

# 바지락 (*Ruditapes philippinarum*)의 번식량 측정 및 유생발달에 관한 연구

이희중, 강현실, 박경일<sup>1</sup>, Mostafizur Rahman Mondol, 최광식

제주대학교 해양과학대학 해양생명과학과, <sup>1</sup>군산대학교 해양과학대학 수산생명의학과

## Quantification of Reproductive Effort and Microscopic Observation on the Larval Development of Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850)

Hee-Jung Lee, Hyun-Sil Kang, Kyung-IL Park<sup>1</sup>, Mostafisur Rahman Mondol and Kwang-Sik Choi

School of Marine Biomedical Science, Jeju National University

<sup>1</sup>Department of Aquatic Life Medicine, College of Ocean Science and Technology, Kunsan National University, Gunsan 573-701, Republic of Korea

### ABSTRACT

Larval development of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* reared in an indoor tank system was examined in this study using light microscope and scanning electron microscope. To induce spawning and subsequent larval development, clams were collected from the intertidal zone at Gim-nyeong harbor in Jeju Island in August 2011. After 2 days of rearing in the tank, all Manila clams spawned in the midnight. Non-feeding trochophore larvae appeared 7hrs after fertilization and the first D-shape larvae could be observed at 19 hrs. Twenty one days after fertilization the pediveliger larvae crawling on the bottom of the tank with well-developed foot were observed. Histology indicated that all the clams used in this study were in the ripe stage prior to spawning and the gonad-somatic index (GSI), a ratio of the egg mass to the tissue weight, of the ripe female measured by ELISA was 28.6%. The GSI of female clam declined to 17.3% after the massive spawning in the tank, suggesting that Manila clam discharged 40% of the total eggs during the first spawning event. In conclusion, spawning and subsequent larval development of Manila clam was successfully carried out in this study using an indoor tank system, and the information obtained in the present study could be useful in future Manila clam hatchery development.

**Keyword:** *Ruditapes philippinarum*; larval development; reproductive effort; SEM, Histology.

### 서론

바지락 *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850) 은 서해안의 고유종으로서 서태평양 아열대부터 아한대까지 서식하며 우리나라 전 연안을 비롯하여 동중국해, 남중국해, 서해, 동해, 오희츠크해 그리고 크릴열도의 중간대에 분포하는 것으로 알려져 있다 (Ponurovsky and Yakovlev

1992; Gouletquer, 1997; Min, 2004). 일반적으로 바지락의 연중 산란은 위도에 따라 다르게 나타나는 것으로 알려져 있다. Yap (1977) 에 따르면, 하와이 오희우섬 (19°N, 156°E) 에 서식하는 바지락은 연중산란을 하며, 주된 산란시기는 12-2월로 보고되었다. 한편 이탈리아 베니스 라군 (45°N, 12°E) 에 서식하는 바지락은 주 산란시기가 5-9월 (Meneghetti *et al.*, 2004) 이며, 이는 아일랜드 (53°N, 9°E) 바지락의 산란시기와 동일하다 (Drummond *et al.*, 2006). 우리나라에서 보고된 지역별 바지락의 산란시기는 인천 선재도 7-8월 (Uddin *et al.*, 2010), 전라북도 고평만 5-8월 (Park *et al.*, 2004), 제주도 성산지역 7-8월 (Kang *et al.*, 2004; Ngo and Choi 2004) 로 보고되었으며, 바지락의

Received: June 11, 2012 ; Accepted: June 22, 2012  
Corresponding author: Kwang-Sik Choi  
Tel: +82 (64) 754-3422 e-mail: skchoi@jejunu.ac.kr  
1225-3480/24435

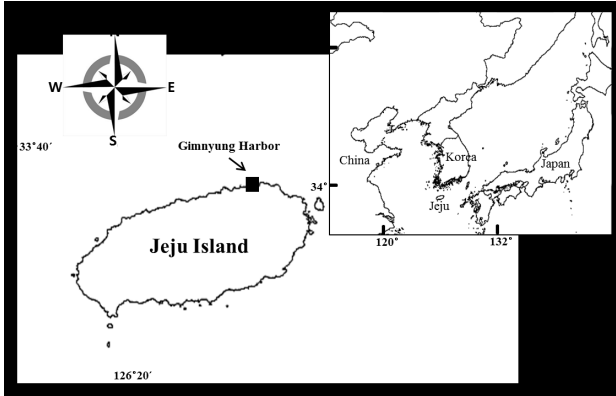


Fig. 1. Location of the study site.

성 성숙은 수온 및 염분과 같은 환경인자와 더불어 먹이생물의 계절적 변화와도 밀접한 관계를 갖는 것으로 알려져 있다 (Kang *et al.*, 2000, 2010).

우리나라의 경우 바지락 양식에 쓰이는 치패 공급은 전적으로 자연채묘에 의존하고 있으며, 바지락 치패는 주로 서해안의 안면도와 보령지역에서 8월 중순부터 10월 초 사이 수확된다 (KOSIS, 2003). 이와 대조적으로 외국의 경우 바지락 양식에 쓰일 치패는 인공종묘생산을 통하여 생산되고 있으며, 이를 위하여 바지락의 생활사 및 유생발생 등에 관한 다양한 연구를 수행하고 있는 반면, 국내에는 그 연구가 국한적이다 (Hur *et al.*, 2005). 바지락 유생발생 과정은 생활사는 모패로부터 방출된 정자와 난자의 수정에 의한 극체 (polar body) 형성, 2,4,8,16 세포세포분열, 상실기 (morula) 및 운동성을 가지게 되는 포배기 (blastula), 낭배기 (gastrula), 자유 유영 생물을 하는 담륜자 유생기 (trochopore larvae) 를 거쳐 스스로 먹이활동을 시작하는 D 상유생기, 포복피면자유생 (pediveliger) 단계를 거쳐 최종적으로 족 (foot) 및 사이폰이 형성되고 먹이 섭식을 시작하는 post-set 단계로 구분된다 (Hur *et al.*, 2005). 바지락 유생 발생에 영향을 미치는 환경인자는 수온과 염분 및 먹이 등으로 알려지고 있으며, 특히 수온에 따라 그 발달단계가 빨라지거나 느려지는 것으로 알려지고 있다 (Zhang and Yan, 2006).

김녕항 (33°33' N, 126°44' E) 은 제주도 제주시 구좌읍에 위치한 포구로 상부에는 간조시 외부로 노출되는 모래해안과 화산암으로 이루어진 암반해안이 발달해 있고 용천수가 만으로 유입하는 특징을 가진다. 김녕항 중부 모래 해안에는 다양한 패류가 번식하고 있으며, 특히 바지락과 대양조개가 높은 밀도로 분포하고 있다 (Limpanont *et al.*, 2011). 이 연구는 바지락의 생활사 및 산란특성을 이해하기 위해 바지락 수정란의 배 발생과 유생발달 과정을 광학현미경과 주사현미경을 이용하여 밝히고, 산란 전.후의 바지락 번식 생리학적 특징을 규명하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료 채집

