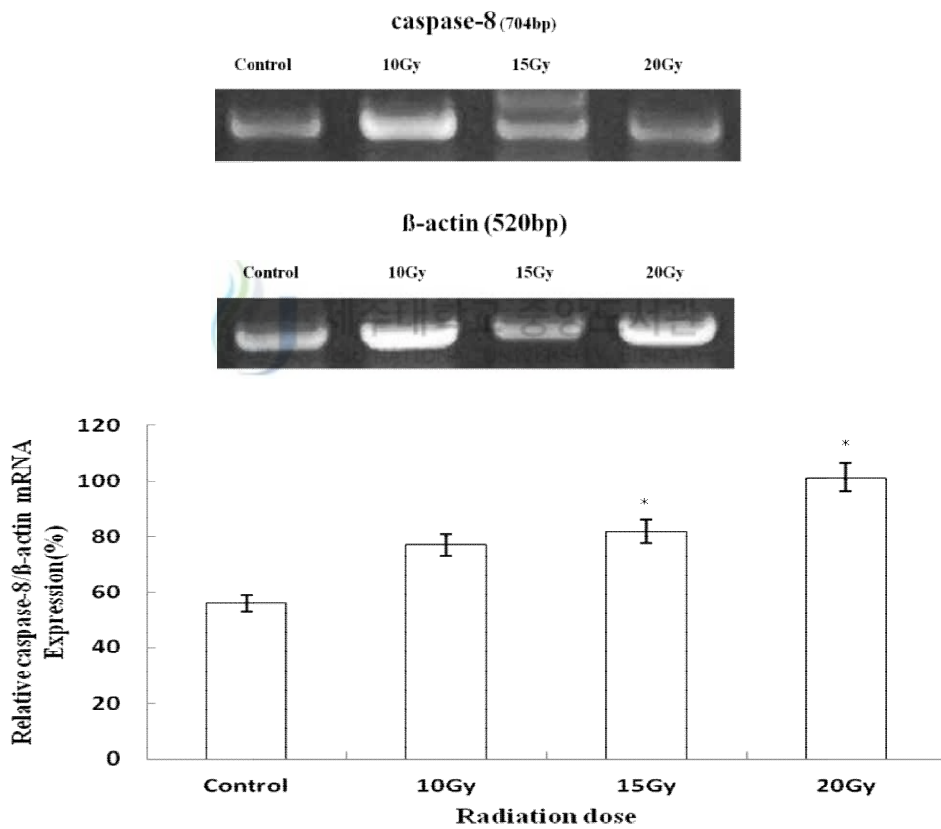


Fig. 51. Effect of gamma radiation on  $\beta$ -actin mRNA and Caspase-8 mRNA of gill in disk abalone (*H. discus discus*) reared with different dose radiation.

\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P < 0.05$ ).



6) 열충격단백질(HSP 70)mRNA 변화

감마선 조사에 따라 스트레스 단백질인 열충격단백질(HSP 70)의 변화를 알아보기 위하여 수온 control, 10, 15, 20 Gy 실험구와 염분 control, 10, 15, 20 Gy 의 실험구 아가미 조직에서 샘플을 적출하여 RT-PCR 을 실시하였다. 그 결과 HSP 70 유전자 발현은 수온 20 Gy 실험구와 염분 20 Gy 실험구에서 발현하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 52, 53). 이는 수온 스트레스인 30℃에서는 감마선 20 Gy 를 조사한 실험구가 환경내성이 뛰어난 것으로 판단되며 염분 스트레스인 25 psu 에서 감마선 10 Gy 와 20 Gy 를 조사한 실험구가 자가 면역기작 능력이 뛰어난 것으로 판단된다.

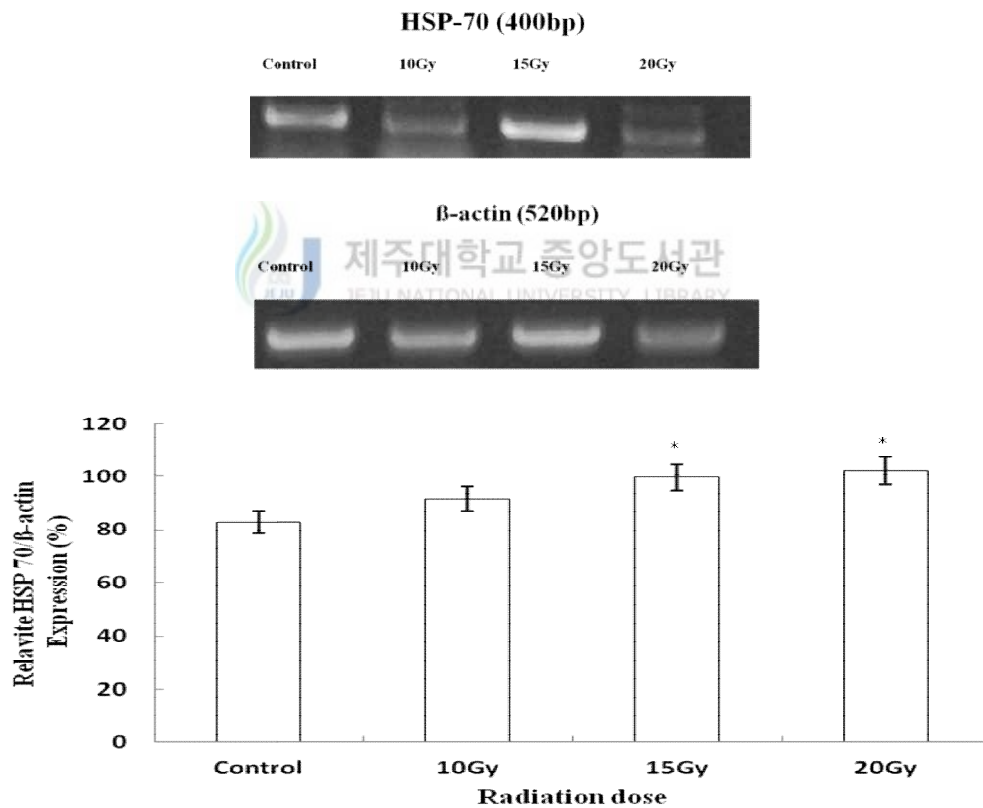


Fig. 52. Effect of high water-temperature stress on β-actin mRNA and HSP 70 mRNA of gill in disk abalone (*H. discus discus*) reared with different dose radiation. \*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P < 0.05$ ).

