

〈論 文〉

生殖巢 凍結에 의한 누에 遺傳資源의 長期保存

金三銀·成洙一*·李相夢

農村振興廳 蠶業試驗場, *水原大學校 理科學

Long-term Preservation of *Bombyx mori* Stocks by Frozen Gonad Storage

Sam Eun Kim, Su Il Seong* and Sang Mong Lee

Sericultural Experiment Station, RDA, Suwon, Korea

*College of Natural Science, The University of Suwon, Suwon, Korea

Abstract

For a long-term preservation of silkworm stocks by frozen gonad storage, fundamental topics such as freezing rate and transplanting stage of the gonad, proper cryoprotectant, and super-cooling temperature and freezing point of the freezing medium were examined and following results were obtained. Proper method to anesthetize the ovary-recipient silkworm was to dip the animal to cold water for 10 minutes, and the ovary taken from the 4th instar larvae was more suitable for freezing-preservation than that from the 5th. Concerning the cryoprotectant, glycerol and DMSO were effective to prevent cryoinjury of the ovary, but sorbitol was not. The supercooling temperature and freezing point of the medium to freeze the ovary and testes were checked, and consulting with the results desirable cooling rate was confirmed. On the desirable conditions of transplanting methods, freezing rate and cryoprotectant concentration etc., the next generation was obtained when the females implanted frozen-thawed ovaries mated with normal males, but none of the normal females mated with the males implanted frozen-thawed testes laid fertilized eggs. Now it is needed to improve the connecting ratio of the ducts associated with the transplanted testis to those of the hosts.

Keywords : Silkworm, genetic stock, gonad freezing, transplantation

緒 論

국내 최대의 종합적 絹絲昆蟲類 유전자원 보존기관인 蠶業試驗場은 400여 品種을 보존하고 있으며, 突然變異 個體의 출현이나 새로운 品種의 도입으로 인해 유지보존해야할 品種數는 매년 증가하고 있다. 이들 유전자원을 휴면과 냉장을 이용하는 현재의 기술로 보존할 수 있는 기간은 10개월 정도에 지나지 않아 매년 繼代飼育하고 있는데 이에 많은 人的,

본 논문의 일부는 1989년도 한국학술진흥재단의 자유공보과제 학술연구구성비에 의하여 연구되었음.

物的자원이 소요될뿐 아니라 遺傳形質의 안전보존이라는 측면에서도 불의의 사고에 의한 滅種 또는 系統固有形質의 변화 위험성이 항상 內在하고 있다. 즉, 누에병이나 인위적 실수에 의한 滅種위험 외에도, 수없이 되풀이 되는 繼代사육 중의 환경변화에 따라 特定 유전형질이 淘汰되기도 하고 採種數가 적을 때는 集團內的 特異 遺傳子 組成만이 보존되는 결과가 초래되기도 한다(Kartha, 1984).

生物에 따라서는 繼代 中에 일어나는 유전형질의 變異를 방지하기 위하여 保存對象을 半永久的으로 보존하는 방법이 개발 중에 있거나 이미 이용되고 있는데 植物에서는 건조처리가, 動物에서는 低溫처리

