

자주복 (*Takifugu rubripes*) 정자의 동결보존

장윤정 · 장영진 · 임한규

부경대학교 양식학과

Cryopreservation of Tiger Puffer (*Takifugu rubripes*) Sperm

Yun-Jeong Chang, Young-Jin Chang, and Han-Kyu Lim

Department of Aquaculture, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

ABSTRACT

Experiments were performed to study the effects of diluents, cryoprotectant, equilibration time, thawing temperature and addition of BSA and egg yolk. Among the various diluents, Alsever's solution was the best for sperm cryopreservation. A combination of Alsever's solution and 15% ethylene glycol showed the better results than others did. Sperm activity induction and survival rate gradually decreased with the equilibration time. The appropriate thawing temperature was $30 \pm 1^\circ\text{C}$. These results indicate that sperm cryopreservation methods can be developed in tiger puffer.

Key words: Tiger puffer (*Takifugu rubripes*), Sperm cryopreservation, Diluent, Cryoprotectant, Equilibration time, Thawing temperature.

서 론

어류양식은 크게 종묘생산과 양성으로 나뉘어진다. 이중 양성에서는 질 좋은 상품어를 생산하기 위하여 건 강한 종묘의 확보가 우선적으로 요구된다. 그러므로 유 전형질이 우수하고 건강도가 좋은 암수 친어로부터 동 시에 알과 정자를 채취하여 효과적으로 수정시켜 종묘 로 사육하는 일은 매우 중요하다. 그러나, 자연산 친어 로부터 구득한 수정란을 사용하여 종묘를 생산할 수 밖 에 없는 자주복의 경우, 자연산 친어 유래의 수정란 구 득에는 자연자원의 급감으로 인해 상당한 어려움이 따 르고 있으며, 더욱이 어획현장에서는 한쪽 성의 친어만 구해지거나 친어의 미숙 또는 과숙에 의해 양질의 알과 정자를 동시에 얻기 힘든 경우가 많다. 이러한 어려움을

해결하기 위하여 배우자의 관리 및 보존기술이 요구되 는데, 이중 어류 정자의 동결보존은 친어의 산란·방정 시기 및 성비의 불균형에 의해 초래되는 채란 및 채정의 어려움을 극복할 수 있게 하며, 수컷 친어의 사육관리에 필요한 경비 및 노력을 절감할 수 있게 한다. 또한 우량 형질을 가진 어류의 선택교배를 가능하게 하고 멸종 위 기에 처한 종이나 재래종의 유전형질을 보존함으로써 gene pool의 관리를 손쉽게 한다.

어류정자의 동결보존에 있어서는 1949년 Blaxter가 반년간 보존했던 청어 정액으로 인공수정에 성공한 이 후, 많은 연구자들에 의해 여러 어종에 대한 정자보존 기술개발이 이루어져 오고 있다. 그러나 동결보존에 관 한 최근까지의 연구는 주로 담수어류(Kurokura *et al.*, 1984; Tiersch *et al.*, 1994)와 연어류(Baynes & Scott, 1987; Piironen, 1993)를 중심으로 진행되어져

*이 논문은 농림수산부에서 시행한 농림수산특정연구사업의 연구결과임.

왔으며, 그 연구내용은 희석액, 동해방지제, 동결물, 해동용액 및 해동속도에 대한 것이었다. 이중 희석액에 관한 연구는 희석과정에서 정자가 활성화하는 것을 방지하기 위해 정장과 혈장의 조성을 모방한 희석액의 개발 (Erdahl *et al.*, 1987)과 포유동물 정자에서 동결시 세포막을 보호하는 것으로 알려진 단당류와 당중합체가 어류정자의 세포막 보호에 미치는 영향(Wilmut *et al.*, 1977) 및 희석액과 어종에 따른 bovine serum albumin(BSA)과 계란난황의 상승효과(Piironen, 1993 ; Babiak *et al.*, 1995) 조사에 집중되어져 왔다. 그러나 이와 같은 여러 희석액에 대해 어종별로 정자의 종 특이성을 세밀하게 조사하여 보존에 필요한 희석액을 결정 한 연구결과는 거의 없다.