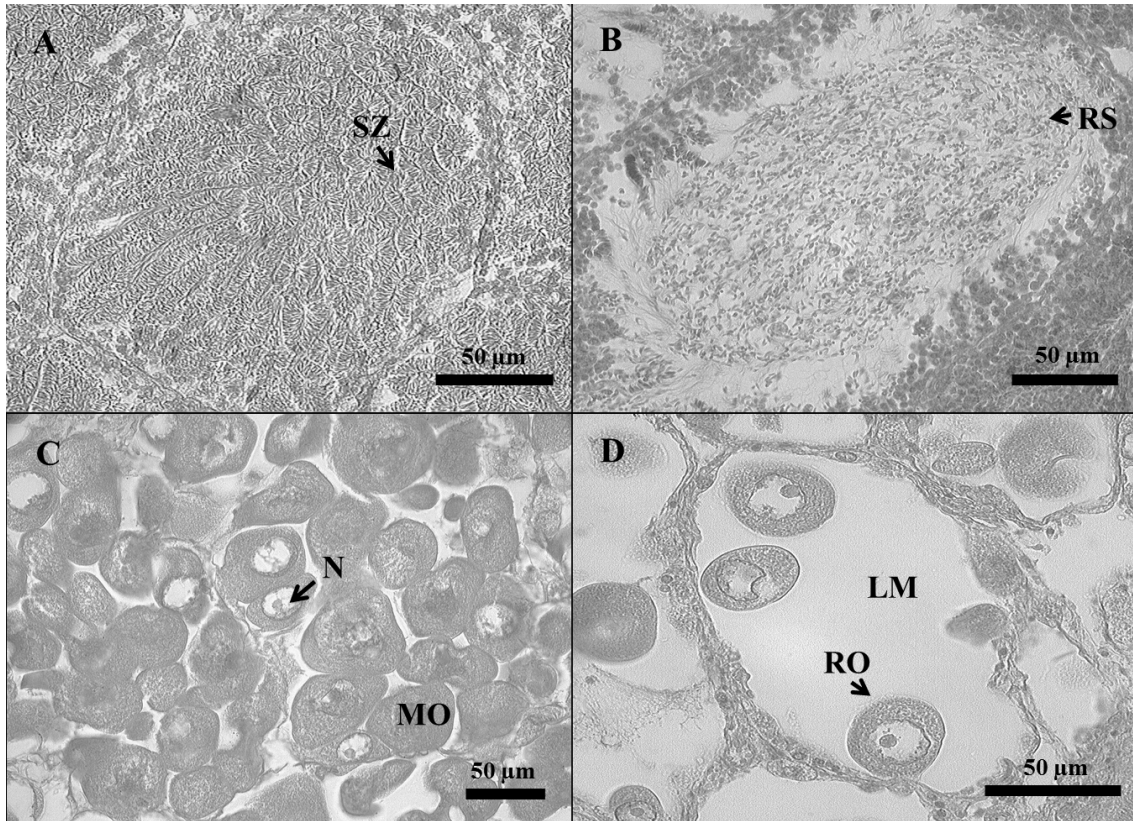
실험에 이용된 바지락은 각장 38-39.8 mm 크기의 50개체로, 2011년 8월 14일 제주도 김녕항에서 채집되었으며 (Fig. 1), 당일 수온은 21.5°C였다. 채집된 바지락은 실험실로 옮겨져 산란 전까지 실내 사육수조에 순치되었다. 총 50개체의 바지락 중, 임의로 선별된 10개체는 산란 전 번식량 및 성 성숙도 분석에 이용되었다.

### 2. 조직학적 관찰

조직학적 관찰은 산란 전에 임의로 선별한 10 개체와 산란 후, 선별된 바지락 18 개체를 대상으로 실시하였다. 조직시료는 바지락 생식소가 포함되도록 체 조직의 중앙을 3 mm 두께로 절단한 뒤, Davison's solution에 48시간 고정하였다. 고정이 완료된 시료는 에탄올 탈수 과정을 거쳐 파라핀으로 포매하였다. 포매된 조직 시료는 마이크로톰을 이용하여 6 μm 두께로 자른 후, 탈 파라핀 과정을 거쳐 Harris's hematoxylin 과 Eosin Y로 염색하였다. 광학현미경하에서 바지락 생식소 발달 단계는 Drummond *et al.*, (2006) 의 방법에 따라 분류하였다. 조직시료 작성에 이용된 바지락을 대상으로 비만도 지수 (Condition Index, CI) 를 산출하였으며, 비만도는 바지락 습 중량 (g)과 패각 건 중량의 비율로 결정하였다.

### 3. 번식량 측정

바지락의 산란 전, 후 번식량 (reproductive effort) 는 Park *et al.*, (2004) 이 개발한 바지락 알에 대한 다클론항체 와면역효소법 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) 을 이용하여 분석하였다. 번식량 측정은 산란 이전 바지락 10 개체 중, 암컷으로 판명된 5 개체와 산란 후 선별된 18개체 중 조직학적 관찰에 의하여 산란이 확인된 암컷 7 개체를 대상으로 실시하였다. 동결건조하여 균질화된 20 mg의 바지락 조직과 순수 분리된 바지락 알 표준물질을 인산완충용액 (0.15 M NaCl, pH 7.3, Phosphate-Buffered Saline, PBS) 에 포함하여 초음파 분쇄기로 균질화 시키고 4°C에서 원심분리하였다. 원심분리된 바지락 조직 상등액은 4,000-5,000배로 희석하였으며, 각각의 상등액 100 μL를 96 well microplate에 24시간 배양하여 항원을 준비하였다. 다음날, Park *et al.*, (2004) 이 개발한 바지락 알에 대한 다클론 항체를 1차 항체, 1차 항체에 대한 alkaline phosphate-conjugated goat anti-rabbit IgG를 2차 항체로 사용하여 반응시켰다. 그 후, 2차 항체에 대한 발색 시약을 첨가 한 뒤 항원항체 반응 결과를 흡광도를 이용하여 측정하였다. 각 시료에 포함된 바지락 알 단백질 양은 표준물질로 포함된 바지락



**Fig. 2.** Photomicrograph of male and female gonads. **A**, ripe testes, SZ, Spermatozoa. **B**, testes in spawning, RS, Relict Spermatozoa. **C**, ripe ovary, MO, Mature Oocyte, N, Nuclear. **D**, ovary in spawning, RO, Residual Oocyte, LM, Lumen.

알의 흡광계수 (optical density) 에 대한 표준 회귀 곡선 (standard regression curve) 과 시료의 회석배수로부터 유추하였다. ELISA에 의하여 측정된 각 개체의 알 단백질량은 바지락 알 단백질이 바지락 알에 차지하는 비율 (40%) 을 감안, 측정된 알 단백질 양에 2.44를 곱하여, 각 개체에 포함된 바지락 알의 양을 추정하였다. 최종적으로 생식소 지수 (Gonad Somatic Index, GSI) 는 ELISA를 통하여 측정된 번식량 (알의 총 중량) 이 전체 조직의 건중량에 차지하는 비율 (egg mass/total tissue dry weight) 로 표현하였다. 또한 각 개체의 포란수 (fecundity) 는 ELISA에 의하여 측정된 바지락 알의 총량을 바지락 알개체 중량 (22 ng, Park *et al.*, 2004) 으로 나누어 추정하였다.

#### 4. 산란유도

바지락의 산란 유도는 수용량 40 L원형수조를 이용하여 실시하였다. 산란 유도시 수온은 24°C, 염분 33.4 psu를 유지하였으며, 해수는 5, 3, 1 µm의 여과필터를 통과한 해수를 사용하였다. 바지락은 별도의 자극 없이 순치 12시간째인 밤 12:00시경 산란하였다. 산란은 24시간 동안 지속되었으며, 수

정란이 침전되지 않도록 통기 (aeration) 하였다. 24시간 후 산란을 마친 바지락 18개체를 선별하여 산란 후 번식상태를 확인 하기 위해 조직과 번식량 측정에 사용하였다.

#### 5. 난 발생 및 유생사육

난 발생과 유생 발달과정을 관찰하기 위해 수정란은 수용량 200 L의 원형수조에 10.3 larvae/mL의 밀도로 실험기간 동안 유지하였다. 사육기간 동안 수온 24.7 ± 1.5°C, 염분 32.7 ± 1.1 psu, 용존산소 6.4 ± 0.3 mg/L의 범위를 나타냈다. 사육수는 2일마다 전량 환수하였으며, 환수 시마다 유생의 크기는 실물투영기 (PJ-200, Olympus) 를 이용하여 측정하였다. 바지락 유생의 먹이공급은 D상 유생이 관찰된 난 발생 24시간 후부터 실시하였다. 먹이생물은 한국 미세조류은행 (KMMCC) 에서 분양 받은 *Isochrysisgalbana* (KMMCC-12), *Chaetoceroscalcitrans* (KMMCC-604), *Tetraselmisuecica* (KMMCC-111) 를 conwy배지를 이용하여 최대 20 L규모로 계대 배양하였으며, Helm *et al.*, (2004) 이 제시한 유생 크기에 따른 먹이공급표에 따라 유생 수와 크기를 계산하여 24시간 동안 먹이공급펌프를 이용하여