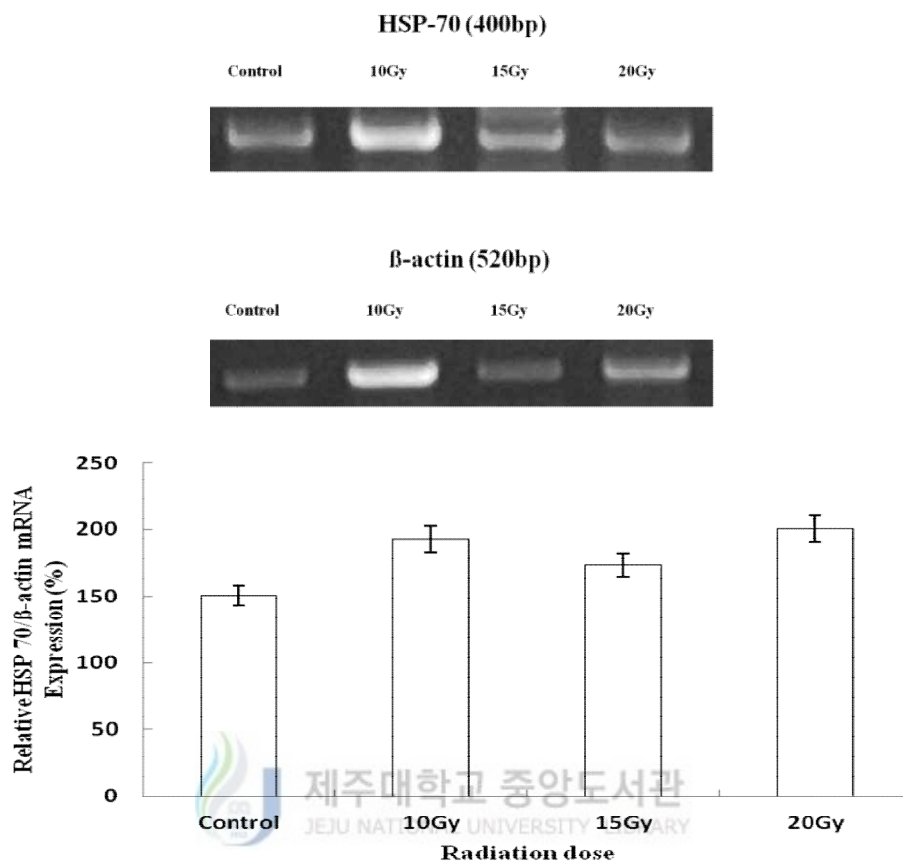


Fig. 53. Effect of low water-salinity stress on  $\beta$ -actin mRNA and HSP 70 mRNA of gill in disk abalone (*H. discus discus*) reared with different dose radiation.

\*Significant difference between control group and gamma radiation group based on the Student's t-test ( $P < 0.05$ ).

#### 4. 고찰

전복류는 우리나라 남해안과 제주도, 일본 및 중국에서 주로 양식되고 있으나 지구 온난화와 해양 환경의 변화에 따라 스트레스 요인으로 작용하여 폐사가 일어나고 있다. 해양환경의 변화는 양식생물의 생리·생태에 장애를 초래하여 성장, 생존 및 번식등에 큰 영향을 끼치는 것으로 알려져 있다(Holliday *et al.*, 1993; Shin *et al.*, 2002; Jwa *et al.*, 2009).

양식생물은 외부환경의 변화에 따라 어느 정도는 스트레스를 극복할 능력을 가지고 있으며, 임계수준을 넘어선 스트레스는 생물의 생리활성을 떨어뜨림으로써 건강도를 약화 시킨다(Barton and Iwama, 1991). 전복 양식산업에서 우위를 차지하기 위해서는 환경내성에 강하고 속성장 하는 개체를 개발하여 양식기간을 단축시키는 방법이 최우선 되어야 한다. 속성장 개체 개발 방법으로는 교잡육종법, 선발육종법, 돌연변이 육종법, 방사선 육종법이 있다. 그 중 방사선 기술은 많은 산업분야에서 활발히 이용하고 있고 안정성도 입증되고 있으며 특히 방사선 육종은 유전자 변형기술과 달리 안전성이 입증된 기술로, 세계적인 식량작물 개발에 이용되고 있으나(Lee *et al.*, 2003) 해양동물에 방사선을 이용한 육종에 관한 연구는 거의 없는 실정이다. 하지만 본 연구는 국내·국외 에서 처음으로 감마선을 조사하여 둥근전복과 오분자기 돌연변이 F1 치패를 생산하였고 이러한 돌연변이 F1 개체를 이용하여 외부환경의 변화에 얼마나 강한지를 측정하기 위하여 둥근전복과 오분자기 치패에 고수온 및 저염분에 의한 환경내성 변화를 연구하였다. 고수온에 의한 환경내성 변화는 이전 본 연구진에서 연구된 30℃에서 12 h 짜 100%의 폐사를 일으켰던 폐사 수온인 30℃를 이용하여 12

h 간 수행한 결과 등근전복에 감마선을 조사한 실험구가 control 에 비하여 생존율이 높게 나타났으며 특히 20 Gy 에서 64%의 높은 생존율을 나타내었고, 오분자기는 control 에서 34%, 20 Gy 에서는 56%의 생존율을 나타내었다. 저염분에 의한 환경내성 변화는 저염분 자극에 따른 등근전복의 폐사를 발생하였던 25 psu 에서 24 h 간 수행한 결과 감마선을 조사한 실험구가 control 에 비하여 활동성의 높은 것으로 나타났으며 특히 20 Gy 에서 95%의 생존율을 나타내었다. 오분자기는 control 및 20 Gy 에서 100%의 생존율을 나타내었다. 이는 감마선 조사 모패에서 hormesis 의 효과가 자손에게도 유전적인 영향을 나타낸 것으로 추정되며 특히 20 Gy 가 hormesis 의 영향이 가장 큰 것으로 판단된다. Cho *et al.*(2014)에 의하면 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 에 유도된 HepG2 세포의 산화적 스트레스에 대한 신포종 방사선 돌연변이 블랙베리의 SOD, CAT 효소의 변화를 측정한 결과 대조구에 비하여 유의적인 증가를 나타내었고 항산화 효소의 활성이 관여하여 세포보호 효과를 나타낸 것이라 보고하였다. 이처럼 항산화 효소의 변화 측정은 스트레스에 대한 내성의 지표로 널리 활용되고 있다. 본 연구에서 고수온과 저염분의 물리화학적 스트레스에 의해 돌연변이를 유도한 등근전복과 오분자기가 control 에 비해 감마선 조사구에서 높게 나타났으며, 특히 20 Gy 에서 특히 높은 수치를 나타내어 저선량의 감마선 조사를 통하여 스트레스에 대한 생체내 방어체계가 작동하여 유해한 활성산소를 제거 함으로서 보다 더 환경내성이 강하고 성장 및 생존율이 높은 두 품종의 생산이 이루어진 것으로 판단된다. An *et al.* (2012)에서도 항산화 물질이 어류의 비특이적 면역능을 증강시키는 것을 알아보기 위해 N-acetylcysteine 을 8 종의 어류에 투여하여 lysozyme 활성을

측정한 결과 모든 어류에서 lysozyme 활성이 각각 증가하였다가 감소한다고 보고하였다. 본 연구에서도 감마선 조사 후 생산된 등근전복과 오분자기의 치패에 고수온과 저염분 스트레스를 이용하여 항산화 효소 이외에도 패류의 면역체계로 잘 알려진 Respiratory burst activity, lysozyme activity 및 면역유전자인 caspase-8 mRNA 발현량을 측정한 결과 Respiratory burst activity 에서는 모든 실험구에서 유의적인 차이는 나타나지 않았으나, lysozyme 에서는 control 및 다른 실험구에 비하여 20 Gy 에서 초기 면역활성이 높게 증가하였다가 시간이 경과함에 따라 감소하는 경향을 나타내었다. 이와 같은 결과는 감마선 조사가 N-acetylcysteine 와 같은 항산화 작용과 더불어 초기 면역활성 작용을 하는 것으로 판단된다.