따라서, 본 연구의 목적은 자주복 정자의 동결보존을 위해 필요한 조건, 특히 다양한 희석액이 동결보존시 정자의 운동성과 생존율에 미치는 영향을 파악하고, 이를 바탕으로 하여 자주복 정자의 동결보존에 있어 간단하고도 적합한 조건을 구명하여, 자주복의 정자보존 기법에 관한 자료를 제공하는 데에 있다.

재료 및 방법

실험어는 2~3년생 자주복 수컷으로, 전장은 43.5~45.1 cm, 체중은 1.7~2.0 kg이었으며 실험기간동안 moist pellet을 어체가 만복될 때까지 공급하였다.

어체로부터 정액을 채취하기 위하여 실험어를 MS-222(200 ppm)에 마취시킨 후, 비뇨생식공 주위를 눌러 오줌과 배설물을 미리 제거한 다음, 복부를 압박하여 채정하였다. 채취된 정액은 시험관에 넣어 밀봉한 후 얼음을 채운 ice box에서 보관하였다.

정자의 동결보존에 적합한 희석액을 결정하고 동해방지제의 독성을 평가하기 위하여, 11가지 희석액을 정액과 5:1의 비율로 섞은 후, 여기에 dimethyl sulfoxide (DMSO)와 ethylene glycol을 최종농도가 15%로 되도록 혼합하였다. 이후, 혼합직후 정자의 운동개시 여부와 자연해수로 활성화시킨 정자의 운동성을 조사하였다. 또한 이것을 $0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 유지되는 incubator에서 1일간 보존하여 적절한 희석액을 파악하고 동해방지제가 정자활성에 미치는 영향을 평가하였다. 동결보존 실험에 사용한 11가지 희석액의 조성은 Table 1과 같다.

동결보존에 적합한 동해방지제의 종류와 농도를 결정하기 위하여, Alsever's solution과 해산 경골어류용 링

Table 1. Constituents of diluents used in this experiment of sperm cryopreservation

Diluent	Constituent
Alsever's solution	2.05 g glucose, 0.4 g sodium chloride, 0.8 g sodium citrate /D.W. 100 ml
Cortland medium	0.23 g $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.0 g glucose, 0.38 g KCl, 0.23 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 7.25 g NaCl, 1.0 g NaHCO_3 , 0.41 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ /D.W. 1,000 ml
Egg-tris	1.424 g citric acid, 20 ml hen's egg yolk, 0.48 g fructose, 400 ppm gentamicin, 2.422 g W. 80 ml
Mounib's solution	6.5 mM glutathione, 100 mM KHCO_3 , 125 mM sucrose
Marin fish ringer solution(MFRS)	0.346 g CaCl_2 , 0.597 g KCl, 0.017 g MgCl_2 , 13.5 g NaCl, 0.025 g NaHCO_3 /D.W. 1,000 ml
Sodium chloride medium	0.4 M NaCl-0.1 M glycine 40 parts, 1.3% NaHCO_3 8 parts
Fructose(0.5 M)	90 g fructose /D.W. 1,000 ml
Glucose(0.3 M)	54.3 g glucose /D.W. 1,000 ml
NaCl(1%)	1 g NaCl /D.W. 100 ml
Sodium citrate(3.6%)	3.6 g sodium citrate /D.W. 100 ml
Sucrose(2.8%)	2.8 g sucrose /D.W. 100 ml

거액(MFRS)를 희석액으로 하여 정액과 5:1의 비율로 섞은 후, 여기에 동해방지제인 DMSO와 ethylene glycol의 최종농도가 5, 10, 15, 20%로 되도록 2개의 희석액과 혼합하였으며 20초 이내의 평형시간을 둔 후 동결하였다.