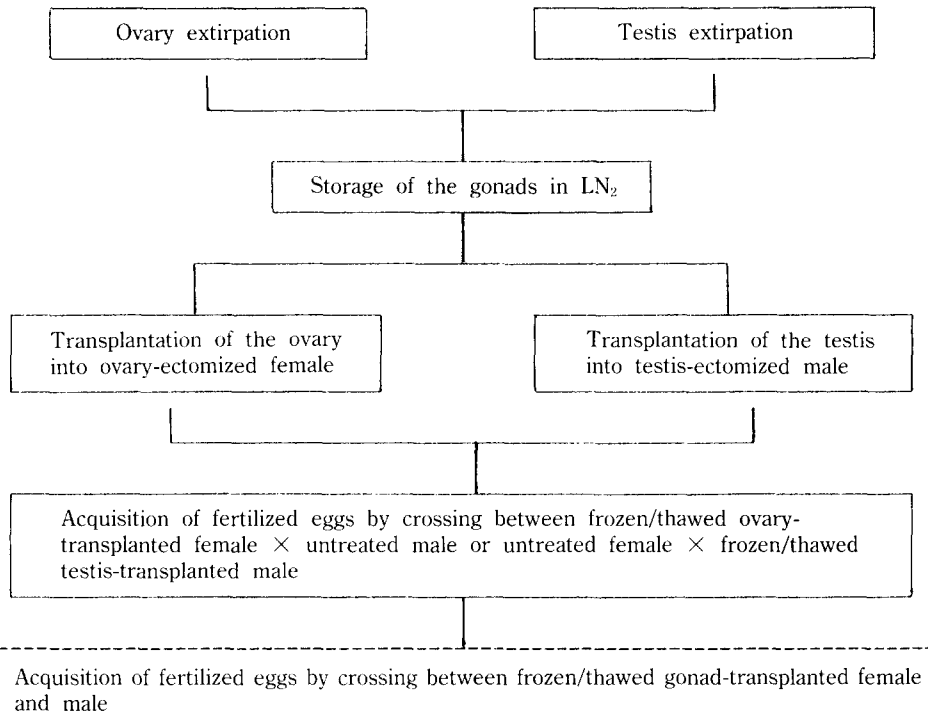


Fig. 1. Diagrammatic outline for the long-term preservation of *Bombyx mori* stocks by frozen gonad storage.

가 그 主流를 이루고 있다. 동물자원의 경우 精子, 임파구, 배양세포 수준에서는 이미 이용단계에 있고 (Leibo, 1981; Harbo, 1977, 1983), 최근에는 胚子나 生殖巢 등 組織 수준에서도 長期보존에 관한 연구가 많은 진전을 보이고 있다 (Leibo, 1984; Kusuda *et al.*, 1985).

家蠶의 경우, 幼蟲에서 摘出した 卵巢나 精巢는 凍結融解後 다른 個體에 移植하면 正常的으로 發育하여 이로부터 次世代 子孫이 얻어지나 (Shinbo, 1989; 新保 등, 1991), 次世代 回收率이 극히 낮을뿐 아니라 不安定하다는 문제점을 안고 있다. 이에 生殖巢 移植의 時期 및 방법, 最適 凍結速度, 凍害防止劑의 選定 등에 관하여 종합적으로 검토하므로써 生殖巢 凍結에 의한 누에 유전자원의 보존법 개발에 관한 기초를 마련하고자 이 연구를 수행하였다.

材料 및 方法

1. 概要

長期保存할 누에 系統의 幼蟲에서 摘出した 生殖巢를 액체질소로 일정기간 동결보존한 후 融解시켜, 미리

生殖巢를 摘出하여 둔 다른 누에에 移植하여 成蟲이 될 때까지 사육하므로써 凍結 生殖巢 由來의 卵 및 精子를 형성시킨다. 최종적으로는 凍結 生殖巢를 移植한 암수間 交配로 遺傳形質을 보존할 목적이나, 凍結 生殖巢 由來의 次世代 回收率이 낮은 現 기술 수준을 참작하여 여기서는 凍結 卵巢移植 암나방×未處理 수나방, 또는 未處理 암나방×凍結精巢移植 수나방間의 交配로 生殖巢 凍結 移植의 最適條件을 검색하였다(그림 1).

2. 生殖巢 凍結 및 移植

별도로 기술하지 않는 한, 生殖巢 供與體와 受精能力 檢定用으로 蠶 108, 生殖巢 受容體로 蠶 107×蠶 108을 供試하였다. 4령 또는 5령 幼蟲의 2H째에 生殖巢를 摘出하였고, 生殖巢 摘出과 移植 前의 마취는 常溫의 冷水에 10~20分間 浸漬處理로 行하였다. 生殖巢 摘出은 해부현미경 아래에서 幼蟲의 第8環節 등쪽에 있는 斑紋의 중심부를 세로로 2~3 mm 절개하고 절개부위 좌우를 손으로 가볍게 누르며 핀셋으로 생식소를 절개부 밖으로 들어낸 후 해부가위로 잘라 Grace 곤충배양액(Gibco Co.) 중에 모았다. 凍結 前

Table 1. Three kinds of program used in freezing silkworm's gonads by micro-computer programmable freezing controller.