또한, caspase-8 의 발현량을 측정한 결과 모든 실험구에서 면역유전자가 발현은 하였으나 특히 20 Gy 에서 발현량이 높게 나타났다. 이는 항산화 효소 및 lysozyme 활성이 증가하는 것과 동일한 결과를 나타내는 것으로 판단되며 특히 20 Gy 가 환경내성에 가장 강한 것으로 사료된다. Kim *et al.* (2010)에서도 쥐에 강제적으로 운동을 시킬 때 HSP70 이 ROS 에 의해 증가되는데 caspase-8 이 면역활성을 조절함으로써 apoptosis 를 지연시킨다고 보고 하였다. 그래서 본 연구의 결과는 이전의 연구들과 마찬가지로 스트레스를 가하였을 경우 caspase-8 이 초기 면역활성을 조절하는 것으로 사료되며, 육상 동·식물이나 해양동물에서 동일하게 나타나는 것으로 판단된다.

이러한 결과는 육상동물과 비교하였을 때 해양동물에 있어서도 감마선을 이용하여 돌연변이 유도가 가능하고 속성장 및 환경내성에 강한 전복류

개발이 가능하다. 따라서 본 연구에서는 향후 F1 개체를 이용하여 F2 개체를 생산하는데 목적을 두고 있으며 F2 개체를 생산하게 되면 신품종으로 등록이 가능하고 제주도만의 고유전복으로 제주도 전복 양식산업에 경쟁력을 확보할 수 있는데 큰 도움이 될 것으로 사료된다.



## V. 종합 고찰

Hormesis란 자극 또는 축진을 의미하며 해롭지 않은 수준의 가벼운 스트레스, 미량의 독소 등 다양한 물리적, 화학적, 생물학적 방법으로 생명체에 자극을 주면 면역기능 증진, 질병 감소, 수명연장과 같이 생체기능에 유익한 효과를 주는 현상을 말한다. 감마선의 조사는 동물의 성장, 발달, 생식 능력 향상, 수명연장, 방사선 방호, 병원성 감염에 대한 저항력 획득, 면역력의 증강 및 암 발생억제 등을 유발하는 hormesis 현상을 유발시키는 것으로 보고되고 있다(Lucky, 1982).

저선량 감마선에 의한 hormesis 연구는 특히 일본, 미국, 중국, 인도, 소련 등에서 활발히 연구되고 있는 결과를 보면 Bhattacharjee.(1996)에 의하면 1 Gy/day를 5일 동안 조사한 결과 쥐의 고준위 자연 방사선에 대한 저항성이 증가하였고 방사선이 피폭된 지역에 거주한 사람들의 경우 생식력과 면역력이 증가되어 암 발생율이 감소하였다고 보고하였다. 일본에서는 어떠한 방사선도 조사되지 않았던 21-ICR 쥐를 8 Gy의 X-선에 노출시켰을 때 조사 30일 후 쥐의 생존율이 30% 였으나, 5 Gy X-선에 미리 노출되었던 쥐들의 경우에는 70%까지 증가되는 것으로 나타났다(Yonezawa *et al.*, 1996). 또한 일본의 UNSCEAR 보고서(1994)에는 히로시마 폭격 당시의 생존자들은 200mSv의 낮은 선량에 피폭되었지만 그 후 암 발생율과 leukemia로 인한 질병이 감소하는 것으로 보고 되었다.

한편, 저선량 방사선에 대한 곡물류와 식물체에 대한 연구 결과를 보면 밀 종자에 저선량 방사선을 조사하여 재배한 식물체의 경우 수량 증가는 없었으나 질소와 인산 흡수가 증가된다고 보고하였다(Haunold *et al.*, 1980).

채소 원예작물에 대한 연구로는 토마토의 발아 증가, 생육 촉진 및 수량 증가(Abdullaev *et al.*, 1968; Bebawi., 1984)등이 보고 되었으며, Nirale *et al.*,(1973)에 의하면 고추, 양파, 상추에 저선량 감마선을 조사했을 때 생육촉진 효과가 있었다고 보고 하였다.

또한 식물의 경우 방사선 조사에 의한 돌연변이 벼의 주요 특징(Lee *et al.*, 2003), 과일의 경우 저선량 감마선 조사된 헤이워드 참다래의 품질 특성(Kim *et al.*, 2008), 화훼류는 감마선 조사에 의한 주황색 장미 ‘기쁘미’ 육성(Koh *et al.*, 2008) 등 다양하게 신품종을 개발하여 산업적으로 경쟁력을 강화하고 있다.

따라서 본 연구에서도 이러한 연구결과를 바탕으로 감마선 조사에 의한 속성장 및 환경내성에 강한 품종 개발을 위하여 hormesis 의 현상을 나타내는 구간을 조사하기 위해 등근전복과 오분자기에 선량별로 조사하여 생존율, 헐림프 수, 항산화 효소 변화 등을 관찰하였다. 또한 보다 더 세밀한 연구를 위하여 등근전복과 오분자기에 감마선 조사 후 생산된 F1 세대의 수정란 수정율, 부화율, 부착율, 성장율 등을 조사하였고 1 년간의 오랜 사육과정을 통하여 치패의 성장을 및 고수온과 저염분 스트레스를 이용하여 환경내성 평가도 실시하였다.

그 결과 저선량인 10 Gy 와 고선량인 25 Gy 에서 폐사율이 높게 나타났으나 15 Gy 및 20 Gy 에서 폐사율이 다른 실험구에 비하여 낮게 나타났다. 이는 15 Gy 및 20 Gy 에서 등근전복에 hormesis 작용 한 것으로 사료된다. 한편, Kim *et al.*(2007)에서도 참전복에 감마선을 조사하여 생존율 및 성장 등을 조사한 결과 30 Gy 미만의 선량에서 hormesis 의 효과를 유발한다고 보고 한 결과와



동일한 결과로 여겨지며 생존율 이외에도 hormesis 의 효과 측정을 위하여 가장 많이 사용되고 기본이 되는 혈액을 측정하였다. 그 결과, 둥근전복과 오분자기의 모두 감마선 조사 직후에는 혈림프 수가 감소 하였다가 시간이 경과함에 따라 회복되는 경향을 나타내었다. 감마선 조사된 둥근전복 모패로부터 생산된 수정란의 부화율과 부착률은 control, 10 Gy, 15 Gy 에서는 부화율 약 50%, 부착률 약 60%를 나타내었으며, 20 Gy, 25 Gy 선량 에서는 부화율 약 30%, 부착율 약 40%를 나타내었다. 20 Gy, 25 Gy 선량에서는 수정란의 수와 수정율, 부화율 및 부착율이 낮아 치패의 수가 타 실험구에 비해 적어지는 결과를 나타내었다. 또한 오분자기는 수정란의 부화율과 부착율은 control 에서는 부화율 약 70%, 부착율 약 80%를 나타내었으며, 20 Gy 에서는 부화율 30%, 부착율 65%를 나타내었다. Kang *et al.*(1996)에 따르면 감마선 조사는 어린 개체일수록 DNA 및 RNA 손상을 강하게 유발시켜 생리적 장애를 유발하는 것으로 보고하고 있다. 본 연구결과에서 나타난 고선량에서의 부화율과 부착율의 감소 또한 모패의 체내에 존재한 난자에 대한 유전자 손상 유발에 의해 농도 의존적으로 나타난 결과로 추정된다.