평형시간에 따른 동결보존 효과를 알아보기 위하여, 희석액으로는 Alsever's solution을 사용하여 정액과 5:1의 비율로 섞은 후, 여기에 동해방지제인 DMSO와 ethylene glycol의 최종농도가 각각 5, 10, 15, 20%로 되도록 하였다. 평형시간은 0, 1, 5, 10, 20, 40, 60분으로 설정하여 정자를 동결하였다.

해동온도가 해동 후 정자활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 희석액으로 Alsever's solution을, 동해방지제로 ethylene glycol을 사용하였다. 정액:희석액:동해방지제는 0.15:0.72:0.13의 비율로 혼합하였고 20초 이내의 평형시간으로 둔 후 동결하였다. 동결한 정액은 24시간후에 10, 20, 30, 40, 50℃에서 해동시킨 다음 정자활성을 평가하였다.

위의 각 실험에서 정자를 동결시키기 위하여, 희석정액이 주입된 0.5 ml 용량의 straw를 액체질소 증기(-76℃)에 의해 찬철히 1차 동결한 다음, 신속히 액체질소(-196℃)에서 넣어 2차 동결하였다(奥村과 廣瀬, 1991). 각 실험에서 동결시킨 정자는 액체질소 탱크에 1일간 저장한 후 30±1℃의 항온수조에서 10초 이내에 해동시켜 운동성과 생존율을 평가하였다.

동결보존의 각 실험별 정액의 처리조건에 따른 운동성을 평가하기 위하여, 전술한 각 실험을 실시한 후의 정액을 자연해수와 1:3의 비율로 섞은 다음, 광학현미경으로 관찰된 운동지수에 따라 점수를 부여하였다(Table 2). 그리고 Table 2의 각 운동점수와 운동정자의 비율에 따라 Strussmann 등 (1994)의 방법을 변형하여 정자활성지수(spermatozoa activity index, SAI)를 계산하였다. 각 실험에 대한 정자활성 지수는 2회 측정하여 평균을 구하였다.

동결보존 실험 후 정자의 생사 여부는 정자를 5% eosin-10% nigrosin(Blom, 1950; Fribourgh, 1966)에

Table 2. Numerical index for the evaluation of sperm motility

Index	Score	Motility characteristics
I	3	Sperm display forward movement rapidly
II	2	Sperm display forward movement slowly
III	1	Sperm display vibrating movement moderately
IV	0	Immobile sperm

$$SAI = \text{score} \times \% \text{ motile sperm} / 100$$

염색한 다음, 정자의 염색 정도에 따라 판별하였으며, 광학현미경(×1,000) 아래에서 3회 측정하여, 전체 정자수에 대한 살아 있는 정자수의 비율로 생존율을 산정하였다.

각 실험 결과는 일원 분산분석과 Tukey test(Zar, 1974)로 검정하였다.

결 과

정자의 동결보존에 적합한 희석액을 결정하고 동해방지제가 동결전 정자에 미치는 독성을 평가하기 위하여, 11가지 희석액과 2가지 동해방지제를 정액과 섞은 다음, 희석직후, 희석후 해수첨가로 활성화시킨 직후 및 1일간 액상보존한 후의 정자활성을 평가한 결과는 Table 3에 나타내었다. 15%의 DMSO를 첨가한 희석액으로 정액을 희석한 직후의 정자는 활성화 시키지 않았음에도 불구하고 대부분의 희석액에서 운동성을 나타내는 것이 확인되었다. 한편, 희석후 해수첨가로 활성화시킨 정자의 SAI는 희석액과 동해방지제로 정액을 희석한 직후의 정자 SAI와 역상관 관계를 보였다. 또한 DMSO를 첨가한 희석액으로 정액을 희석하여 1일간 액상보존하였을 때의 정자 생존율은 21.0~47.2%로, 희석 직후의 43.5~76.0%에 비해 크게 낮아졌다. 이에 비해 ethylene glycol을 동해방지제로 첨가한 11가지 희석액을 사용한 경우, 희석 직후에 정자가 운동을 개시한 희석액은 각각 fructose, glucose, sodium chloride medium 및 sodium citrate의 4가지였다. 이들을 제외한 나머지 7가지 희석액에서는 희