Temperature range (°C)	Cooling rate (°C/min)			Temperature reading position
	I	II	III	
room temp. → + 4	2	2	2	freezing chamber
+ 4 → - 4	3	2	1	sample
- 4 → -40	25	25	25	freezing chamber
-40 → -15	15	15	15	freezing chamber
-15 → -35	1.0	0.5	0.5	freezing chamber
-35 → -90	10	10	10	freezing chamber

The sample tubes were plunged into liquid nitrogen after cooling to -90°C.

Table 2. Recovering time and viability after anesthetization in a silkworm.

Anesthetics and treating time	ethyl ether (min)				cold water (min)				low temperature (hr)				CO ₂ gas (min)			
	1	2	5	10	10	30	60	150	1	3	6	12	2	4	10	20
Recovering time (min)	1	4	13	53	5	12	31	72	3	8	14	30	0.6	1.1	1.2	1.4
No. pupated	7	5	3	1	7	2	1	0	6	6	2	4	9	6	8	9
No. emerged	7	5	2	1	7	1	0	0	5	6	2	3	8	5	8	8

For each treatment 10 larvae of Jam 107 on the first day of fifth instar were used.

処理로서 凍害防止劑인 그리세롤을 3, 6, 9, 12%씩 포함하는 Grace 곤충배양액에 生殖巢를 10分間씩 순차로 통과시켜 組織內 水分을 凍害防止劑로 치환하였다. 凍結 前處理가 끝난 生殖巢는 20개를 1.0 ml의 凍結媒液(12%의 凍害防止劑를 포함하는 Grace 곤충배양액)과 함께 1.8 ml Nunc cryotube에 넣어 Micro-computer programmable freezing controller(1010A type, CryoMed Co.)로 자동온도조절되는 Freezing chamber(990 C type) 내에서 표 1의 프로그램에 따라 凍結하였다.

凍結 3개월 후에 36°C의 溫湯에서 生殖巢를 急速融解한 후 凍害防止劑의 농도가 12%에서 3%씩 낮아지는 Grace 곤충배양액에 10분간씩 경과시켜 組織內 凍害防止劑를 제거하였다. 凍結, 融解 處理가 끝난 生殖巢는 미리 生殖巢를 제거하여둔 누에에 1쌍씩 移植하고, 蛹化와 羽化를 기다려 암나방의 完成期 形成과 受精卵 産卵狀態 및 수나방의 嗜好能力을 조사하였다.

結果 및 考察

1. 生殖巢 被移植누에의 마취

凍結生殖巢의 移植에 있어 移植生殖巢와 宿主生殖巢 間의 발육 경합을 피하는 한편 移植生殖巢의 發育상태 점검을 용이하게 하기 위하여 凍結生殖巢를

이식하기에 앞서 宿主生殖巢를 제거하였는데 이때 生殖巢를 제거하기 위하여 피부를 절개하면 근육수축으로 인해 다량의 혈액이 유출되고 배로는 中腸이 피부 밖으로 돌출되기도 하여 수술작업이 어려워진다. 이에 에칠에테르, 냉수, 低溫(0~2°C), 탄산가스 등으로 被移植體를 마취하여 수술작업동안 깨어나지 않고 수술후 후유증이 적은 방법을 비교 검토하였다(표 2).

5령 1일째의 잠 107을 처리구당 10마리씩 공시하여 化蛾率을 조사한 결과, 탄산가스 접촉 처리가 50~80%의 化아율을 보여 有害度가 가장 낮았으며 冷水浸漬 10分區와 에틸가스 처리 1분구가 70%의 化蛾率을 보여 비교적으로 양호했다. 한편 70% 이상의 化蛾率을 보이는 처리구중 마취 후 覺醒에 소요되는 시간은 에틸 1分 처리구가 1分, 탄산가스 2~20分 처리구가 1.4分 이하로 마리당 수술 소요시간인 2~3분에 미달했으며 冷水 浸漬 10分 처리구는 5分으로 수술 소요시간을 충족시켰다. 化蛾率과 覺醒 소요시간으로 보아 生殖巢 摘出, 移植 작업에 적합한 마취방법은 冷水浸漬 10分 처리인 것으로 판단되어 이후 모든 移植수술은 이 방법으로 행하였다.