한편, Lee *et al.*(1998)은 저선량의 감마선을 고추 작물의 종자에 조사하여 각 선량별로 나타나는 hormesis 효과를 조사한 결과 control 에 비해 저선량에 감마선 조사구에서 발아율이 증가되는 것을 관찰하였고, 생육 양상 등에 영향을 미치는 적정선량을 1 Gy 에서 20 Gy 사이임을 보고 하였다. Kim *et al.*( 2000a, 2000b, 1999a)도 종자에 저선량 감마선을 조사하여 자란 옥수수, 참박, 배추등의 생육이나 수량이 증가하는 것을 관찰하였으며, Koepf

and Kramer(1981)는 저선량 감마선이 조사된 옥수수의 발아율이나 생육의 증가는 종자의 종피를 투과한 저선량 감마선이 지베렐린이나 앱시스산 등의 식물 호르몬의 양적평형에 영향을 미쳐 발아율 및 유식물의 성장을 촉진시키고 결국에는 광합성 기구 및 순광합성량 환경 스트레스에 대한 저항성을 증가 시킨다고 보고하였다. 본 연구에서도 48 주 동안 전복류의 성장을 확인한 결과 15 Gy 와 20 Gy 에서 control 과 다른 실험구에 비하여 성장율이 높은 것으로 확인하였고, 치패중 성장이 빠른 개체를 선별하여 성장유전자인 myostatin mRNA 발현량을 측정 한 결과 control 에서는 성장유전자가 발현을 하지 않았으나 감마선 조사 후 생산된 치패 실험구에서는 발현하는 것을 확인하였고 특히 20 Gy 에서 높은 발현량을 나타내었다.

그러나 새로운 품종의 개발을 시도할 경우, 성장인자만이 중요한 것이 아니라 환경내성에 강한 품종에 대한 검토가 반드시 이루어져야 한다. 이러한 이유는 아무리 성장이 빨라도 환경내성에 약할 경우 작은 스트레스에 의하여 폐사량이 증가하면 양식종으로 적합하지 않다. 따라서 본 연구에서는 고수온에 의한 환경내성 변화를 측정하기 위하여 이전 본 연구진에서 연구된 30℃에서 12 h 쯤 100%의 폐사를 일으켰던 폐사 수온인 30℃를 이용하여 12 h 간 수행한 결과 감마선을 조사한 실험구가 control 에 비하여 생존율이 높게 나타났으며 특히 20 Gy 실험구에서 64%의 높은 생존율을 나타내었고, 저염분에 의한 환경내성 변화는 저염분 자극에 따른 둥근전복의 폐사를 발생하였던 25 psu 에서 24 h 간 수행한 결과 감마선을 조사한 실험구가 control 에 비하여 활동성의 높은 것으로 나타났으며 20 Gy 에서는 95%의

생존율을 나타내었다. 이는 모패의 hormesis 의 효과가 자손에게도 유전적인 영향을 나타낸 것으로 추정된다.

또한, 항산화 효소 이외에도 패류의 면역체계로 잘 알려진 Respiratory burst activity, lysozyme activity 및 면역유전자인 caspase-8 mRNA 발현량을 측정된 결과 Respiratory burst activity 에서는 모든 실험구에서 유의적인 차이는 나타나지 않았으나, lysozyme 에서는 control 및 다른 실험구에 비하여 20 Gy 에서 초기 면역활성이 높게 증가하였다가 시간이 경과함에 따라 감소하는 경향을 나타내었다. 이와 같은 결과를 종합적으로 정리해보면 육상동물과 비교하였을 때 해양동물에 있어서도 감마선을 이용하여 돌연변이 유도가 가능한 것으로 확인되었고, 특히 20 Gy 에서 속성장 및 환경내성에 강한 전복류 개발이 가능한 것으로 판단된다.

이상에서와 같이 본 연구결과 모패에 20Gy의 감마선을 조사하여 F1 세대까지의 성장이 빠르고 환경내성이 강한 개체의 생산이 가능하였다. 그러나 새로운 품종의 개발의 경우 그 형질이 지속적으로 유지되어야 하는 특성이 필요하므로 본 연구의 최종적인 목표는 F2 세대에서의 성장이 빠르고 환경내성이 강한지에 대한 검토가 이루어져야 할 것으로 판단된다. 이를 통하여 등근전복 및 오분자기의 신품종 등록을 가능하게 하여 제주도만의 고유전복으로 제주도 전복 양식산업에 경쟁력을 확보할 수 있는데 큰 도움이 될 것으로 사료된다.

## VI. 요약

Hormesis란 자극 또는 축진을 의미하며 해롭지 않은 수준의 가벼운 스트레스, 미량의 독소 등 다양한 물리적, 화학적, 생물학적 방법으로 생명체에 자극을 주면 면역기능 증진, 질병 감소, 수명연장과 같이 생체기능에 유익한 효과를 주는 현상을 말한다. 감마선의 조사는 동물의 성장, 발달, 생식 능력 향상, 수명연장, 방사선 방호, 병원성 감염에 대한 저항력 획득, 면역력의 증강 및 암 발생억제 등을 유발하는 hormesis 현상을 유발한다.

본 연구 결과에서는 감마선 조사 후 폐사하는 개체를 확인하였고 특히 저선량인 10 Gy 와 고선량인 25 Gy 에서 폐사율이 높게 나타났으나 15 Gy 및 20 Gy 에서 폐사율이 다른 실험구에 비하여 낮게 나타났다. 이는 15 Gy 및 20 Gy 에서 등근전복에 hormesis 작용 한 것으로 사료된다. 감마선 조사된 전복 모패로부터 생산된 수정란의 부화율과 부착률은 control, 10 및 15 Gy 의 실험구에서는 부화율 약 50%, 부착률 약 60%를 나타내었으며, 20 및 25 Gy 선량의 실험구에서는 부화율 약 30%, 부착률 약 40%를 나타내었다. 감마선 조사는 어린 개체일수록 DNA 및 RNA 손상을 강하게 유발시켜 생리적 장애를 유발하는 것으로 보고하고 있다. 본 연구결과에서 나타난 고선량에서의 부화율과 부착률의 감소 또한 모패의 체내에 존재한 난자에 대한 유전자 손상 유발에 의해 농도 의존적으로 나타난 결과로 추정된다. 한편 감마선 조사 후 생산된 치패중 특히 성장이 빠른 개체를 선별하여 성장유전자 myostatin mRNA 발현량을 측정 한 결과 control 에서는 성장유전자가 발현을 하지 않았으나 감마선 조사 후 생산된 치패 실험구에서는 발현하는 것을 확인하였고 특히 20

Gy 실험구에서 높은 발현량을 나타내었다. 등근전복에 고수온, 저염분 스트레스에 의한 caspase-8 의 발현량을 측정한 결과 모든 실험구에서 면역유전자가 발현은 하였으나 특히 20 Gy 실험구에서 높게 발현하였다. 이는 20 Gy 실험구가 다른 실험구에 비하여 환경내성에 강한 것으로 사료되며, 양식생물은 외부환경의 변화에 따라 어느 정도는 스트레스를 극복할 능력을 가지고 있어 생존을 위하여 발현한 것으로 판단된다. 쥐에 강제적으로 운동을 시킬 때 HSP70 이 ROS 에 의해 증가되는데 caspase-8 이 활성 조절함으로써 apoptosis 를 지연시킨다.