Table 3. Spermatozoa vitality after dilution with various media, activation with seawater and 1 day cool storage in various media

Cryoprotectant	Diluent	Mean SAI after			Survival rate (%) after	
		Dilution	Activation	Storage (1 day)	Dilution	Storage (1 day)
DMSO (15%)	Alsever's solution	0.2	1.9	1.7	66.5±3.4	47.2±2.3 ^a
	Cortland medium	0.1	2.1	2.1	76.0±3.9	45.8±2.9 ^a
	Egg-tris	2.4	1.4	0.3	67.8±2.8	31.5±3.3 ^d
	Fructose	2.7	2.6	0.0	48.7±3.6	21.0±2.1 ^f
	Glucose	2.7	1.4	0.0	43.5±3.1	46.2±2.8 ^a
	Mounib's solution	2.4	1.6	2.4	68.7±2.4	42.2±2.8 ^b
	NaCl	2.4	1.3	2.0	55.7±3.4	37.8±3.7 ^c
	MFRS	0.0	2.4	2.0	70.2±1.7	46.8±3.4 ^a
	SCM	0.2	0.9	0.0	57.5±2.9	27.3±2.6 ^e
	Sodium citrate	2.7	2.4	0.9	60.8±3.2	32.2±2.6 ^d
Sucrose	0.0	2.2	1.8	72.7±1.8	37.8±3.0 ^c	
Ethylene glycol(15%)	Alsever's solution	0.0	2.4	2.6	75.3±2.9	64.3±2.5 ^a
	Cortland medium	0.0	2.8	2.6	73.3±2.1	58.5±2.1 ^b
	Egg-tris	0.0	2.3	0.1	52.3±3.1	47.8±1.8 ^{fg}
	Fructose	3.0	2.4	1.0	55.3±3.6	51.8±2.0 ^e
	Glucose	2.7	2.7	0.8	62.8±2.1	52.8±1.6 ^{de}
	Mounib's solution	0.0	2.4	2.4	74.5±3.3	59.2±3.6 ^b
	NaCl	0.2	2.4	2.2	72.7±3.7	57.2±2.9 ^{bc}
	MFRS	0.0	2.4	2.4	70.5±3.5	60.0±2.0 ^b
	SCM	2.7	2.2	0.0	42.0±3.2	46.2±2.1 ^g
	Sodium citrate	2.7	2.7	2.1	62.7±3.4	50.0±2.2 ^{eg}
Sucrose	0.0	2.2	2.0	67.8±3.2	55.2±3.3 ^{cd}	

Values within the same column with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

MFRS : marine fish ringer solution, SAI : spermatozoa activity index, SCM : sodium chloride medium.

석 직후에 정자가 운동을 개시하지 않았고, 해수로 활성화 시켰을 때만 정자가 매우 활발하게 운동하는 것이 관찰되었다. 더욱이 ethylene glycol을 첨가한 희석액으로 정액을 희석하여 1일간 액상보존한 후의 정자 생존율도 46.2~64.3%로 나타나, 희석 직후의 42.0~75.3%에 비해 크게 낮아지지 않았으며, DMSO를 첨가하여 1일간 액상보존하였을 때보다 생존율이 높았다.

희석액을 Alsever's solution과 MFRS로 하였을 때, 동해방지제인 DMSO와 ethylene glycol을 각각 달리 첨가하여 1일간 $0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 에서 액상보존한 후의 SAI와 정자의 생존율은 각각 1.7~2.6과 46.8~64.3%로 나타나, 다른 희석액에 비해 비교적 좋은 결과를 보였다. 특

히 가장 우수한 결과를 보인 것은 희석액으로 Alsever's solution, 동해방지제로 15% ethylene glycol을 사용하여 정액을 희석한 것으로서, 1일간 액상보존한 후의 SAI와 정자의 생존율은 각각 2.6과 64.3±2.5%인 것으로 나타났다.