2. 凍害防止劑의 종류와 凍結保存期間이 移植後 卵巢發育에 미치는 영향

細胞의 凍害機構가 不分明한 현재, 凍害防止劑의 作用機構에 관한 설명이 쉽지는 않으나 凍結·脱水에

Table 3. Development of ovaries preserved in liquid nitrogen for 3 or 12 months after freezing in Grace's insect medium containing sorbitol, DMSO or glycerol as a cryoprotectant.

Cryoprotectant	Freezed period (month)	No. of larvae tested	No. of moths emerged	No. of ovaries implanted	No. and ratio of ovaries developed (%)	No. of eggs developed from an ovary
sorbitol	3	47	9	18	0(0%)	—
DMSO	3	32	8	16	9(56%)	92
glycerol	3	52	5	10	5(50%)	82
glycerol	12	111	14	28	18(64%)	105

The concentration of each cryoprotectant in Grace's insect medium is 12%. Ovaries were cooled at a rate of 1°C/min from room temperature to -7°C and after seeding with cold forceps at -7°C re-cooling was followed at a rate of 0.3°C/min to -36°C. At -36°C ovaries were plunged into liquid nitrogen and preserved for 3 or 12 months.

의한 細胞膜의 구조 및 기능 손상이 凍害의 主要因이며, 凍害防止劑의 作用部位 또한 細胞膜일 것이라는 점에서는 견해가 일치하고 있다. 따라서 細胞膜 透過型 凍害防止劑인 그리세롤, DMSO, 에칠렌그리콜 등 低分子 물질과, 포리에칠렌그리콜, 수크로스, 그루코스, 솔비톨 등 分子량이 커 細胞膜을 투과할 수 없는 細胞膜 非透過型 凍害防止劑의 凍害防止 機作은 서로 다를 것이며, 細胞의 종류가 다르면 이에 적합한 凍害防止劑도 서로 다른 것이므로, 이 연구의 대상인 누에 卵巢에 적합한 凍害防止劑를 선정하기 위하여 3종류의 凍害防止劑를 첨가한 凍結媒液을 사용하여 卵巢의 발육상태를 비교하였다.

細胞膜 透過型 凍害防止劑로는 흔히 사용되고 있는 그리세롤과 DMSO를 공시하고, 細胞膜 非透過型 凍害防止劑로는 누에알의 休眠중 그리세롤 다음으로 많이 축적되어 卵巢組織에 대한 毒性이 적을 것으로 생각되는 솔비톨을 사용하여 凍結한 卵巢의 移植後의 生存率과 발육상태를 조사하였다(표 3).

5령 2일된 蠶 108의 凍結卵巢를 액체질소 중에 3개월간 보존 후 난소를 제거한 다른 幼蟲에 移植하여 그 生存率을 구한 결과, 그리세롤과 DMSO를 凍害防止劑로 사용한 凍結媒液에서는 각각 50%와 56%의 卵巢가 발육하였으나 솔비톨을 凍害防止劑로 사용한 凍結媒液의 경우는 18개의 移植卵巢中 발육한 것이 전혀 없었다. 이 결과에서 細胞膜 非透過型인 솔비톨은 누에 卵巢의 凍害防止劑로 부적합하고, 細胞膜 透過型인 그리세롤과 DMSO는 적합한 것으로 밝혀졌다.

한편, 凍結保存期間을 1年으로 연장한 그리세롤 區의 卵巢 生存率은 64%였고 發育卵巢의 平均 完成 卵數는 105粒으로 액체질소에 9개월간 연장 보존되는 동안 아무런 피해를 입지 않았다. 아직은 凍結保存에

관한 연구역사가 짧아 액체질소로 細胞나 組織을 보존할 수 있는 최대기간이 분명하지는 않으나 20년간 동결보존하는 동안 소 精子의 生存性이나 受胎能力이 조금도 低下하지 않는다는 白山 등(1986)의 보고로 보아 적어도 수십년 정도의 동결보존은 무난할 것으로 기대된다.

