

자주복(*Takifugu rubripes*) 정자의 액상보존

장영진 · 장윤정 · 임한규

부경대학교 양식학과

Short-term Preservation of Sperm in the Tiger Puffer, *Takifugu rubripes*

Young Jin Chang, Yun Jeong Chang and Han Kyu Lim

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

Condition for fresh storage of tiger puffer in the liquid state were investigated in several experiments. When marine fish ringer solution and 1% NaCl were used as the diluent for the short-term preservation method, spermatozoa activity index (SAI) and survival rate showed the best result among the various diluents tested. The dilution rate for the short-term preservation of spermatozoa was suitable between 3 and 5 times with the 1% NaCl diluent. The appropriate range of temperature for the short-term preservation showed between 0 and 5°C. In order to keep high SAI and survival rate of spermatozoa, antibiotic addition (800 ppm neomycin) could be suggested. These results indicated that the short-term preservation method could be employed in tiger puffer spermatozoa.

Key words : Tiger puffer, *Takifugu rubripes*, Diluents, Dilution rate, Temperature, Antibiotic

서 론

어류양식은 크게 종묘생산과 양성으로 나뉘어진다. 이중 양성에서는 질 좋은 상품어를 생산하기 위하여 건강한 종묘의 확보가 우선적으로 요구된다. 그러므로 유전형질이 우수하고 건강도가 좋은 암수 친어로부터 동시에 알과 정자를 채취하여 효과적으로 수정시켜 우량종묘로 키워내는 일은 매우 중요하다. 그러나, 자연산 친어로부터 얻은 수정란을 사용하여 종묘를 생산할 수 밖에 없는 자주복의 경우, 자연산 친어 유래의 수정란을 얻는 데는 자연자원의 급감으로 인해 상당한 어려움이 따르고 있으며, 더욱이 어획현장에서는 한쪽 성의 친어만 구해지거나 친어의 미숙 또는

과숙에 의해 양질의 알과 정자를 동시에 얻기 힘든 경우가 많다. 이러한 어려움을 해결하기 위해 배우자의 보존 및 관리기술이 요구되는데, 이중 정자의 액상보존은 양식 대상 어류의 종묘생산시 친어의 방란·방정 시기와 성비의 차이에 따른 문제점을 극복할 수 있게 하며, 정액의 수송이나 조작 등을 간편하게 한다.

어류정자의 액상보존에 관해서는 Barrett (1950)가 연어류의 정자를 0°C에서 보존하였을 때 며칠동안 생존했다는 결과를 얻은 이후, 최근까지 꾸준히 연구되고 있다. 특히 회색액에 따른 보존 효과(Chao et al., 1975; Hara et al., 1982; McNiven et al., 1993), 산소공급에 따른 정자의 수정능력 향상(Stoss and Holtz, 1983) 및 항

이 논문은 농림부에서 시행한 농림수산특정연구사업의 연구결과임.

생제 사용에 따른 보존기간 연장 (Stoss et al., 1978 ; Saad et al., 1988 ; Chao et al., 1992) 등에 관한 연구가 주류를 이루고 있다. 그러나 정자보존에 필요한 이러한 여러 조건들은 어중에 따라 큰 차이를 보이고 있어, 각 어종의 정자보존에 필요한 방법들을 획일적으로 적용할 수 없으므로, 보존하고자 하는 어류 정자의 각 보존 조건에 대해 보존효과를 세밀하게 분석하고 이를 바탕으로 종합된 보존방법을 구축해야 한다.

따라서 본 연구의 목적은 최근 자원량의 급감으로 암수 친어를 동시에 얻기 어려운 자주복(*Takifugu rubripes*) 정자의 액상보존을 위해 필요한 조건, 특히 다양한 희석액이 액상보존시 정자의 운동성과 생존율에 미치는 영향을 파악하고, 이를 바탕으로 자주복 정자의 액상보존에 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 충분히 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.

희석액의 조성에 따른 정자의 액상보존 효과를 파악하기 위하여, Alsever's solution, Cortland medium, egg-tris, 0.5 M fructose, 0.3 M glucose, Mounib's solution, marine fish ringer solution(MFRS), 1% NaCl, sodium chloride medium(SCM), 3.6% sodium citrate 및 2.8% sucrose 등의 11가지 희석액을 정액과 3:1의 비율로 섞은 후, 각 희석액별로 시험관(φ 1.1 cm)에 분주하였다. 분주가 완료된 희석 정액은 0±0.5℃로 유지한 incubator에서 7일간 보존하면서, 1일 간격으로 0.1 ml의 희석정액을 덜어내어 정자활성을 조사하였다. 각 희석액들의 조성은 Table 1과 같다.

액상보존시 정액의 적정 희석비율을 결정하기 위하여, 1% NaCl을 희석액으로 사용하여 정액을 각각 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30배로 희석한 후, 희석정액별로 시험관(φ 1.1 cm)에 분주한

Table 1. Constituents of diluents used in the experiment of the short-term preservation of spermatozoa

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 CaCl ₂ · H ₂ O, 1.0 g glucose, 0.38 g KCl, 0.23 g MgSO ₄ · 7H ₂ O, 7.25 g NaCl, 1.0 g NaHCO ₃ , 0.41 g NaH ₂ PO ₄ · H ₂ 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 tris/D.W. 80 ml
Mounib's solution	6.5 mM glutathione, 100 mM KHCO ₃ , 125 mM sucrose
Marine 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(SCM)	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

D.W. : distilled water

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

다음, $0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 의 incubator에서 20일간 보존하였다. 처음 7일 동안은 1일 간격으로 그 이후부터 3일 간격으로 정자활성을 평가하였다.