이러한 결과는 육상동물과 비교하였을 때 해양동물에 있어서도 감마선을 이용하여 돌연변이 유도가 가능하고 속성장 및 환경내성에 강한 전복류 개발이 가능하여 향후 제주도 전복 양식산업에 경쟁력을 확보할 수 있는 큰 도움이 될 것으로 사료된다.



## VII. 참고문헌

Abbott D. W. and J. T. Holt. 1999. Mitogen-activated protein kinase kinase2 activation is essential for progression through the G2/M checkpoint arrest in cell exposed to ionizing radiation. *J. Biol. Chem.*, 274: 2732-2742.

Abdullaev M. A. and Berezina N.M. 1968. Radiostimulating effect in  $\gamma$  irradiated tomato seedlings. *Dokl. Akad. Nauk az. SSR*, 24: 38-40.

Adams G. E. 1984. Lethality from acute protracted radiation exposure in man. *Int J Radiat Biol.*, 46: 209-217.

Alscher R. G. and J. L. Hess. 1993. Antioxidants in higher exposure in man. *Int J Radiat Biol.*, 46: 209-217.

Amali, AA, Lin CJ, Chen YH, Wang WL, Gong CY, Lee YL, Ko JK, Lu GM, Her TT, Chen and Wu JL. 2004. Up-regulation of muscle-specific transcription factors during embryonic somitogenesis of zebrafish (*Danio rerio*) by knock-down of myostatin-1. *Dev. Dyn.*, 229, 847-856.

Argue, B.J., Arce, S.M., Lotz, J.M. and Moss, S.M. 2002. Selective breeding of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) for growth and resistance to taura syndrome virus. *Aquaculture*, 204: 447-460.

Bakos J, Krasznai Z and Marian T. 1978. Cross-breeding experiments with carp, tench and Asian phytophagous cyprinids. *Aquacult Hung* 1, 51-57.

Barkai, R. and C.L. Griffiths. 1980. An energy budget for South African abalone *Haliotis midae* Linnaeus. *J. Mollusc. Stud*, 54: 43-51.

Bebawi, FF. 1984. Effects of gamma irradiation on *Sorghum Bicolorstriga hermonthica* relation. *Environm. and Exper. Botany*. 24: 123-129.

Belli M., O. Saporà, and M. A. Tabocchini. 2002. Molecular targets in cellular response to ionizing radiation and implications in space radiation protection. *J Radiat Res.*, 43: 13-19.

Bentur Y., Horlatch N., Korean G. 1991. Exposure to ionizing radiation during pregnancy: perception of teratogenic risk and outcome. *Teratology*, 43: 109-112.

Bhattacharjee D. 1996. Role of radioadaptation on radiation-induced thymic lymphoma in mice. *Mutation Research*. 358: 231-235.

Boeuf Gand Harache Y. 1984. Osmotic adaptation of the salmonid species *Salmo trutta*, *Salmo gairdneri* and *Salvelinus fontinalis* and the hybrid *Salmo trutta* ♀ × *Salvelinus fontinalis* ♂ to seawater. *Aquaculture* 4, 343-358.

Boniver, J., Humblet, C., Rongy, A. M., Delvenne, C., Delvenne, P., Greimers, R., Thiry, A., Courtoy, R. and Defresne, M. P. 1990. Cellular events in radiation-induced lymphomagenesis. *Int. J. Radiat. Biol.*, 57, 693-698.

Breslavets I. P., N. M. Berezina G. L. Shchibria, M.L. Romanchikovam, V.A. Lazykova, and Z.F. Milesenko. 1960. Increased yield of radishes and carrots by X or  $\gamma$ -irradiation of seeds before sowing. *Biophysics, (USSR)* 5: 86-89.

Cai L. and S. Z. Liu. 1990. Induction of cytogenetic adaptive response of somatic and germ cells in vivo and in vitro by low-dose X-irradiation. *Int J Radiat Biol.*, 58: 187-194.

Cai L. and P. Wand. 1995. Induction of a cytogenetic adaptive response in germ cells of irradiated mice with very low-dose rate of chronic gamma-irradiation and its biological difference on radiation induced DNA or chromosomal damage and cell killing in their male offspring. *Mutagenesis*, 10: 95-100.

Chance, B., H. Sice and A. Boveris, 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol, Rev.*, 59: 527-605.

Chen, H. C. 1984. Recent innovations in cultivation of edible molluscs in Taiwan with special reference to the small abalone *Haliotis diversicolor* and the hard clam *Metretrix lusoria*. *Aquaculture*, 39:11-27.

Chen, J.C. and Chen, W. C. 2000. Salinity tolerance of *Haliotis diversicolor supertexta* at different salinity and temperature levels. *Aquaculture*, 181: 191-203.



Cho. J. K. and H. C. Yang, 1996. Determination of formaldehyde residue and histopathological observation in formalin and neutral-formalin treated Korean rockfish (*Secastes schlegeli*). J. Fish Pathol., 9(2): 157-168.

Choe MK, Yang SG, Won SH, Park CJ, Han SJ and Yeo IK. 2009. Estimation of Genetic Parameters for Growth-Related Traits in 9-month Old of Two Korean Abalone Subspecies, *Haliotis discus hannai* and *H. discus discus*, by Using Multiple Traits of Animal Model. Kor J Fish Aquat Sci 42(6), 591-599

Choi SD, Yoon JT and Jo YC. 1998. Shell Necrosis of *Haliotis discus hannai* by *Mastigocoleus* sp.(Cyanophyta) in Korea. Journal of Aquaculture 11(4): 465-474

D. Dubner, P. Gisone, I. Jaitovich and M. Perez. 1995. Free radicals production and Estimation of oxidative stress related to  $\gamma$  irradiation. Biological Trace Element Research 47:265-270. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02790126>.

Day RW and Fleming AE. 1992. The determinants and measurement of abalone growth. In: Abalone of the world: biology, fisheries and culture, Shepherd SA, Tegner MJ, Guzman SA and Del Proo SA Eds., Fishing news Books. Blackwell, Oxford, U.K.L, 141-168.

Ebara S., Nakayama K. 2002. Mechanism for the action of bone morphogenic proteins and regulation of their activity. Spine., 16S: S10-S15.

Farag R. S. and K. H. el-Khawas. 1998. Influence of  $\gamma$ -irradiation and microwaves on the antioxidant property of some essential oils. International J. Foods Soc. Nutr., 49: 109-115.

Feinendegen LE, Muhlensiepen H, Bond VP and Sonhaus CA. 1987. Intracellular stimulation of biochemical control mechanisms. *Health Physics*. 52: 663-669.

Ferraris, M., Radice, S., Catalani, P., Francolini, M., Marabini, L. and Chiesara, E. 2002. Early oxidative damage in primary cultures trout hepatocytes: a time course study. *Aquatic Toxicology*, 59: 283-296.

Finch S. C. 1987. Acute radiation syndrome, *JAMA*, 258: 664-667.