3. 生殖巢 凍結媒液의 過冷却溫度와 氷點

生殖巢 凍結媒液에 그리세롤이나 DMSO와 같은 凍害防止劑를 첨가한 후 이를 冷却하면 氷點 이하의 온도로 過冷却되는데 過冷却상태에서 結氷할 때 過冷却 정도가 클수록 細胞內 凍結로 인한 凍死 위험성이 높아진다고 알려져 있다(酒井, 1987). 이에 生殖巢凍結用 媒液을 氷點 부근에서 인위적으로 結氷하기 위하여 Micro-computer programmable freezing controller로 9~15%의 그리세롤을 포함하는 Grace 곤충배양액을 常溫에서부터 1°C/min의 속도로 冷却시켜 過冷却點과 氷點을 측정하였다. 이때의 氷點은 표 4와 같이 그리세롤 농도가 9%에서 15%로 높아짐에 따라 -3°C에서 -5°C로 낮아졌고 과냉각점 또한 -10°C에서 -13°C로 낮아졌다. 이때 過冷却點과 氷點의 차이에 해당하는 潛熱 發生量은 어느 경우나 7~8°C로서 세포생존한계인 7°C를 넘고 있다(酒井, 1987). 이에 여기서 확인된 氷點 부근 온도 -4°C에서부터 -40°C까지 표 1의 프로그램에 따라 25°C/min의 속도로 急冷하여 自動結氷을 꾀한 결과, 過冷却點이 -5.5°C ~ -8.5°C로 높아져 潛熱發生量은 위험한계인 7°C보다 낮은 2.0~4.5°C에 머물렀다(표 5). 즉, 凍結生理學的 측면에서 볼때 표 5의 동결조건은 卵巢나 精巢의 生存에 불리한 영향을 주지 않을 것으로 생각된다.

Table 4. Supercooled temperature and freezing point of Grace's insect medium containing 9-15% glycerol as a cryoprotectant at a constant rate of freezing.

Concentration of glycerol (%)	9	12	15
Supercooled temperature (°C)	-10.0	-11.5	-13.5
Freezing point (°C)	-3.0	-4.0	-5.0

Grace's insect mediums containing 9, 12, or 15% glycerol were cooled at a rate of 1°C/min from room temperature to -20°C.

Table 5. Supercooled temperature and freezing point of the testes-containing medium frozen by the program shown at Table 1.

Concentration of glycerol (%)	9		12		15
Freezing program	II	I	II	III	II
Supercooling temperature (°C)	-5.5	-6.5	-7.0	-8.5	-7.0
Freezing point (°C)	-3.5	-4.5	-4.5	-4.0	-4.5

Table 6. Relation between cooling condition and development of transplanted ovaries after freezing.

Concentration of glycerol(%)	9	12	12	12	15
Freezing program	II	I	II	III	II
No. of larvae tested	12	12	28	10	11
No. of moths emerged	4	4	10	1	4
No. of ovaries developed(%)	6(75)	8(100)	15(75)	2(100)	6(75)
No. of eggs developed from an ovary	204	149	156	201	165
No. of ovaries connected to host(%)	2(25)	3(38)	6(30)	2(100)	2(25)
No. of eggs oviposited per moth	17	105	95	281	108
Fertility(%)	94	87	74	69	56

A pair of ovaries were implanted to each larvae tested.

4. 凍結速度와 移植卵巢의 발육

凍結速度는 細胞内 水分의 脫水, 細胞外 凍結 및 細胞膜의 水分透過性 등, 被凍結體의 生存에 깊이 관계되는 主要因이므로(Persidsky, 1971; Meryman, 1974; Withers, 1980; Fujikawa, 1981; Mazur, 1984), 蠶 108의 卵巢를 동결한 후 蠶 107×蠶 108에 이식하여 동결속도 및 동해방지제 농도의 변화에 따른 난소의 발육상태를 비교·검토하였다(표 6).