**Table 1.** Biometric, CI (Condition Index), GSI (Gonad Somatic Index) and PF (Potential Fecundity) of *Ruditapes philippinarum*. SL, Shell Length, TWWT, Tissue Wet Weight, TDWT, Tissue Dry Weight

Period	Sex	SL (mm)	TWWT (g)	TDWT (g)	CI	GSI (%)	PF	
Before spawning	Female	42.2	3.9381	0.6961	0.4	26.7	8,441,900	
		36.0	2.9361	0.5384	0.5	17.4	4,270,107	
		37.5	3.8643	0.7252	0.5	25.7	8,476,274	
		37.3	4.0230	0.8189	0.6	25.6	9,526,660	
		44.9	6.7677	1.2866	0.7	47.7	27,910,777	
	Mean ± SD	39.6 ± 3.6	4.3058 ± 1.4	0.8130 ± 0.3	0.5 ± 0.1	28.6 ± 10.6	11,725,162 ± 8,739,691	
	Male	38.7	4.5586	0.8212	0.6	-	-	
		40.4	5.6948	1.1082	0.6	-	-	
		43.3	6.3664	1.2157	0.5	-	-	
		38.7	3.7378	0.7012	0.6	-	-	
		39.0	4.4612	0.8163	0.6	-	-	
	Mean ± SD	40.0 ± 1.9	4.9638 ± 1.0	0.9325 ± 0.2	0.6 ± 0.0	-	-	
	After spawning	Female	29.8	1.1665	0.2256	0.4	15.1	1,551,014
			35.0	1.8454	0.3477	0.3	16.1	2,547,321
31.5			1.4536	0.2732	0.3	26.2	3,256,749	
42.4			3.3784	0.6468	0.3	11.0	3,228,073	
45.2			3.4112	0.6958	0.4	14.0	4,441,120	
40.0		2.7404	0.5185	0.4	19.5	4,599,939		
40.0		2.8239	0.5585	0.3	19.0	4,820,910		
Mean ± SD		37.7 ± 5.5	2.4028 ± 0.9	0.4666 ± 0.2	0.3 ± 0.1	17.3 ± 4.7	3,492,161 ± 1,155,535	
Male		41.6	3.2791	0.6022	0.3	-	-	
		39.8	2.7145	0.5123	0.3	-	-	
		38.3	2.8070	0.5614	0.4	-	-	
		39.8	2.7764	0.5316	0.4	-	-	
		41.5	2.7843	0.5214	0.3	-	-	
		38.3	2.6642	0.4896	0.3	-	-	
	37.7	2.3396	0.4493	0.3	-	-		
	35.0	2.2126	0.4376	0.3	-	-		
	33.9	1.9067	0.3653	0.4	-	-		
38.8	2.7937	0.5673	0.4	-	-			
35.1	1.9156	0.3711	0.3	-	-			
Mean ± SD	38.2 ± 2.5	2.5631 ± 0.4	0.4917 ± 0.1	0.3 ± 0.0	-	-		

공급하였다.

### 6. 광학, 전자 현미경을 이용한 수정란과 유생발달 관찰

바지락 수정란의 시간 경과에 따른 난 발생과 유생 발달 과정을 관찰하기 위해 광학 현미경과 주사 전자 현미경 (scanning electron microscope) 을 이용하였다. 수정직후, 수정란의 세포분열, 난황, 배발생, 유생 발생 단계를 광학 현미경으로 관찰하였고, 각 발생 단계별 바지락의 배발생 과 유생의 외형적 특징을 주사 전자 현미경으로 관찰하기 위해 2% glutaraldehyde에 1시간 동안 전 고정하였다. 전 고정이 완료된 시료는 50, 70, 90, 95, 100%의 에탄올로 탈수 과정을 거쳐 30, 50, 70, 100%의 isoamyl acetate (JUNSEI) 로 치환하였다. 치환 후, 시료를 여과지에 옮겨 진공건조를 실시하고, gold 입자로 코팅하였다. 코팅된 바지락 유생 시료는 장 방출주사전자현미경 (JSM-6700F, JEOL Korea Ltd) 를 이용하여 수정란과 유생의 발달단계별 형태 변화를 관찰하였다.

## 결 과

### 1. 조직학적 관찰

2011년 8월 제주 김녕항 조간대에서 채집된 바지락은 암, 수 모두생식소가 완숙하여 방란 및 방정이 임박한 상태였다.

Fig. 2A는 완숙한 바지락 수컷의 생식소로, 중앙에 성숙한 정자 (Spermatozoa, SZ) 가 여포에 가득 채워져 있었다. Fig. 2B는 방정 후 개체에서 관찰된 정소로서, 일부 정자의 방출이 일어나 여포 내 빈 공간이 형성되고 잔존 정자 (Relict Spermatozoa, RS) 가 관찰되었다. Fig. 2C는 산란 전 바지락 암컷의 난소로, 난소소낭 (follicle) 내에는 성숙란 (Mature Oocyte, MO) 이 가득 채워져 있었다. 성숙 난의 크기는 직경 55-60 μm정도 이며, 잘 발달된 핵 (Nuclear, N) 이 관찰되었다. Fig. 2D는 산란을 마친 암컷 개체에서 관찰된 난소로서, 방란 후에 난소소낭 내에는 잔존란 (Residual Oocyte, RO) 이 남아있었고, 난소소낭의 내강 (Lumen, LM) 내에 빈 공간이 관찰되었다.

### 2. 비만도

이 연구에서 측정된 산란 전, 후의 바지락 비만도는 암, 수에 관계없이 평균적으로 0.5 ± 0.11-0.3 ± 0.05로 산란 전, 후로 비만도는 약 40% 감소하였다 (Table 1). 비만도의 감소는 육중량의 감소에 의한 것으로 추정되며, 평균 조직 건 중량은 산란 전 0.6271 ± 0.3 g에서 산란 후 0.3768 ± 0.1 g으로 약 40% 정도 감소하였다 (Table 1).