정자의 동결보존에 적합한 동해방지제의 종류와 농도를 결정하기 위하여, 동해방지제의 농도를 달리하여 정액과 혼합한 후 액체질소로 동결한 후 해동한 결과는 Table 4와 같다. 희석액으로 Alsever's solution을 사용하였을 때의 SAI와 정자의 생존율은 각각 모든 동해방지제에서 MFRS에 비해 좋은 결과를 보였다. 특히 Alsever's solution을 희석액으로 하고 ethylene gly-

Table 4. SAI and survival rate of tiger puffer spermatozoa in two diluents and different concentrations of two cryoprotectants on post-thawing

Diluent	Cryoprotectant	Concentration (%)	SAI	Survival rate (%)
Alsever's solution	DMSO	5	0.2	19.8±2.2 ^e
		10	0.2	19.8±3.1 ^e
		15	0.2	36.5±2.9 ^d
		20	0.8	52.7±2.7 ^d
	Ethylene glycol	5	0.4	39.3±1.6 ^d
		10	0.5	42.3±2.0 ^c
		15	2.0	72.0±2.9 ^a
		20	1.5	54.3±3.3 ^b
MFRS	DMSO	5	0.0	6.5±2.3 ^b
		10	0.0	6.3±2.2 ^b
		15	0.0	22.2±2.9 ^a
		20	0.0	22.3±3.6 ^a
	Ethylene glycol	5	0.0	5.2±2.8 ^b
		10	0.0	5.2±2.9 ^b
		15	0.0	5.0±1.1 ^b
		20	0.0	6.7±2.3 ^b

Values within the same column with different letters are significantly different (P<0.05).

MFRS : marine fish ringer solution, SAI : spermatozoa activity index.

col의 최종농도가 15%가 되도록 혼합하여 동결하였을 때, SAI와 정자의 생존율이 각각 2.0과 72.0±2.9%로 나타나, DMSO에 비해 보존효과가 유의하게 높았다(P<0.05). 이것은 SAI와 생존율이 각각 2.7과 83.7±3.2%인 신선한 정액에 비해서는 다소 낮은 것이지만, 동해방지제를 첨가하지 않고 동결시켰을 때의 SAI와 생존율이 각각 0과 16.7±2.1%인 것에 비하면 월등히 높은 수준이었다. 그러나 DMSO를 동해방지제로 사용한 경우, ethylene glycol에 비해 보존효과가 떨어지는 것으로 나타났다.

평형시간이 동결보존 효과에 미치는 영향을 파악하기 위하여, 평형시간별로 정자를 동결한 후 해동한 결과는 Table 5와 같다. SAI와 생존율은 모든 동해방지제에서 평형시간을 늘릴수록 점차 낮아졌다. 가장 좋은 결과를 보인 것은 15% ethylene glycol을 동해방지제로 하여 평

Table 5. SAI and survival rate of tiger puffer spermatozoa in different equilibration time on post-thawing

Cryoprotectant	Equilibration time (min)	SAI	Survival rate (%)
DMSO (20%)	0	0.8	45.7±2.9 ^a
	1	0.1	40.0±2.2 ^b
	5	0.0	34.7±2.9 ^c
	10	0.0	33.2±3.1 ^c
	20	0.0	33.3±3.9 ^c
	40	0.0	28.2±3.2 ^d
Ethylene glycol (15%)	60	0.0	22.3±2.7 ^e
	0	1.5	69.8±3.7 ^a
	1	0.9	45.5±3.1 ^b
	5	0.6	43.7±3.3 ^b
	10	0.5	34.0±3.3 ^c
	20	0.5	32.9±2.3 ^{cd}
	40	0.3	32.0±3.7 ^{cd}
	60	0.3	30.0±2.8 ^d