1쌍씩의 난소를 이식받은 幼蟲의 32%가 化蛾하였고, 실험구에 따라 化蛾한 나방 體内に 이식된 난소의 75~100%가 발육하였으며 發育卵巢當 完成卵數는 149~204粒이었으나, 완전임의배치법에 의한 통계처리 결과 모든 실험구 간에 有意差(5% 수준)는 인정되지 않았다. 아무튼 발육난소비율이 75% 이상이고 발육난소당 完成卵數가 149粒 이상이므로 본 실험에서 설정한 동결속도와 동해방지제 농도는 어느 것이나 난소이식에 적합한 조건이라 할 수 있으며 이는 어느 동결구의 潛熱發生量도 위험한계를 넘지 않고 있음을 보여준 표 5의 결과와도 모순되지 않는 결과라 하겠다.

한편 產卵後 나방을 해부하여 조사한 移植卵巢와 被移植體의 紐體 절단부간 유착정도는 실험구에 따라 25~100%(평균 33%)이었고 정상 수나방(蠶 108)과

교배시킨 卵巢 被移植體(蠶 107×蠶 108)의 平均 產卵數는 17~281粒이었으며 受精卵 比率은 56~94%이었다. 이 受精卵을 越年保護후 春期飼育하여 관찰한 幼蟲의 斑紋은 모두 민무늬로서 被移植體에서 얻은 次世代가 凍結生殖巢에서 由來한 것이임이 확인되었다.

5. 移植時期 및 凍結이 移植卵巢의 發育에 미치는 영향

4령 또는 5령期の 蠶 108에서 摘出한 卵巢를 凍結區와 無處理區로 나누어 같은 發育時期의 蠶 107×蠶 108에 移植하여 移植時期 및 凍結過程이 移植後의 卵巢發育에 미치는 영향을 검토하였다(표 7). 卵巢를 移植받은 幼蟲의 羽化比率은 4령과 5령의 수술시기 실험구간에 차이가 없었으나, 移植卵巢 중에서 完成卵을 형성하기 까지 발육한 發育卵巢比率과 발육한 卵巢에서 형성된 平均 完成卵數 및 化蛾나방의 平均 產卵數 등은 어느 것이나 4령 수술區가 5령 수술구 보다 양호하였다. 즉, 동결처리 여부에 관계없이 4령 수술구의 發育卵巢比率 및 完成卵 形成比率이 5령 수술구에 비해 1.3~1.4倍 높았는데, 이는 卵形成 過程에서 볼때 分化 정도가 낮은 4령기 卵巢가 주위환경의 변화에 대한 적응력이 높기 때문이라고 생각되며, 특히 凍結區의 경우에는 크기가 작은 4령

Table 7. Influence of transplanting stage and freezing process on viability of the transplanted ovaries.

Surgery stage (instar)	Freezing	No. of larvae tested	No. of moths emerged(%)	No. of ovaries developed(%)	No. of eggs developed from an ovary	No. of eggs oviposited per moth
4th	frozen	11	7(64)	9(64)	104	83
	unfrozen	16	10(63)	18(90)	251	208
5th	frozen	16	10(63)	9(45)	83	30
	unfrozen	12	8(58)	10(71)	197	89

The ovaries prepared from Jam 108 were transplanted into castrated Jam 107×Jam 108. Cooling rate is same with II on Table 1 and 12% glycerol solution was used as a cryoprotectant.

Table 8. Relation between cooling condition and development of transplanted testes after cooling.

Concentration of glycerol(%)		9	12	12	12	15
Freezing program	control	II	I	II	III	II
No. of larvae tested	11	19	18	19	20	20
No. of moths emerged(%)	5	8	8	9	8	11
No. of female* oviposited	5	8	8	8	6	11
No. of female oviposited fertilized eggs	0	0	0	0	0	0
No. of eggs oviposited per moth	362	326	380	391	307	317
Ratio of testes developed(%)	50	31	19	17	19	50
Ratio of testes connected to host(%)	0	0	0	0	0	0

A pair of testes were implanted to each larvae tested.

*Normal females mated with the males implanted frozen-thawed testes.

卵巢에서 凍結·脫水가 용이하였을 것이라는 점도 지적할 수 있겠다.

한편, 凍結處理區와 無處理區 間의 發育卵巢比率과 完成卵 形成數를 비교하면 發育卵巢比率은 凍結區가 無處理區에 비해 71%(4령)와 63%(5령)에 불과했으며 發育卵巢의 평균 완성률 형성수는 41%(4령)~42%(5령)에 지나지 않아, 凍結處理로 30~40%의 卵巢가 凍死하고 生存한 卵巢일지라도 50% 이상의 부분적인 損傷을 입고 있는 것으로 나타났다.