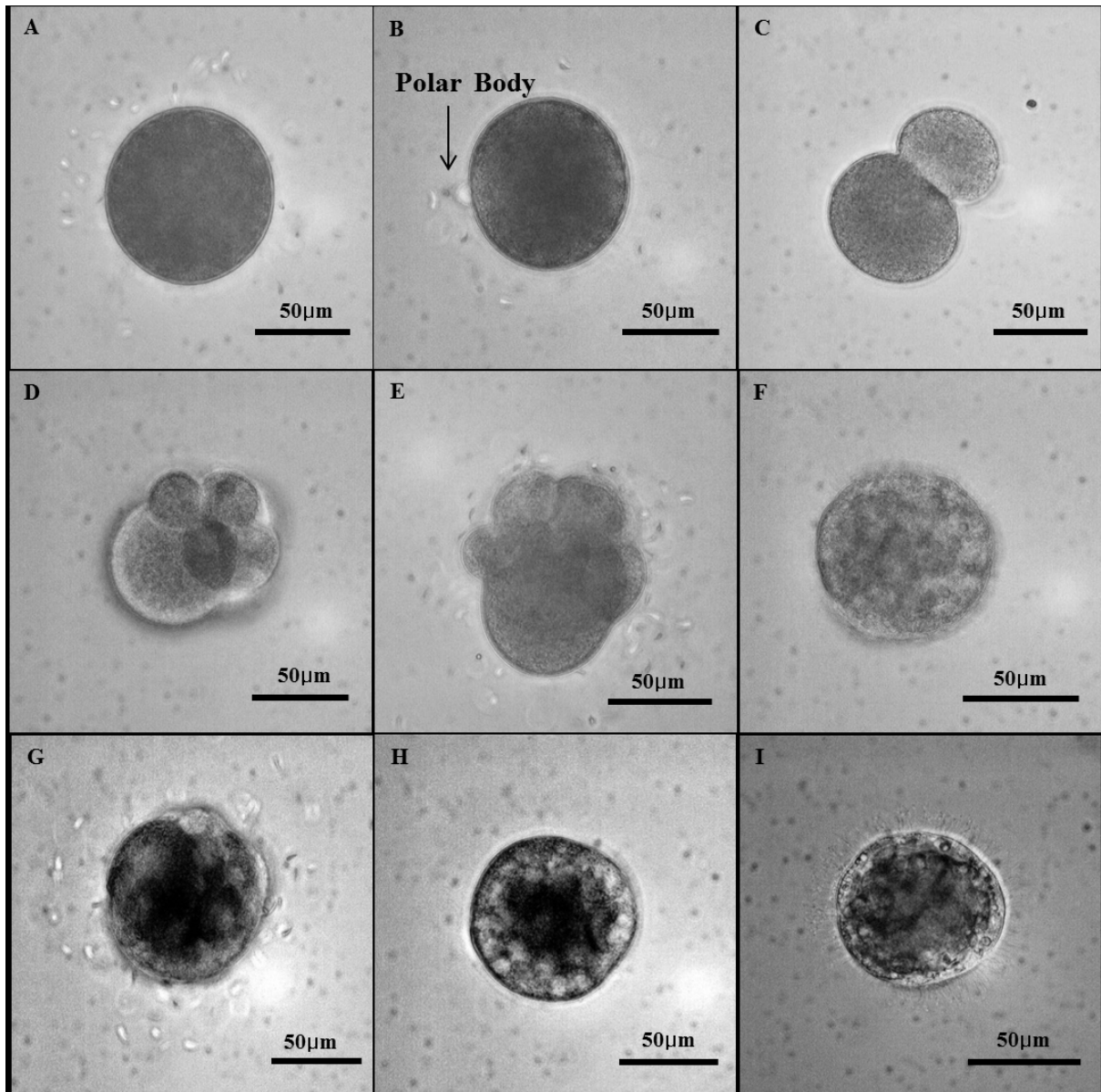


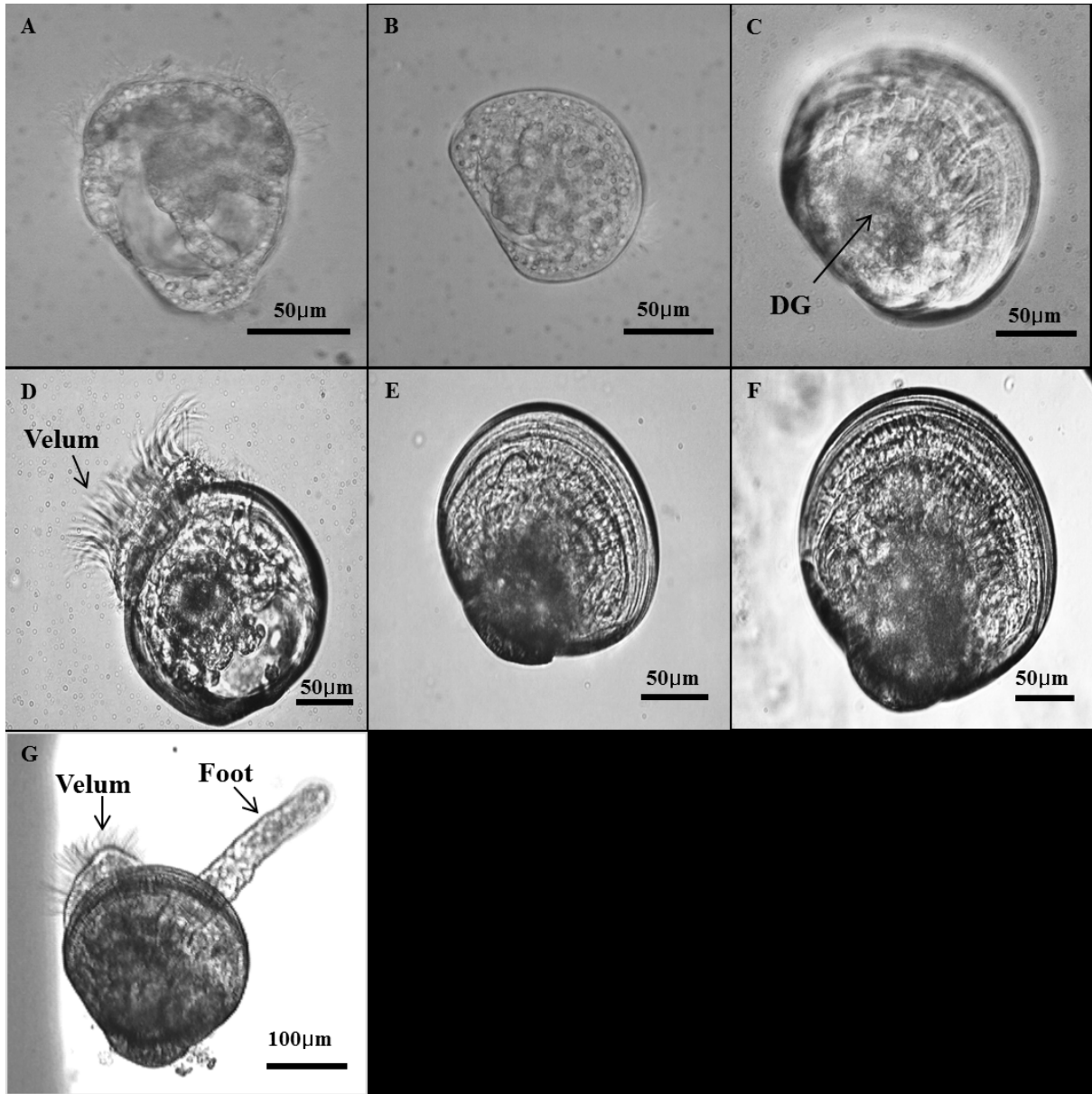
Fig. 3. Photomicrographs of *Ruditapes philippinarum* larvae in different development stages. A, ripe egg. B, fertilized egg. C, 2 cell (1 h). D, 4 cell (1 h 50 min). E, 8 cell (2 h 30 min). F, morula (4 h). G, blastula (4 h 50 min). H, early gastrula (5 h 10 min). I, late gastrula (5 h 40 min).

### 3. 번식량

면역학적 방법을 이용한 산란 직전의 바지락 (N = 5) 에서 측정된 생식소지수 (GSI) 는  $28.6 \pm 10.7\%$ 이었으며, 이를 포란수로 추정한 결과 개체당 평균  $11,725,162 \pm 9,269,842$  eggs를 포함하고 있었다. 이에 반해, 산란을 마친 바지락 (N = 7) 의 생식소 지수는  $17.3 \pm 4.4\%$  이었으며, 평균 포란수는  $3,492,161 \pm 1,155,535$  eggs로 추정되었다. 따라서 방란을 통하여 방출된 바지락 알의 개체수는 약  $8.23 \times 10^6$  eggs로 추정되었다 (Table 1).

### 4. 수정란 배발생 및 유생발달

성숙한 바지락으로부터 방란, 방정된 알과 정자는 우유빛의 색을 띠었으며, 난은 바다에 가라앉는 비부착성 침성란 (demersal eggs) 의 특성을 보였다. 암컷 바지락에서 방란 된 난은 직경  $55-60 \mu\text{m}$ 의 타원형으로 난황막 (vitelline envelope) 으로 둘러싸인 뚜렷한 투명대 (hyaline zone) 에 의해 둘러싸여 있었다 (Fig. 3A, 5B). 수컷 바지락에서 방정된 정자는 활발한 운동성을 보였고, 형태는 긴 원뿔 모양의 두부 (head) 와 한 개의 긴 편모 (flagellum) 를 갖고 있었다