Fryer, J. N., 1975. Stress and adrenocorticosteroid dynamics in the goldfish *Carassius auratus*. *Can. J. Zool.*, 53: 1011-1020.

Gale R. P., Butturini A. 1990. The role of hematopoietic growth factors in nuclear and radiation accidents, *ExpHematol*, 18: 958-964.

Gonzalez-Cadavid, N.F., WE. Taylor, K. Yarasheski, I. Sinha-Hikim, K. Ma, S. Ezzat, R. Shen, R. Lalani, S. Asa, M. Mamita, G. Nair, S. Arver and S. Bhasin. 1998. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proc, Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 14938-14943.

Gjedrem, T. 1983. Genetic variation in quantitative traits and selective breeding in fish and shellfish. *Aquaculture*, 33: 51-72.

Gjedrem, T. 1997. Selective breeding to improve aquaculture production. *World Aquaculture*, 28: 33-45.

Gjedrem, T. 2000. Generic improvement of cold-water species. *Aquaculture Research*, 31: 25-33.

Gjerde, B., Terjesen, B.F., Barr, Y., Lein, I., Thorland, I. 2004. Genetic variation for juvenile growth and survival in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*, 236: 167-177.

Gu HD, Lee SJ, Lee JM and Lee BC. 2000. Egg development and larval growth in hybridization of *strongylocentrotus intermedius* (*A. Agassiz*) and *strongylocentrotus nudus* (*A. Agassiz*). *Bull Fish Res Dev* 58, 71-78.

Hahn, K.O. 1989. Handbook of Culture of Abalone and Other Marine Gastropods. CRC Press. Boca Raton, FL., 348pp.

Harada T, Kumai H and Murata O. 1986. Artificial hybrid between Japanese parrot fish and spotted parrot fish. *Bull Japan Soc Sci Fish* 52, 613-621.

Hara, M. and Kikuchi, S. 1992. Increasing growth rate of abalone, *Haliotis discus hannai*, using selection techniques. *NOAA Technical report*, 106: 21-26.

Hall, E. J., 2000. In radiobiology for the Radiologist. 5th ed. USA. Lippincott Williams & Wilkins. 17-123.

Haran-Ghera, N. and Peled, A. 1979. Induction of leukemia in mice by irradiation and radiation leukemia virus variants. *Adv. Cancer Res.*, 30, 45-87.

Haunold, E. and Zebra, J. 1980. Nitrogen content of two spring wheat varieties as by seed irradiation. *Stim. Newsl.* 3: 30-36.

Hulata G. 1995. A review of genetic improvement of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) and other cyprinids by crossbreeding, hybridization and selection. *Aquaculture* 129, 143-155.

Hume DJ, Flethcer AR and Morison AK. 1983. Interspecific hybridization between carp (*Cyprinus carpio* L.) and goldfish (*Carassius auratus* L.) from victorian waters. *Aust J Mar Freshw Res* 34, 915-919.

Huchette MHS, Koh CS and Day RW. 2003. Growth of juvenile blacklip abalone (*Haliotis rubra*) in aquaculture tank: effects of density and ammonia. *Aquaculture* 219, 457-470.



Ikushima T, Aritomi H, and Morisita J. 1996. Radioadaptive response; Efficient repair of radiation induced DNA damage in adapted cells. *Mutation research.* 358: 193-198.

Imsland AK and Jonassen TM. 2001. Regulation of growth in turbot (*Scophthalmus maximus* Rafinesque) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.): aspect of environment × genotype interactions. *Rev Fish Biol Fish* 11, 71-90.

Jung H. T., Y. S. Kim and S. D. Choi. 2004. The change of total weight and food consumption of abalone, *Haliotis discus hannai* under a vibration and noise. *J. Environ. Sci.*, 13(6): 581-589.

Jwa MS, Kang KP, Choe MK and Yeo IK. 2009. Effects of low salinity stresses on the physiology of disc abalone, *Haliotis discus discus*. J Fish pathol 22, 293-303.

Karas J. S., Stanbury J. B. Fatal. 1965. Radiation syndrome from an accidental nuclear excursion. N Engl J Med., 272-755.

Kim KH, Sohn CB, Lee S, Lee SA, Lee JO, Kwon JS and Yook HS. 2008. Quality of 'Hayward' Kiwifruit by Low-Dose Gamma Irradiation. J. East. Asian Soc. Dietary Life 18(1): 49-57.

Kim JB, Lee KJ, Kim DS, Ha BK, Kim SH, Song HS and Kang SY. 2013. An Improved Soybean Cultivar 'Wonyul' with Resistance to Phomopsis Seed Decay by Mutation Breeding. Korean J. Breed., Sci. 45(3)



Kim JK, Lim SH, Kim IJ, Lee YH and Kang HW. 2012. Mutagenesis of *Pleurotus eryngii* by Gamma Ray Irradiation. Kor. J. Mycol. 40(2):93-97.

Kim JK, Lee CJ, Lee YK, Song KW and Yoon YD. 1999a. Cell cycle evaluation of granulosa cells in the  $\gamma$ -radiated mouse ovarian follicles. J. Kor. Radiat Prot., 24(1): 17-22.

Kim JS, LeeEK, Back MH, Kim DH and Lee YB. 2000. Influence of low dose  $\gamma$ -ray radiation on the physiology of germinative seed of vegetable crops. Kor. J. Environ. Agric. 19:58-61.

Kim JS, Lee YK, Back MW, Lee YB and Park YS. 1999. Influence of the low dose  $\gamma$ -ray radiation on the old seed germination and growth of Chinese cabbage, *Korean J. of Environ, Biol.* 17, 11-15.

Kim JS, Lee YK, Park HS, Back MH and Chung KH. 2000. Effects of low dose gamma radiation on the early growth and physiological activity of gourd(*Lagenaria leucanthal*). *Kor. J. Environ. Agri.* 19:142-146.

Kim KJ, Choe MK and Yeo IK. 2007. Effect of Gamma Ray on Growth of Juvenile Abalone, *Haliotis discus hannai*. *Korean J. Environ. Biol.* 25(2): 107-114.

Kim SH, Lee CH, Song YB, Kim BY, Hyun SY and Lee YD. 2012. Reproductive Cycle of Small Abalone, *Haliotis diversicolor aquatilis* in Jeju Coastal Waters . *Dev. Reprod.* Vol. 16, 145-153.



Kim TH, Kim KJ, Yang MH, Choe MK and Yeo IK. 2006. Physiological Changes of juvenile abalone, *Haliotis sieboldi* exposed to acute water-temperature stress. *Korean J Aquacult* 19, 77-83.

Kim TH, Yang MH, Choe MK, Han SJ and Yeo IK. 2005. Physiological studies on acute water-temperature stress of juvenile abalone, *Haliotis discus hannai*. *Korean J Aquacult* 18, 7-12.

Kim YS, Ji SC, Biswajit KB, Amal B, Jeong GS, Osamu M and Kenji T. 2011. Growth and Environmental Tolerances(Water Temperature and Low Salinity) of Hybrid Female

Red Sea Bream *Pagrus major* × Male Black Sea Bream *Acanthopagrus schregeli*. Kor J Fish Aquat Sci 44(3), 276-283.