6. 凍結精巢를 이식한 수나방의 可妊能力

아직 改善의 여지는 있다고 하겠으나 凍結卵巢로부터 次世代를 얻을 수 있다는 것이 밝혀졌기에 이제는 凍結·融解한 精巢를 이식한 수누에의 可妊能力을 확인하고자 5령 1~2일째의 蠶 108의 精巢를 표 1의 프로그램에 따라 凍結하여 3개월간 액체질소 중에 보존 후 蠶 107×蠶 108에 이식하여 이 수나방과 교미한 정상 암나방의 産卵數 및 受精 여부를 확인한 후, 이 나방을 해부하여 精巢의 발육상태 및 精巢組織의 절단면에서의 유착상태 등을 조사하였다(표 8).

평균 産卵數는 실험구에 따라 317~362粒이었으나, 凍結速度 및 凍結防止劑 濃度를 달리한 어떠한 실험

구에서도 受精卵을 산란한 나방은 없었다. 이식한 精巢 중에서 成蟲의 精巢 形態까지 발육한 精巢는 非凍結 精巢가 50%, 凍結 精巢는 실험구에 따라 17~50%였으나 이식 精巢의 細體가 宿主의 細體와 결합한 예는 찾아볼 수 없었다. 卵巢의 경우, 이식 卵巢와 宿主의 細體 절단부 간에 결합한 예가 30% 정도(표 6)이었던데 비해 精巢를 이식한 수나방의 可妊能力이 없는 것은 그 이유는 불분명하나 細體 절단면이 서로 결합하지 못하는 것이 하나의 원인이라 생각된다. 그러나 Shinbo(1989)는 4령기에 凍結精巢를 이식한 수나방에서 0.9%, 3령기 이식 수나방에서 1.4%와 9.1%의 可妊個體를 얻은 바 있으며, 精子形成이 卵形式보다 더 이른 幼蟲 發育時期에 이루어지는 점(Tazima, 1964)을 고려하여 精巢의 凍結時期를 앞당겨 보기도 하고 蠶 108, 蠶 107×蠶 108, 大造 등 3種의 누에 품종, 총 68頭의 4령 수나방에 凍結 또는 無處理 精巢를 이식하였으나 可妊個體는 全無하였다(결과 생략). 이 경우에도 발육정소비율은 33~75%였으나 유착한 정소는 찾아볼 수 없었다. 田村·坂手(1985) 역시 액체질소 또는 드라이 아이스로 凍結한 精子의 融解後 운동성은 인정하였으나 受精卵은 얻지 못하였다.

이제까지의 결과로 보아 누에 遺傳資源을 長期保存할 목적으로 卵巢와 精巢를 凍結·保存하여 두고 어느 特定系統의 누에가 필요할 때 이들 生殖巢를 融解·移植한 宿主間 交配로 次世代를 얻을 수 있는 가능성은 희박하다고 하겠다. 현재 凍結卵巢 由來의 完成卵에 대한 單位發生處理(Astaurov, 1967; 佐藤, 1934)로 암수個體를 동시에 얻는 방법을 검토중에 있으며, 금후 凍結精巢의 生存率 向上과 細胞 절단면의 유착에 관한 연구가 더 심도있게 다루어져야 하리라 본다.

摘 要

生殖巢凍結로 누에 遺傳資源을 長期保存하기 위하여 生殖巢의 移植方法, 最適 凍結速度 및 凍害防止劑, 凍結媒液의 過冷却點과 氷點, 生殖巢 凍結時期 등, 生殖巢의 凍結保存에 필요한 기초자료를 검토하여 다음의 결과를 얻었다.

1. 生殖巢 被移植누에의 마취에 적합한 방법은 에틸에테르, 冷水浸漬, 低溫 접촉, 탄산가스 접촉중 冷水에 10分間 浸漬處理하는 것이었다.

2. 누에卵巢를 凍結함에 있어 그리세올과 DMSO는 우수한 凍害防止 효과를 보였으나 솔비톨은 不適合하였다.