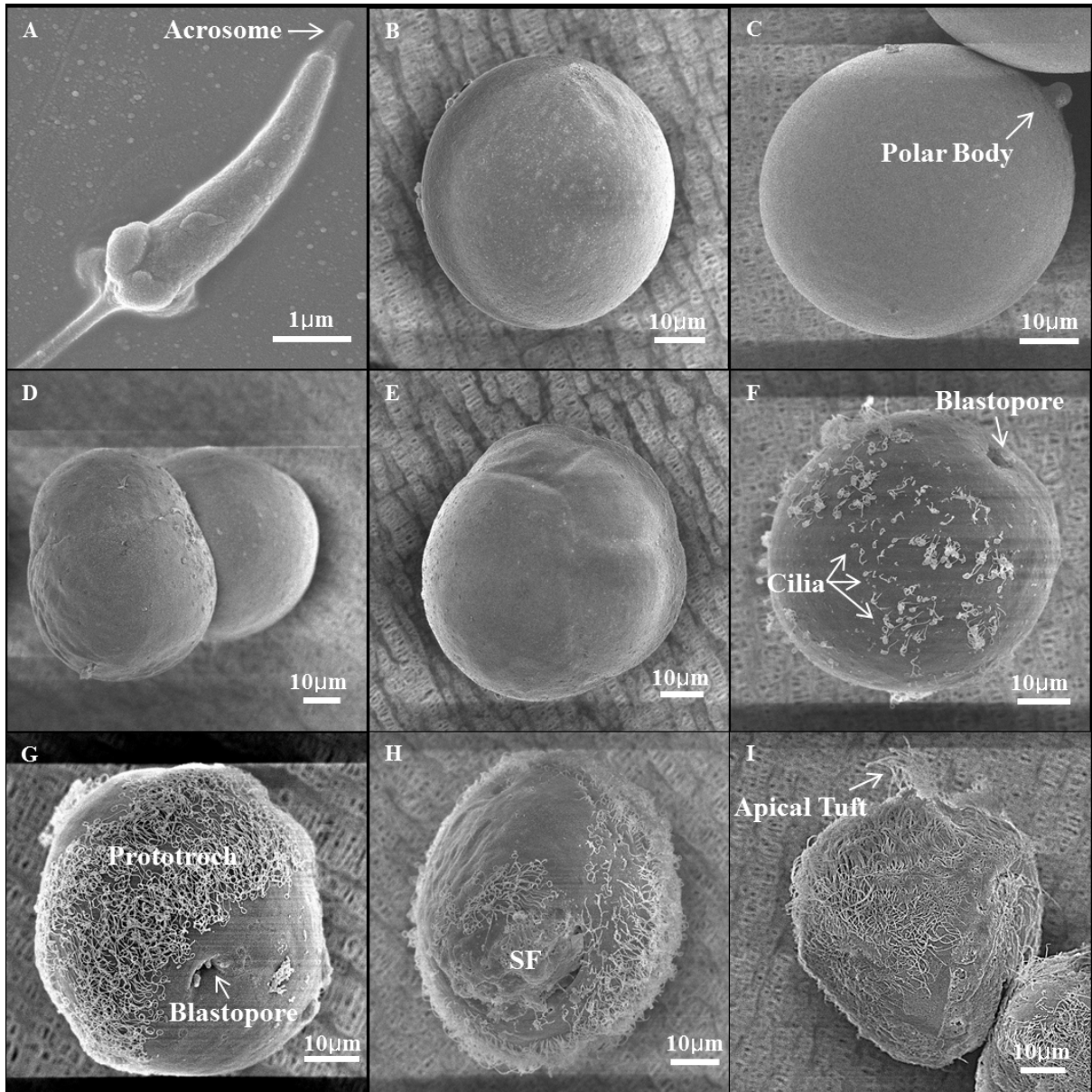


**Fig. 4.** Photomicrographs of *Ruditapes philippinarum* larvae in different development stages. **A**, trochophore (7 h). **B**, D-larvae (19 h). **C**, early D-shaped (2 d), DG, Digestive Gland. **D**, late D-shaped (4 d). **E**, umbonal veliger (10 d). **F**, late umbonal veliger (17 d). **G**, pediveliger (21 d).

(Fig. 5A). 두부는 상단의 뾰족한 첨체 (acrosome) 과 핵 (nuclei) 으로 구성되어있으며, 핵은 두부의 전, 후로 길게 신장되어 한쪽으로 구부러진 형태를 갖고 있었다 (Fig. 5A).

바지락 수정란의 배 발생 (embryogenesis) 은 수정 1시간 후 극체 (polar body) 가 형성되면서 시작되었다 (Figs. 3B, 5C). 첫 세포분열은 수정 후 1시간 50분에 일어났으며, 극체가 없는 크기가 다른 두 개의 난할 (blastomere) 을 갖는 2-세포기 (2-cell) 가 형성되었다 (Figs. 3C, 5D). 두번째 세포

분열은 2-세포난할의 분열이 비대칭적으로 일어나 크기가 비슷한 3개의 세포와 크기가 가장 큰 한 개의 세포로 구성된 4-세포 (4-cell) 가 형성되었다 (Figs. 3D, 5E). 연속적인 세포 분열이 진행되어 수정 후 4시간 50분에 약한 회전 운동성을 보이는 포배기 (blastula stage) 가 관찰되었고 (Fig. 3G), 이후낭배기 (gastrula stage) 에 접어들면서 수정란 표면에 섬모 (cilia) 가 형성되기 시작하고 뚜렷한 원구 (blastophore) 의 함몰이 관찰되었다 (Fig. 5F). 낭배기가 완



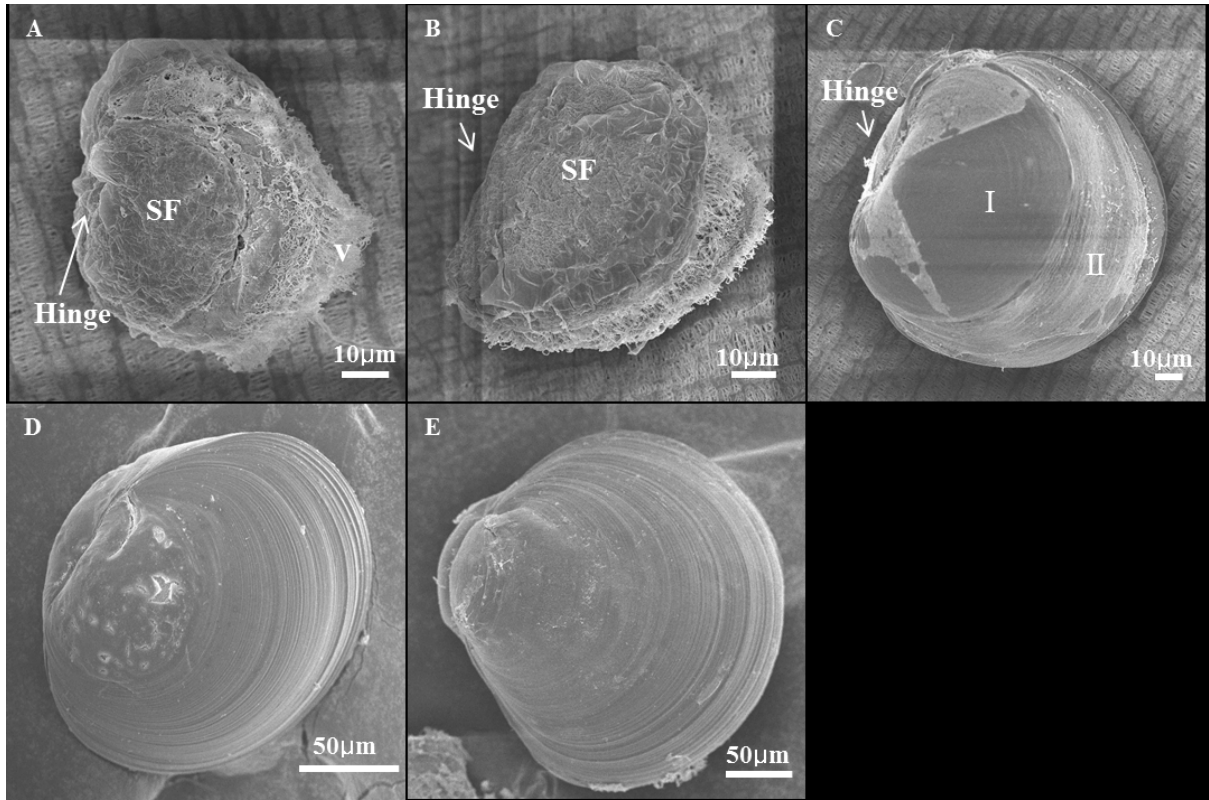
**Fig. 5.** SEM (Scanning Electronic Microscope) ultrastructure of *Ruditapes philippinarum* larvae in different development stages. **A**, ripe sperm. **B**, ripe egg. **C**, fertilized egg. **D**, 2 cell (1 h 50 min). **E**, 4 cell (2 h). **F**, gastrula (5 h 10 min). **G**, early gastrula (5 h 40 min). **H**, late gastrula (7 h), SF, Shell Field. **I**, trochophore.