Values within the same column with different letters are significantly different (P<0.05). SAI : spermatozoa activity index

Table 6. SAI and survival rate of tiger puffer spermatozoa thawed with various temperature

Temperature (°C)	SAI	Survival rate (%)
10	0.3	32.5±2.9 ^d
20	0.5	43.8±2.5 ^c
30	1.5	71.7±3.5 ^a
40	0.7	57.7±3.6 ^b
50	0.6	33.7±3.3 ^d

Values within the same column with different letters are significantly different (P<0.05). SAI : spermatozoa activity index

형시간을 최소로 하면서 동결시킨 것으로, SAI와 정자의 생존율은 각각 1.5와 69.8±3.7%였다.

적합한 해동온도를 구명하기 위하여, 동결 후 각기 다른 온도에서 정자를 해동시킨 결과는 Table 6과 같다. 30°C에서 해동하였을 때, SAI와 생존율이 각각 1.5와 71.7±3.5%로 다른 온도에 비해 유의하게 높았으므로(P<0.05), 이 온도가 straw법으로 동결한 자주복 정자를 해동시키는 데 가장 적절한 것으로 나타났다.

고 찰

정자의 동결보존 효과에 영향을 미치는 중요한 요인으로는 희석액, 동해방지제, 평형시간 및 해동온도 등이 있다. 정자를 동결보존하기 위한 첫 과정은 적정 희석액의 선택이라 할 수 있다. 지금까지 어류정자의 동결보존을 위해 많은 종류의 희석액이 이용되고 있다(Chao *et al.*, 1975; Bolla *et al.*, 1987; Gwo *et al.*, 1991; Piironen, 1993; Gwo, 1994; Babiak *et al.*, 1995). 어류정자의 보존에 있어 희석액은 희석시 정자가 삼투압 자극에 의해 활성화되는 것을 방지하기 위하여(Jamieson, 1991), 정장의 삼투질농도와 유사한 것을 사용하며, 그 조성은 매우 다양하다. 본 연구에서도 희석 직후에 정자가 운동을 개시한 희석액으로 1일간 액상보존하였을 경우, 보존효과가 떨어지는 것이 관찰되었다. Gwo 등(1991)은 Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) 정자의 동결보존을 위한 희석액으로 sodium chloride, glucose 및 sucrose와 같은 간단한 조성의 희석액이 유리하다고 하였고, Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*)에서는 희석액으로 Mounib's solution과 MFRS를 사용하였을 때 보존효과가 좋은 것으로 나타났다(Bolla *et al.*, 1987). 이와 같이 적합한 희석액의 종류는 어종에 따라 종 특이적인 경향을 보이며, 자주복에서는 Alsever's solution이 적합한 희석액인 것으로 나타났다. 당질을 포함한 희석액은 Atlantic croaker(Gwo *et al.*, 1991), 복섬(*Fugu niphobles*) (Gwo *et al.*, 1993) 및 연어과 어류(Piironen, 1993) 등에서 우수한 보존효과를 보였다. 일반적으로 sucrose나 trehalose와 같은 당은 동결보존 중 정자 세포막의 인지질을 안정시키는 것으로 알려져 있다(Gwo, 1994). 본 연구에서도 glucose를 포함한 희석액인 Alsever's solution이 염류만 포함한 MFRS에 비해 보존효과가 높은 것으로 나타났다.