3. 9~15%의 그리세올을 첨가한 凍結媒液의 過冷却點과 氷點을 조사하여 潛熱發生量을 2.0~4.5°C로 억제할 수 있는 凍結速度를 확인하였다.

4. 5령보다 4령누에에 卵巢를 이식하는 것이 卵巢 生存 및 完成卵形成 면에서 1.3~1.4배 유리하였다.

5. 凍結卵巢를 移植받은 암나방을 수나방과 교미시켜 受精卵을 얻었으며, 遺傳形質檢定으로 이 受精卵에서 發生한 次世代 누에가 凍結卵巢에서 由來한 것임을 확인하였다.

6. 4령 또는 5령기에 凍結精巢를 移植한 수나방과 교미한 정상 암나방중 受精卵을 산란한 것은 없었다.

引 用 文 獻

- Astaurov, B. L. (1967) Artificial parthenogenesis and experimental polyploidy in silkworm. *J. Sericult. Sci. Japan.* **36** : 277-285.
- Fujikawa, S. (1981) The effect of different cooling rate on the membrane of human erythrocytes. In "Effect of low temperatures on biological membranes" (Morris, G. T. and A. Clarke, eds.), Academic Press, London, pp. 323-334.
- Harbo, J. R. (1977) Survival of honey-bee spermatozoa in liquid nitrogen. *Ann. Ent. Soc. Am.* **70** : 257-258.
- Harbo, J. R. (1983) Survival of honey-bee (Hymenoptera; Apidal) spermatozoa after two years in liquid nitrogen. *Ann. Ent. Soc. Am.* **76** : 890-891.
- Kartha, K. K. (1984) Freeze preservation of meristems. *Cell culture and somatic cell. Genetics of plants.* **1** : 621-628.
- Kusda, J., T. Noguchi, K. Onimaru and O. Yamashita (1985) Maturation and hatching of eggs from silkworm ovaries preserved in liquid nitrogen. *J. Insect Physiol.* **31** : 936-967.
- Leibo, S. P. (1981) Introduction to embryo freezing. In "Frozen storage of laboratory animals" (Zeilmaker G. H., eds.), Gustav Fischer, Stuttgart, pp. 1-19.
- Leibo, S. P. (1984) Transfer of frozen-thawed torine embryo. *Cryobiology.* **21** : 767-790.
- Mazur, P. (1984) Freezing of living cells: mechanism and implications. *Am. J. Physiol.* **247** : C125-C142.
- Meryman, H. T. (1974) Freezing injury and its prevention in living cells. *Ann. Rev. Biophys.* **3** : 341-363.
- Persidski, M. D. (1971) Lysosomes as primary targets of cryoinjury. *Cryobiology* **8** : 482-488.
- 酒井 昭 (1987) 凍結保存—動物·植物·微生物—. 朝倉書店 pp. 110-113.
- 佐藤 春太郎 (1934) 家蠶人為的單性生殖における細胞學並でに遺傳學的研究 (II). *昆蟲* **6** : 225-253.
- Shinbo, H. (1989) Survival of larval ovaries and testes in liquid nitrogen in the silkworm, *Bombyx mori*. *Cryobiology.* **26** : 389-396.
- 新保 博·北澤敏男·今西重雄·木口憲爾·村上昭雄 (1991) カイユ遺傳資源の長期保存法—卵巢凍結, 融解條件及び單位發生處理の効率化について. *蚕糸昆蟲研報.* **2** : 47-63.
- 白山藤彦·入谷 明·西川義正·大西 宏 (1986) 液體窒素で長期(20年) 保存した牛凍結精液による受精試驗成績. *人工授精會誌.* **8** : 18-20.
- 田村俊樹·坂手 榮 (1985) カイユの精子の凍結保存について. *蚕糸研究.* **134** : 123-128.
- Tazima, Y. (1964) The genetics of the silkworm. Logos Press and Academic Press, pp. 1-17.
- Withers, L. A. (1980) The cryopreservation of higher plant tissue and cell cultures— an overview with some current observations and future thoughts. *Cryo-Lett.* **1** : 239-250.