Kocamis, H., D.C. Kirkpatrick-keller, J. Richter and J. Killefer. 1999. The ontogeny of myostatin, follistatin and activin-B mRNA expression during chicken embryonic development. Growth Dev. Aging, 63, 143-150.

Koep R and M Kramer. 1981. Photosynthetic activity and distribution of photoassimilated  $^{14}\text{C}$  in seedlings of Zea mays grown from gamma-irradiated seeds. Photosynthetica, 15: 484-493.

Koh GC and Ahn KB. 2008. Breeding of Rose 'Gippeumi' with Orange-Red Flower through Gamma Irradiation. Kor J. Hort. Sci. Technol. 26(4):445-448.



Korosi, F. and Krakkai. 1983. Effect of gamma irradiation in *Phaseolus vulgaris* L. seed on  $^{32}\text{PO}_4^{-3}$  uptake of seedlings and its translocation pattern. Environ. Exp. Bot. 23: 149-152.

Kumai H. 1984. Biological studies on culture of the Japanese parrot fish *Oplegnathus fasciatus* (Temminck et schlegel). Bull Fish Lab Kinki Univ 2, 1-127.


Kyoizumi, Nakamura N, Hakoda M. 1989. Detection of somatic mutations at the glycophorin A locus in erythrocytes of atomic bomb survivors using a single beam flow sorter Cancer Res., 49: 209-217.

KNSO (2011) Korea National Statistical Office. Fishery Production Survey DB, Daejeon, Korea.

Langlois R. G., Bigbee WL, Kyoizumi S. 1987. Evidence for increased somatic cell mutations as the glycophorin A locus in atomic bomb survivors. *Science*, 236: 445-448.

Lee EK, Kim JS, Lee YK, and Lee YB. 1998. Effects of low dose  $\gamma$ -ray irradiation on the germination and growth in red pepper. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.*, 39: 670-675.

Lee DM. 1994. Histological study on the injury of the seminiferous tubules of the pheasant (*Phasianus colchicus*) following  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -irradiation. *Korean J. Vet. Res.*, 34: 665-678.

 제주대학교 중앙도서관  
Lee HY, Kim JS, Baek MH, Lee YK and Im DS. 2002. Effects of Low Dose  $\gamma$ -Radiation on the Growth, Activities of Enzymes and Photosynthetic Activities of Gourd (*Lagenaria siceraria*). *Korean J. Environ. Biol.* 20(3):197-204.

Lee IS, Kim DS, Choi SR, Song HS, Lee SJ, Lim YP and Lee YI. 2003. Selection and Agronomics Characterizations of Radiation-induced Variants in Rice. *Korean J. Plant Biotechnology*. 30: 227-232.

Lee IS, Kim DS, Lee SJ, Song HS, Lim YP and Lee YI. 2003. Selection and Agronomic Traits of Radiation-induced Variants in Rice. *Korean J. Plant Biotechnology*. 1: 19-25.



Lee JA. 2003. The energy budgets in various environments and environmental tolerance of ezo abalone *Haliotis discus hannai*. Ph. D. Thesis, Pukyong Nat Univ, Busan, Korean, pp. 145.

Lindop P. J. 1969. The effects of radiation on rodent and human ovaries. Proc. Soc. Med., 62: 144-148.

Little J. B. 2000. Radiation carcinogenesis. Carcinogenesis., 21, 397-404.

Liu S. Z., W. H. Liu, AND J. B. Sun. 1987. Radiation hormesis: its expression in the immune system. Health phys., 52: 579-583.

Liu S. Z., Y. C. Zhang, Y. Mu, S. Xu, and J. X. Liu. 1996. Thymocyte apoptosis in response to low-dose radiation. Mutat Res., 358: 185-191.

Lucky TD. 1980. Hormesis with ionizing radiation. CRC press. Inc. Boca Raton. FL.

Lucas, T., Macbeth, M., Degnan, S.M., Knibb, W. and Degnan, B.M. 2006. Heritability estimates for growth in the tropical abalone *Haliotis asinina* using microsatellites to assign parentage. *Aquaculture*, 259: 146-152.


Luckey T. D. 1982. Physiological benefits from low levels of ionizing radiation. Health Phys., 43: 771-789.

Luebeck E. G. and Hazelton, W. D. 2002. Multistage carcinogenesis and radiation. J. Radiol. Prot. 22, 43-49.

Lyon, G. 1995. Aspects of the physiology of the South African abalone *Haliotis midae* L., and implications for intensive abalone culture. M.Sc. thesis, Rhodes University. Grahamstown, 85pp.

McPherron, A.C. and S.J. Lee. 2002. Suppression of body fat accumulation in myostatin deficient mice. J. Clin. Invest., 109, 595-601.

Moon JH and Pang IC. 2003. Inflowing of Yangtze coastal water in summer and its cause. Bull Mar Res Inst Cheju Nat Univ. 27, 29-47.

 제주대학교 중앙도서관  
Miller MW and WM Miller. 1987. Radiation hormesis in plants. Health physics. 52(5), 607-616.

Nelson D. P. and L. A. Kiesow, 1972. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 °C (with molar extinction coefficients of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solutions in the UV). Anal Biochem, 49: 474-478.

Nirale A. S. and Gaur B. K. 1973. Radiation-induced stimulation crop plant. INSA Symp. on Use of Iostopes and Radiation in Agriculture, Biology and Animal Sciences. Chandigarh, Jan. 1(2): 60-63.

Olesen, I., Gjedrem, T., Bentsen, H.B., Gjerde, B. and Rye, M. 2003. Breeding programs for sustainable aquaculture. *Journal of Applied Aquaculture*, 13: 179-204.

Olivieri G., J. Bodycote, and S. Wolff. 1984. Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive the midine. *Science*, 233: 594-597.

Ozkan L, S, Ozuysal, U. Egeli, and S.B Aidm. 2001. Effect of Taxol plus radiation on the apoptotic and mitotic indices of mouse intestinal crypt cell, *J. Cancer Res. Clin, Oncol.*, 127: 433-438.

Pang IC and Hyun KH. 1998. Seasonal variation of water mass distributions in the eastern Yellow sea and the Yellow sea warm current. *J Kor Soc Oceangr* 33, 41-52

Parihar, M.S., Dubey, A.K., Javeri, T. and Prakash, P. 1996. Changes in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity, ascorbic acid and phospholipid content in liver of freshwater catfish *heteropneustes fossilis* exposed to elevated temperature. *Journal of Thermal Biology*, 21: 323-330

Parihar, M.S., Javeri, T., Hemnani, T., Dubey, A.K. and Prekash, P. 1997. Respinses of superoxide dismutate, glutathione peroxidase and reducedglutathione antioxidant defenses in gill of the freshwater catfish(*heteropneustes fossilis*) to short-term elevated temperature. *Journal of Thermal Biology*, 22: 151-156.

Park, C.J., Lee, J.H., Noh, J.K., Kim, H.C., Park, J.W., Hwang, I.J. and Kim, S.Y. 2012. Growth of pacific abalone, *Haliotis discus hannai*, using selection breeding techniques. *The Korean Journal Malacology*, 28(4): 343-347.

Peck, L.S. 1989. Feeding, growth and temperature in the ormer, *Haliotis kamtschatkana*. *J. Shellfish. Res.*, 17: 743-745.