료됨에 따라 바지락 배아 (embryo) 의 표면에는 뚜렷한 섬모 발달이 이루어졌고 (Figs. 3I, 5G), 섬모를 이용한 해수 내 배아의 자유 유영이 관찰되었다. 또한, 후기 낭배기에 원구의 반대편에 shell field의 분화가 관찰되었다 (Fig. 5H).

수정 후 7시간째, 후기 낭배기에서 자유 유영생활을 하는 담륜자 유생 (trochophore larvae) 으로의 분화가 관찰되었다. 잘 발달된 구전섬모환 (prototroch) 을 갖고 있는 담륜자 유생은 섬모를 이용하여 수류를 일으키며 수조 내에서 활발한 회

전 운동을 함이 관찰되었다 (Figs. 4A, 5I).담륜자 유생기의 후반기에는 패각의 확장이 유생 양 측면에서 관찰되며, 좌각과 우각은 hinge에 의해 접혀 있다 (Fig. 6A).이 시기에 패각 형성은 점점 확장되어 주름진 D-형으로 분화하고, hinge 부분은 직선화 되었다 (Fig. 6B). 완전한 D상 유생 (D-shape larvae) 은 수정 후 19 시간째 관찰되었으며, 이 시기 유생 각장은 약 86 µm였다 (Fig. 4B).

D상 유생 단계에서는 패각과 내부 기관의 성장과 발달이 뚜



**Fig. 6.** SEM (Scanning Electronic Microscope) ultrastructure of *Ruditapes philippinarum* larvae in different development stages. **A**, mid trochophore, SF, Shell Field. **B**, late trochophore, SF, Shell Field. **C**, D-shaped with prodissoconch I and II (2 d). **D**, late D-shaped (4 d). **E**, pediveliger (21 d).

렸이 일어났다. 3일생 D상 유생은 변반 (velum) 을 이용하여 공급된 먹이생물의 섭이 및 유영활동이 관찰되었고 (Fig. 4C), 6일생유생에서는 패각의 성장이 뚜렷하여 prodissoconch I이 D-형을 유지하는 반면, 패각의 가장 자리에서는 조밀하게 밀집된 성장선 (growth line) 을 갖는 prodissoconch II 시기로의 발달이 관찰되었다 (Fig. 6C). 10일생유생에서는 소화기관 (digestive system) 의 발달이 뚜렷이 관찰되었으며, 이 때 먹이생물 섭이에 의한 소화활동이 관찰되었다 (Fig. 4D). 수정 후 14일 된 유생은 각장  $183.41 \pm 6.9 \mu\text{m}$ 였으며, 각정 (umbo) 이 불룩하게 돌출된 형태의 umbonal veliger로 분화하였다 (Fig. 4E). 패각 표면의 성장선은 선명한 상태였다 (Fig. 6D). 저서생활로 들어가기 전의 포복피면자 유생 (pediveliger) 은 수정 후 21일째 foot이 발달되면서, 수조바닥을 기어다니는 행동이 관찰되었으며, 이 때 입수관과 출수관 (siphon) 의 형성이 관찰되었다 (Fig. 4G).

### 5. 유생성장률

바지락 유생 발달 단계에 따른 평균 패각 전장 (shell length) 의 성장률을 D상 유생시기부터 포복피면자 유생단계

까지 측정된 결과는 Fig. 7과 같다. D상 유생이 최초로 관찰된 시점 (수정 후 19시간 경과, 각장  $86 \mu\text{m}$ ) 부터 포복피면자 유생이 관찰된 21일까지의 일간 패각 성장율은 평균  $10.3 \mu\text{m/day}$  이었으며, 수정 후 5일 까지 급속한 패각 성장을 보였으며, 수정 후 10일부터 20일 까지 패각은 선형 (linear) 으로 성장하였다.

## 고 찰

### 1. 김녕항 바지락의 성 성숙 및 산란

Kang *et al.*, (2004) 와 Ngo and Choi (2004) 는 우리나라 제주도의 성산 지역에 서식하는 바지락의 연중 번식주기를 조직학적 방법을 이용하여 관찰, 보고 한 바 있다. 이 들 연구에 의하면, 제주도 성산 지역 바지락의 산란은 6월부터 9월까지 관찰되었으며, 특히 수온이  $23^{\circ}\text{C}$ 이상인 7-8월에 주로 산란한다고 보고하였다. 이 연구에서 바지락이 채집된 김녕 지역은 성산과 위도상으로 매우 유사한 지역이며, 김녕항 내에는 용천수로 인하여 간조 시 염분이 낮아짐이 관찰되었다. 김녕항 내 조간대의 수온은 채집 당시  $21^{\circ}\text{C}$ , 염분 21.1 psu로 기록되었다. 그러나 이 연구에 쓰인 실내 사육수조의 수온과 염분이

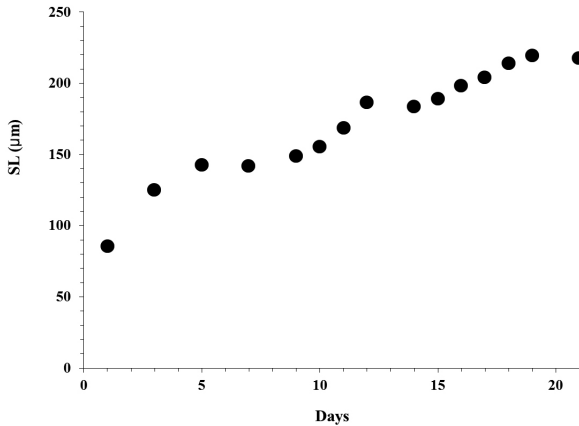


Fig. 7. Larval growth of *Ruditapes philippinarum* during study period, SL, Shell Length.

24°C 및 33.4 psu점을 감안하면, 실내수조로 옮기는 과정에서 채집된 바지락이 수온과 염분의 변화로 인한 산란자극으로 자연산란이 일어난 것으로 추정된다.

조직학적 관찰에 의하면 8월 중순에 채집된 김녕항 바지락은 완숙한 생식소 발달 단계를 보이는 반면 부분 산란이 일어난 개체는 관찰되지 않아, 타 지역에 비하여 김녕항 바지락의 산란시기가 늦음을 알 수 있다. 그러나 제주도의 수온이 우리나라 다른 지역보다 춘계의 경우 상대적으로 높은 점을 감안할 때, 제주도 바지락의 늦은 산란 시기는 수온 영향보다는 먹이에 의한 영향으로 추정된다. 바지락의 먹이량은 해수중의 클로로필 농도로 유추할 수 있는데, 패류양식이 활발하게 진행되고 있는 남해안의 경우 연중 해수 중 클로로필 농도는 가막만 0.1-3.5 µg/L (Kang et al., 2010), 고성만 0.3-5.84 µg/L (NFRDI, 2001) 이며, 서해안의 경우 천수만 1.0-7.0 µg/L 등으로 보고되고 있다. (Kim et al., 2005). 이에 반해 제주도 연안에서 측정된 클로로필의 연중 변화 폭은 0.06-1.81µg/L (Affan, 2006) 로 타 지역에 비해 현저히 낮음을 알 수 있다. 따라서 제주도 연안에서 관찰된 해수 중의 낮은 먹이 생물량은 타 지역보다 높은 수온임에도 불구하고 제주연안 바지락이 늦게 산란하는데 있어 일조 하는 것으로 사료 된다.