동결보존을 위해 필요한 여러 가지 요인 중 가장 중요한 것이 정자가 동해를 입는 것을 방지하는 역할을 하는

동해방지제라 할 수 있다. 이러한 동해방지제는 친수성이어야 하고 세포막에 대한 투과성이 좋아야 하며 정자에 대한 독성이 낮아야 하는 등의 조건을 구비해야 한다(Jamieson, 1991). 지금까지 DMSO, ethylene glycol, glycerol 및 methanol이 주로 사용되고 있으나, 동해방지제는 종 특이적인 경향이 상당히 강하기 때문에 모든 어류에서 획일적으로 사용될 수 있는 동해방지제는 아직 구명된 바 없다. 자주복에서는 희석액으로 Alsever's solution을 사용하고 동해방지제로 15% ethylene glycol을 사용하였을 때, SAI와 정자의 생존율이 각각 2.0, $72.0 \pm 2.9\%$ 로 가장 좋은 것으로 나타났다. 비록 ethylene glycol이 DMSO에 비해 동해방지제로 널리 사용되지는 않으나, Atlantic croaker에서는 다른 동해방지제에 비해 보존효과가 높았다(Gwo *et al.*, 1991). Ethylene glycol은 분자량이 적어 세포구조에 침투하는 시간이 매우 빠르므로 정자에 미치는 독성을 최소화할 수 있고, 그 결과 정자가 받는 삼투압 충격도 감소시킬 수 있다(Gwo, 1994). 비록 자주복에서는 DMSO가 동해방지제로서 효과가 저조하였으나, 대부분의 해산어류에서 가장 널리 이용되고 있는 동해방지제이기도 하다(Chao *et al.*, 1975; Stoss & Holtz, 1983; Erdahl *et al.*, 1984; 黒倉, 1984; Gwo *et al.*, 1991; Gwo *et al.*, 1993; Gwo, 1994; 임, 1996). 그러나 운수성 담수어류의 정자를 동결보존할 때, DMSO는 동해방지제로서 부적합한 것으로 알려져 있다(Harvey, 1983).

자주복 정자의 동결보존시 동해방지제로 DMSO와 ethylene glycol을 사용하였을 때, 평형시간이 짧을수록 해동후 SAI와 생존율이 높았다. 이것은 yellowfin seabream (*Acanthopagrus australis*)에서 동해방지제로 DMSO, glycerol, propylene glycerol, ethylene glycol, methanol을 사용하고 평형시간을 달리하였을 경우, 평형시간이 증가할수록 4가지의 동해방지제 모두에서 운동성이 낮아졌다는 보고와 일치한다(Gwo, 1994). 어류정자는 크기가 매우 작으므로 동해방지제가 세포내로 빠르게 침투한다(Morisawa, 1985). 따라서

동해방지제의 독성을 최소화하기 위해 평형시간을 가급적 짧게 두는 것이 일반화되어 있다(Gwo, 1994).

본 연구에서 자주복의 동결정자를 30℃에서 해동하였을 때 SAI와 생존율이 가장 높은 것으로 나타나, cobia (*Rachycentron canadum*) (Caylor *et al.*, 1994)의 동결정자를 28~37℃에서 해동하였을 때 가장 좋은 효과를 보였다는 결과와 일치하였다. 해동온도가 너무 낮을 경우 세포내에 recrystallization이 일어나고, 반대로 너무 높을 경우에는 세포가 탈수된 물을 재흡수할 수 있는 시간을 충분히 갖지 못함으로 인해 동해를 입게 되며, 이에 따라 해동후의 정자활력이 감소한다(Jamieson, 1991).

따라서, 앞으로는 정자의 동해를 최소화시키기 위해 이러한 조건들에 대한 보다 심도있는 연구가 진행되어야 할 것이다.

요 약

자주복 정자의 동결에 필요한 조건을 구명하기 위하여 희석액, 동해방지제, 평형 시간, 해동온도 및 BSA와 계란난황의 첨가 등에 관하여 연구하였다. 자주복 정자의 동결보존시 희석액을 Alsever's solution, 동해방지제를 ethylene glycol로 하여 정액:희석액:동해방지제가 0.15:0.72:0.13의 비율이 되도록 정액을 희석, 동결시킨 후 하루동안 보존하였을 때, SAI와 생존율이 각각 2.0과 72.0±2.9%로 가장 좋았다. 모든 동해방지제에서 평형시간은 적게 할수록 좋았으며, 해동온도는 30±1℃가 적합하였다.