Robert, S.B. and F.W. Goetz. 2003. Myostatin protein and RNA Transcript levels in adult and developing brook trout. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 210, 9-20.

Seo DC, Choi SD, Rha SJ, Yang HC and Suh HL. 1999. Effects of Zinc Toxicity on Larval Development and Seed Collection of Abalone, *Haliotis discus hannai*. *Journal of Aquaculture* 12(3): 229-236.



Shafman T. D., A. Saleem, J. Kyriakis, R. Weichselbaum, S. Kharbanda and D. W. Kufe. 1995. Defective induction of stress-activated protein kinase activity in ataxia telangiectasia cell exposed to ionizing radiation. *Cancer Res.*, 55: 3242-3245.

Smith M. L. and A. J. Fornace. 1995. Genomic instability and the role of p53 mutations in cancer cells. *Curr Opin Oncol*, 7: 69-75.

Stan S. and A. Croitoru. 1970. Effect of low, moderate and high levels of gamma radiations(<sup>60</sup>Co) on soybean plants. I. Analysis of growth and yield. *Stim.Newsl.*, 1: 23-25.

Tuschl H., H. Altman, R. Kovac, A. Topaloglou, D. Egg, and R. Gunther. 1980. Effects of low-dose radiation on repair processes in human lymphocytes. *Radiat Res.*, 81: 1-9.

Ulich R. L. and Store, J. B. 1978. Influence of dose, dose rate and radiation quality on radiation carcinogenesis and life shortening in RFM mice and BALB/c mice. IAEA-SM-224/204, 95-113.

UNSCEAR. 1994. Sources and effects of ionizing radiation. United Nations scientific committee on the effects of atomic radiation, New York.

Varanka, Z., I. Rojik. I. Varanka, J. Nemcsok and M. Abraham, 2001. Biochemical and morphological changes in carp (*Cyprinus carpio* L.) liver following exposure to copper sulfate and tannic acid. *Comp. Biochem. Physiol.*, 128C: 467-478.



Viana, M.T. 2002. Abalone Aquaculture, An overview. *World Aquaculture*, pp 34-39.

Vlasyuk P.A. 1964. Effect of ionizing radiation on the physiological biochemical properties and metabolism of agricultural plants. *Inst. Fiziol. Biokhim. Rast. SSR.* 24-31.

Wang W, Mai K, Zhang W, Xu W, Ai Q, Liufu Z and Li H. 2012. Dietary selenium requirement and its toxicity in juvenile abalone *Haliotis discus hannai* Ino. *Aquaculture* 333, 42-46.


Wedemeyer GA and McLeay DJ. 1981. Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. In *stress and fish*(Ed. By A.D. Pickering), Academic Press,

London, U.K., 247-276.

Wendel, A. and Feuerstein, S. 1981. Drug-induced lipid peroxidation in mice-  
1. Modulation by monooxygenase activity, glutathione and selenium status. *Biochemical  
Pharmacology*, 30: 2513-2550.

Xu, C., G. Wu, Y. Zohar and S.J. Du. 2003. Analysis of myostatin gene structure,  
expression and function in zebrafish. *J. Exp. Biol.*, 206, 4067-4079.

Yonezawa M., Misonoh J. and Hosokawa Y. 1996. Two type of X-ray induced  
radioresistance in mice, presence of 4 dose ranges with distinct biological effects.  
*Mutation Research*. 358: 237-243.

 제주대학교 중앙도서관  
Zheng H., Zhang G., Liu X. and Guo X. 2006. Sustained response to selection in an  
introduced population of the hermaphroditic bay scallop *Argopecten irradians irradians*  
Lamarck (1819). *Aquaculture*, 255: 579-585.

Zyuzikov N.A., K.M. Prise, and M.Z. Zdizienicke. 2001. The relationship between the  
Relative Biological Effectiveness of alpha particle and the radios-ensitivity of different  
mutations chinese hamster cells, *Radiat. Environ. Biophys*, 40: 243-248.

## 감사의 글

대학원 생활 동안 세심한 관심과 격려 그리고 많은 깨달음을 주시고 이 논문이 완성되도록 지도해 주신 여인규 교수님께 진심으로 감사 드립니다. 또한 바쁘신 가운데도 저의 논문을 심사해주시고, 귀중한 조언과 따뜻한 격려를 아끼지 않으셨던 이영돈 교수님, 이승헌 교수님, 최미경 박사님, 김대경 박사님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고 늘 관심과 조원으로 격려해주신 허문수 교수님, 전유진 교수님, 정준범 교수님, 한국해양대학교의 조성환 교수님께도 진심으로 감사 드립니다. 직장생활을 하느라 실험실에도 자주 가지 못하였지만 그래도 실험을 열심히 도와주고 박사학위 논문 발표 준비할 때 저녁 늦게까지 남아서 도와준 실험실 식구인 경필, 혜나, 진이, 혜림, 천만, 현석이 그리고 졸업하셨지만 항상 따뜻한 격려를 해주신 문휴형, 태형이형, 만철이형에게도 감사의 마음을 전합니다. 그리고 PCR 실험을 도와준 해양 바이러스 실험실의 승민이, 멀리서 응원해준 한국해양대학교의 성효, 희성, 예은, 복길, 원관이에게도 고맙다는 말을 전하고 싶습니다.

또한 멀리서 많은 조언을 해주신 국립수산과학원의 이정의 소장님, 한석중 소장님께도 감사의 말씀을 드립니다.

한편, 대학원 기간 동안 항상 따뜻한 관심과 배려를 아끼지 않으신 이생기 원장님, 김문관 과장님, 강재관 과장님, 원승환 소장님께도 감사의 말씀을 드리며, 업무 중에도 배려와 지원을 해주신 수산종자연구센터의 홍성완 박사님, 박용석 박사님, 김필연 연구사님, 강형철 연구사님, 이대유 주무관님, 내가 필요로 하는 것은 다 챙겨준 순찬이, 윤재, 승휴, 기태 그리고 숙직 때마다 나의 저녁을 챙겨준 영돈이형 에게도 감사 드립니다. 아울러 같이 근무는 하

지 않았지만 본원에서 격려를 해주신 강봉조 박사님, 오성립 박사님, 현재민 연구사님, 김수강 연구사님, 양병규 박사님, 장영환 박사님, 친구인 전봉근 연구사에게도 감사의 마음을 전합니다.

그리고 묵묵히 지켜보며 용기를 주신 장인어른, 장모님, 처가댁 식구들에게도 감사의 마음을 전합니다.

무엇보다도 끝없는 사랑으로 저를 키워주시고 박사논문을 발표한다고 그 누구보다 기뻐하시던 아버지, 어머니 그리고 하나뿐인 동생 민우에게도 감사합니다.

마지막으로 회사일과 학업에 매달리느라 집을 비웠던 긴 시간 동안 묵묵히 버텨주고 응원해준 사랑하는 아내에게 너무 고맙고 미안하다는 말 밖에 생각이 나지 않습니다. 앞으로는 더욱더 성숙해지고 낱아지는 모습을 보여 드리겠습니다.



이분 들이 계시기에 이렇게 무사히 졸업을 할 수 있는 것이라 생각하고 다시 한번 모든 분 들에게 머리 숙여 진심으로 감사 드립니다.