## 2. 산란에 따른 비만도지수 변화

비만도는 바지락을 포함한 이매패류의 생리적인 스트레스와 영양상태를 잘 반영하는 지수로 해수 중에 분포하는 주 먹이원인 식물플랑크톤의 계절적 변화 및 산란과 밀접한 관계가 있다 (Kang et al., 2007). 우리나라의 경우 바지락의 비만도 증가는 봄철 식물플랑크톤 대 번식과 밀접한 관계가 있으며, 봄철에 바지락의 비만도가 증가하기 시작하여 생식소가 완전히 성숙한 시기에 가장 높은 비만도와 육중량을 갖는다 (Park and Choi, 2004, Uddin, 2010). 또한 늦은 봄 및 초여름 바

지락의 비만도지수의 감소는 주로 산란에 의한 것으로 알려져 있다. Uddin et al., (2010) 은 우리나라 인천 선재도 바지락의 연중 생식주기에 따른 비만도의 변화를 관찰한 결과, 산란 전 5월에 가장 높은 비만도 ( $0.9 \pm 0.02$ ) 를 보이고, 산란이 시작되는 6월부터 그 지수 감소한다고 보고하였다. Uddin et al., (2010) 의 보고에 의하면, 인천 선재도 바지락의 7월 중 비만도는  $0.7 \pm 0.02$ 로 5월과 비교시 약 30% 정도 감소됨을 알 수 있다. 이에 반해, 김녕 바지락의 산란 전 비만도는  $0.5 \pm 0.11$ 로 선재도 바지락에 비해 선재도 바지락과 비교시, 그 지수가 현저히 낮음을 알 수 있다. 이러듯 제주도 김녕항 바지락의 비만도지수가 다른 지역에 비해 현저히 낮은 것은 주로 먹이생물에 의한 것으로 추정 되나, 이에 대한 보다 심도 있는 연구가 필요 시 된다.

## 3. 번식량측정

Park et al., (2004) 는 바지락 알에 대한 항체를 최초로 개발하여 난 단백질을 정량할 수 있는 효소면역학적 방법 (ELISA) 을 개발 보고하였다. 이 연구에서는 일반적인 산란 유도에 의한 번식량 측정 대신, 바지락 체내에 분포하는 난 단백질을 Park et al., (2004) 이 개발한 항체와 효소면역학적 방법에 의하여 정량하였다. 일반적으로 화학물질 또는 수온변화를 이용한 산란 유발에 의한 바지락 번식량 측정은 바지락의 부분 산란 (partial spawning) 으로 인하여 실제 바지락체내에 있는 번식량 보다 낮게 평가되는 (underestimated) 경향이 있는 반면, 효소면역학적 방법에 의한 번식량 측정은 실제적인 량을 추정하는 장점을 지닌다 (Park and Choi 2004).

바지락의 포란도는 여러 연구자들에 의해 다양한 방법으로 측정 보고된 바 있다 (Table 2). Toba and Miyama (1991) 는 일본 도쿄만에 분포하는 바지락을 대상으로 포란수를 측정 보고한 바 있다. 이들 연구에서는 길이 34.1-36.0 mm의 성숙한 바지락에 암모니아 자극을 이용하여 산란을 유도한 후 방란된 알의 수를 계수한 결과, 도쿄만의 바지락은 방란을 통하여  $3.31 \times 10^5$  eggs의 알을 방출하는 것으로 보고하였다. Yap (1977) 은 하와이 바지락의 크기와 조직 건 중량 사이의 차이에 따른 상관관계를 이용하여 바지락의 포란도를  $4.3 \times 10^5 - 1.35 \times 10^6$  eggs로 산출하였다. 우리나라의 경우 Chung et al., (2001) 은 가장 20.2-46.9 mm의 곱소만 바지락에 온도 자극을 주어 방란을 유도한 후, 방출된 바지락 알을 계수한 결과, 1차 산란시,  $2 \times 10^5 - 1.7 \times 10^6$  eggs, 1차 산란이 끝난 바지락에 2주간 먹이생물 공급을 실시하여 유도된 2차 산란시  $3.2 \times 10^5 - 1.72 \times 10^6$  eggs의 알이 방출 된다고 보고하였다. 한편 Park and Choi (2004) 는 곱소만 바지락을 대상으로 조직학적인 방법에 의한 성 성숙 정도 및 효소면역학적 방법을 이용한 번식량 자료를 근거로 산란 전, 후의 생식소 지

**Table 2.** Larval development of *Ruditapes philippinarum* reported from different studies

	Devauchelle (1990)	Utting and Spencer (1991)	Hur <i>et al.</i> , (2005)	Present study
Temperature (°C)	25	25	22	24
Salinity (psu)	30-34	-	-	33.4
Egg size (µm)	-	-	64.2	55-60
Fertilized egg	-	-	35 min	60 min
2 cell	-	-	1 h 10 min	1 h 50 min
4 cell	-	-	1 h 40 min	2 h
Morula	-	-	1 h 40 min	4 h
Blastula	-	-	3 h	4 h 50 min
Gastrula	-	-	7 h 10 min	5 h 50 min
Trochophore	-	-	10 h	7 h
D-larvae	24 h	24 h	20 h	19 h
Pediveliger	15 d	12 d	13 d	21 d

수 (GSI) 수치를 이용하여 추정된 결과, 바지락의 산란은 5월에서 9월까지 약 3회 정도이며 이 때 방란되는 알의 수는 총 조직 건중량의 6.5-12.8%인  $2.3-2.9 \times 10^6$  eggs로 추정하였으며, 이는 다른 연구에서 추정된 바지락의 포란수와 유사한 결과이다. 이 연구에서 효소면역학적 방법에 의하여 측정된 김녕 바지락의 포란수는 총 조직 건중량의 6.4-21.5%인  $0.9-5.7 \times 10^6$  eggs로, 타 연구에서 보고한 바지락의 포란수 범위와 유사하다.

**4. 배발생 및 유생발달**

Healy (1995) 는 백합목 (Veneroidea) 에 속하는 이매패류 정자의 형태와 미세구조를 분석하여 상과 (superfamily) 에 따라 5개의 그룹으로 분류한 바 있다. 바지락이 속해있는 백합상과 (Veneroidea) 의 이매패류 정자는 Group A에 속해있으며, 그 특징을 다음과 같이 설명하고 있다. 첨체는 짧은 원뿔형으로 내부에는 뚜렷한 하부구조가 발달되어있지 않지만, 전자 밀도 (electron density) 가 높은 basal ring이 두껍게 위치하고 있다. 핵은 막대형의 구부러진 형태로 존재하며, 중심립에는 구형의 4개 또는 5개의 미토콘드리아를 갖고 있다고 설명하고 있다. 이 연구에서 관찰된 김녕 바지락 정자는 원뿔형의 짧은 첨체와 구부러진 막대형의 핵이 관찰된 것으로, 백합목 (Veneroidea) 이매패류 정자의 특징을 잘 반영하고 있다.

Hur *et al.*, (2005) 는 백합과 4종의 이매패류인 바지락 (*Ruditapes philippinarum*), 동죽 (*Macrta veneriformis*), 가무락조개 (*Cyclina sinensis*) 와 대합 (*Meretrix lusoria*) 의 배 발생 과정과 소요시간을 관찰하였다. Hur *et al.*, (2005) 에 따르면, 바지락의 배 발생은 22°C 환경에서 수정 후 낭배기까지 7시간, 담륜자 유생 10시간, D상 유생 까지 20시간이 소요된 반면, 대합은 다소 높은 26°C에서 수정난에서 D상 유생까지 17.5시간이 소요되었고, 착저기 유생인 담륜자 유생까지는 13일이 소요된 것으로 보고 하였다. 이번 연구결

과 24°C 수온에서 배양된 바지락 수정난은 수정 후 6시간째 낭배기 (grstrula) 가 형성되었고, 담륜자 유생 (trochophore) 은 7시간, D상 유생은 19시간째 관찰되었다 (Table 2). 바지락 배 발생 (embryogenesis) 과정은 Hur *et al.*, (2005)의 배 발생 단계와 비슷한 양상을 보였다.