인용문헌

- Babiak I, Glogowski J, Luczynski MJ, Kucharczyk D, Luczynski M (1995): Cryopreservation of the milt of the northern pike. *J Fish Biol* 46:819-828.
- Blaxter JHS (1953): Sperm storage and cross fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature* 172:1189-1190.
- Blom E (1950): A one-minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. *Fertil Steril* 1:176-177.
- Bolla S, Holmefjord I, Refstie T (1987): Cryogenic preservation of Atlantic halibut sperm. *Aquaculture* 65:371-374.
- Caylor RE, Biesiot PM, Franks JS (1994): Culture of cobia (*Rachycentron canadum*): Cryopreservation of sperm and induced spawning. *Aquaculture* 125:81-92.
- Chao NH, Chen HP, Liao IC (1975): Study on cryogenic preservation of grey mullet sperm. *Aquaculture* 5:389-406.
- Erdahl AW, Erdahl DA, Graham EF (1984): Some factors affecting the preservation of salmonid spermatozoa. *Aquaculture* 43:341-350.
- Erdahl AW, Graham EF (1987): Fertility of teleost semen as affected by dilution and storage in a seminal plasma-mimicking medium. *Aquaculture* 60:311-321.
- Fribourgh JH (1996): The application of a differential staining method to low-temperature studies on goldfish spermatozoa. *Prog Fish-Cult* 28:227-231.
- Gwo JC (1994): Cryopreservation of yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*) spermatozoa. *Theriogenology* 41:989-1004.
- Gwo JC, Kurokura H, Hirano R (1993): Cryopreservation of spermatozoa from rainbow trout, common carp, and marine puffer. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59(5):777-782.
- Gwo JC, Strawn K, Longnecker MT, Connie R (1991): Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa. *Aquaculture* 94:355-375.

- Harvey B (1983): Cryopreservation of *Sarotherodon mossambicus* spermatozoa. *Aquaculture* 32:313-320.
- Jamieson BGM (1991): "Fish Evolution and Systematics : Evidence from Spermatozoa," Cambridge University Press, New York: pp. 256.
- Kurokura H, Hirano R, Tomita M, Iwahashi M (1984): Cryopreservation of carp sperm. *Aquaculture* 37:267-273.
- Morisawa M (1985): Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleosts. *Zool Sci* 2:605-615.
- Piironen J (1993): Cryopreservation of sperm from brown trout (*Salmo trutta m. lacustris* L.) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L). *Aquaculture* 116:275-285.
- Stoss J, Holtz W (1983): Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. IV. The effect of DMSO concentration and equilibration time on sperm survival, sucrose and KCl as extender components and the osmolarity of the thawing solution. *Aquaculture* 32:321-330.
- Strussmann CA, Renard P, Ling H, Takashima F (1994): Motility of pejerrey, *Odontesthes bonariensis* spermatozoa. *Fish Sci* 60(1):9-13.
- Tiersch TR, Goudie CA, Carmichael GJ (1994): Cryopreservation of channel catfish sperm: storage in cryoprotectants, fertilization trials, and growth of channel catfish produced with cryopreserved sperm. *Trans Amer Fish Soc* 123:580-586.
- Wilmot I, Polge C (1977): The low temperature preservation of boar spermatozoa: The motility and morphology of boar spermatozoa frozen and thawed in diluent which contained only sugar and egg yolk. *Cryobiology* 14:479-482.
- Zar JH (1974): *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall Inc. Englewood Cliffs, N.J: pp. 620.
- 奥村重信, 廣瀬慶二 (1991): 凍結保存精子によるアマダイの人工受精. *水産増殖* 39:441-445.
- 임한규 (1996): 감성돔, *Acanthopagrus schlegelii* 정액의 특성과 정자보존. 부산수산대학교 석사학위 논문: p. 24.