백합과 이매패류의 배 발생은 대부분 24시간 내에 완료되며, 각 발달 단계별 수정란의 발달 소요 시간은 배양 온도에 따라 다양하다. Zhang and Yan (2006) 은 온도에 따른 바지락 수정난에서 D상 유생단계까지의 발달 소요 시간을 측정 한 결과, 저수온 (14.6°C, 48시간) 일수록 배발생 시간이 늦어지고 수온이 증가함에 따라 발달 소요 시간이 짧아짐을 보고하였다. 또한 담륜자 유생 발달까지는 고수온 (26-28°C) 의 경우, 7-8일, 저수온 (17-19°C) 의 경우, 13-14일이 소요된다고 보고 하였다. 이번 연구에서는 24°C 수온 환경에서 수정난 단계부터 D상 유생단계까지 약 20시간이 소요되었는데, 이는 다른 연구들과 비교 시 유사한 결과이다. 그러나 이 연구에서 관찰된 담륜자 유생 시기는 총 20일이 소요되었는데, 이는, Hur *et al.*, (2005) 의 연구에 비해 7일, Zhang and Yan (2006) 의 연구에 비해 10일 정도 늦은 것이다. 이러한 차이는 먹이 활동을 본격적으로 시작하는 유생발달 시기에 성장이 더딘 것에 기인한 것으로 사료된다. 이 연구에 사용된 바지락 사육조의 규모는 다른 연구에 쓰인 상업적인 바지락 유생사육 시설과 비교하여, 그 규모와 그 규모가 매우 작았으며, 그 결과 바지락 유생의 성장이나 먹이 활동에 부정적인 영향을 미친 것으로 사료된다.

**요 약**

이 연구에서는 바지락 (*Ruditapes philippinarum*) 의 번식량 및 유생발생을 관찰하였으며, 이를 위하여 수정란 및 유생을 21일 간 실내사육수조를 이용하여 배양하였다. 바지락은

2011년 8월 제주도 김녕에서 채집 실험 수조로 옮겨졌으며, 다음날 자연적인 방란 방정이 관측되었다. 바지락 수정란은 19시간의 배 발생과정을 거쳐 21일 후 포복피면자유생 (pediveliger) 으로 발달하였다. 조직학적 방법을 이용하여 바지락의 생식소를 관찰한 결과, 방란, 방정 전 모든 개체는 성적으로 완숙한 상태였고, 산란 후 모든 개체에서 부분산란이 관찰되었다. 효소면역학적 방법 (ELISA) 에 의한 번식량 측정 결과, 암컷 바지락의 생식소 지수는 (GSI) 산란 전 28.6%에서 산란 후 17.3%로 11.3% 감소하였으며, 추정된 포란수는 6,998,658 eggs였다. 이 연구서 광학현미경 및 전자현미경을 이용하여 관찰된 바지락 유생 발달 및 번식량은 향후 바지락 인공종묘 산업 및 바지락 자원관리에 있어 중요한 자료로 활용될 것으로 사료된다.

## 사 사

바지락 채집, 조직작성 및 유생사육 등에 많은 노력을 아끼지 않은 제주대 대학원 해양생명과학과의 홍현기, 정희도, 박아름이, Mostafizur Raman Mondol, 양현성 및 학부생 김찬영과 장윤수 에게 깊은 감사를 드립니다. 이 연구는 농림수산식품기술평가원의 수산특정과제 “바지락 인공종묘 대량생산 시스템 개발, 11-1541000-001249-01”의 후원으로 수행되었습니다.

## 참고 문헌

- Affan, M. A. (2006) Ecological and ecophysiological studies and application of microalgae on the west coast of Jeju Island. Ph.D. Dissertation., Dept. Oceanography, Cheju National University. 115 pp.
- Chung, E.Y., Hur, S.B., Lee, J.S. (2001) Gonadal maturation and artificial spawning of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia: Veneridae), in Komso bay, Korea. *Journal of Fisheries Science Technology*, **4**: 208-218.
- Drummond, L., Mulcahy, M., Culloty, S. (2006) The reproductive biology of Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, from the North-West of Ireland. *Aquaculture*, **254**: 326-340.
- Hur, Y.B. (2005) Comparison of development and larval growth of four Venerid clams. *Journal of the World Aquaculture Society*, **36**: 179-187.
- Healy, J.M. (1995) Comparative spermatozoal ultrastructure and its taxonomic and phylogenetic significance in the bivalve order Veneroida. In: Jamieson, B.G.M., Ausio, J., Justine, J.-L., (eds), *Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy. Mémoires Du Muséum National D'Histoire Naturelle*, **166**: 155-166.
- Helm, M.M., Bourne, N. (2004) Hatchery operation: Broodstock conditioning, spawning, and fertilization. *In*: A. Lovatelli, editor. Hatchery culture of bivalve: A practical manual, FAO fisheries technical paper, Italy. 471 pp.
- Goulletquer, P. (1997) A bibliography of the Manila clam *Tapes philippinarum*. IFREMER, RIDRV-97.02/RA/La tremblade, 122p.
- Kang, C.K., Park, M.S., Lee, P.Y., Choi, W.J., Lee, W.C. (2000) Seasonal variation in condition, reproductive activity, and biochemical composition of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) in suspended culture in two coastal bays of Korea. *Journal of Shellfish Research*, **19**: 771-778.
- Kang, C.K., Kang, Y.S., Choy, E.J., Kim, D.S., Shim, B.T., LEE, P.Y. (2007) Condition, reproductive activity, and gross biochemical composition of the Manila clam, *Tapes Philippinarum* in natural and newly created sandy habitats of the southern coast of Korea. *Journal of Shellfish Research*, **26**: 401-412.
- Kang, D.H., Ngo, T.T.T., Koh, K.J., Choi, S.K. (2004) Seasonal changes in gonadal development of Manila clam, *Ruditapes philippinarum* form Shi-Heung-Ri, Jeju, Korea. *Journal of Aquaculture* **4**: 81-88 (In Korean).
- Kang, D.H., Chu, F.E., Yang, H.S., Lee, C.H., Koh, H.B., Choi, K.S. (2010) Growth, reproductive condition, and digestive tubule atrophy of Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Gamakman Bay off the southern coast of Korea. *Journal of Shellfish Research*, **29**: 839-845.
- Kim, D.S., Lim, D.I., Jeon, S.K., Jung, H.S. (2005) Chemical characteristics and eutrophication in Cheonsu Bay, west coast of Korea. *Ocean Polar Research*, **27**: 45-58.
- KOSIS. (2003) Statistic Database for Reclamation Extent.(<http://kosis.kr/wnsearch/totalSearch.jsp>)
- Limpanont, Y., Yang, H.S., Park, K.I., Choi, K.S. (2011) First report on the annual gametogenesis of Heteromacomairus (Hanley, 1845) in a rocky intertidal area, northern Jeju Island, Korea. *Journal of Shellfish Research*, **30**: 39-46.
- Min, D.K. (2004) Mollusks in Korea. Busan, Korea: Hangul Graphics. 465 pp.
- Ngo, T.T.T and Choi, K.S. (2004) Seasonal changes of Perkinsus and Cercaria infections in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* from Jeju, Korea. *Aquaculture* **239**: 57-68.
- NFRDI. 2001. Development of optimal technology for sustaining production in shellfish farm. National Fisheries and Development Institute of Korea technical report, 116 pp.
- Meneghetti, F., Moschino, V., Da Ros, L. 2004. Gametogenic cycle and variations in oocyte size of *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Aquaculture*, **240**: 473-488.
- Park, K.I. and Choi, S.K. (2004) Application of enzyme-linked immunosorbent assay for studying of reproduction in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia) I. Quantifying

- eggs. *Aquaculture*, **241**: 667-687.
- Ponurovsky, S.K and Yakovlev Y.M. (1992) The reproductive biology of the Japanese littleneck, *Tapes philippinarum* (A. Adams and Reeve, 1850) (Bivalvia: Veneridae). *Journal of Shellfish Research*, **11**: 265-277.
- Toba, M., Miyama, Y., (1991) Gonadal development and spawning induction in artificially conditioned Manila clams *Ruditapes philippinarum*. *Nippon Suisan Gakkaku*, **57**: 1269-1275 (In Japanese with English abstract).
- Uddin, M.J., Yang, H.S., Choi, S.K. (2010) Seasonal changes on Perkinsus olseni infection and gametogenesis in Manila clam *Ruditapes philippinarum*, from Seonjaedo island on Incheon, off the west coast of Korea. *Journal of World Aquaculture*, **41**: 93-101.
- Yap, G.W. (1977) Population biology of the Japanese little-neck clam, *Tapes philippinarum*, in Kaneohe bay, Oahu, Hawaiian Islands. *Pacific Science*, **31**: 223-244.
- Zhang, G and Yan, X. (2006) A new three-phase culture method for Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, farming in northern China. *Aquaculture*, **258**: 452-461.