액상보존시 온도가 보존효과에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 1% NaCl 회석액을 정액과 5:1의 비율로 혼합한 후, 회석정액을 시험관에(ϕ 1.1 cm) 분주한 다음, 각각 0, 5, 10, 20°C 의 온도에서 20일간 보존하였다. 보존 7일까지는 1일 간격으로, 이후 20일까지는 3일 간격으로 정자활성을 평가하였다.

액상보존시 항생제의 첨가에 따른 보존효과를 평가하기 위하여, 1% NaCl 회석액을 정액과 5:1의 비율로 섞은 후, neomycin과 gentamicin을 최종농도가 각각 200, 400, 600, 800, 1000 ppm 되도록 첨가하였다. 각 회석정액을 시험관(ϕ 1.1 cm)에 분주한 다음, $0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 의 incubator에 20일간 보존하면서 7일 동안은 1일 간격으로, 이후부터는 3일 간격으로 정자활성을 평가하였다.

액상보존의 각 실험별 정액의 처리조건에 따른 운동성을 평가하기 위하여, 전술한 각 실험을 실시한 후의 회석정액을 자연해수와 1:3의 비율로 섞은 다음, 광학현미경으로 관찰된 운동지수에 따라 점수를 부여하였다(Table 2). 그리고, Table 2의 각 운동점수와 운동정자의 비율에 따라 Strussmann et al. (1994)의 방법을 변형하여 정자활성지수(spermatozoa activity index, SAI)를 계산하였다($\text{SAI} = \text{점수} \times \text{운동정자의 비율}(\%) / 100$). 각 실험에 대한 정자활성 지수는 2회 측정하여 평균을 구하였다.

액상보존 실험 후 정자의 생사 여부는 정자를 5% eosin-10% nigrosin (Blom, 1950; Friborough, 1966)에 염색한 다음, 정자의 염색 정도에 따라 판별하였으며, 광학현미경($\times 1,000$) 아래에서 3회 측정하여, 전체 정자수에 대한 살아 있는 정자수의 비율로 생존율을 산정하였다.

각 실험 결과는 일원 분산분석과 Tukey test (Zar, 1984)로 검정하였다.

결 과

적정 회석액

액상보존에 적합한 회석액을 결정하기 위하여, 채취한 정액을 다양한 회석액과 혼합한 다음 $0 \pm$

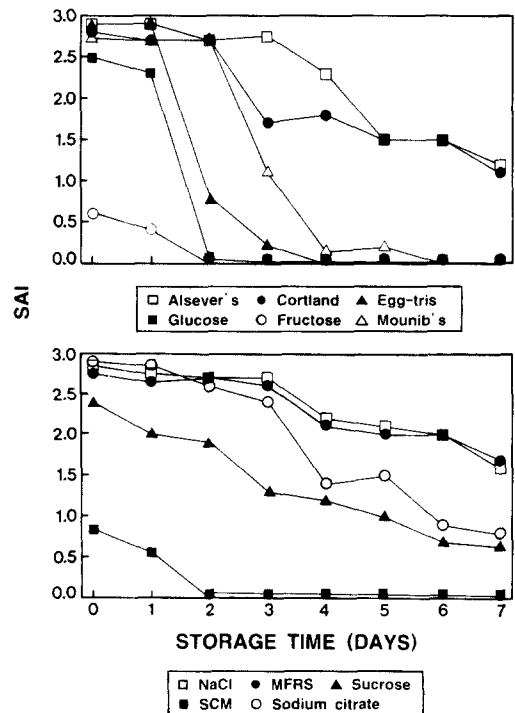


Fig. 1. Variations of spermatozoa activity index (SAI) and survival rate in tiger puffer spermatozoa stored at 0°C for 7 days with 11 diluents. MFRS: marine fish ringer solution, SCM: sodium chloride medium.

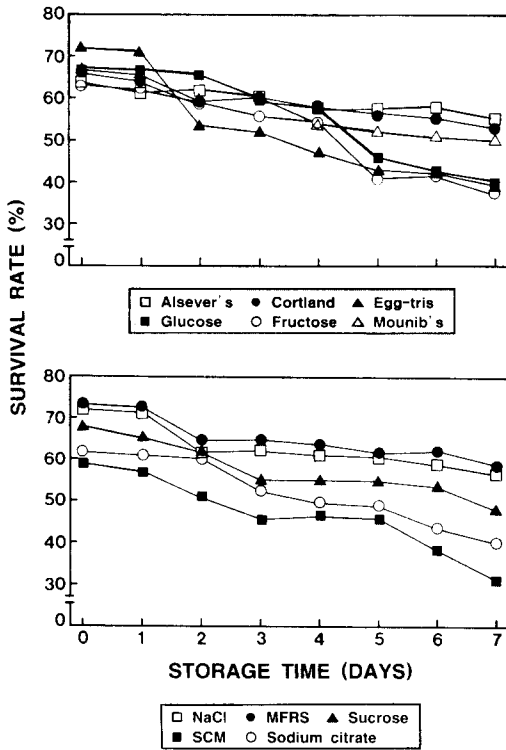


Fig. 1. (Continued)

0.5°C에서 7일간 보존하면서 SAI와 정자의 생존율을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 희석직후의 희석액별 SAI는 fructose와 SCM에서 각각 0.6과 0.9로 가장 낮았고, 그 외 9가지 희석액에서는 2.4~2.9로 비교적 높았다. 보존 2일째에는 fructose, glucose 및 SCM의 SAI가 급격히 저하하여 거의 0에 이르렀다. 보존 7일째에 MFRS와 1% NaCl의 SAI는 각각 1.7과 1.6으로 다른 희석액에 비해 가장 높았다. 희석액별 정자의 생존율도 SAI와 비슷한 경향을 보여, MFRS와 1% NaCl을 희석액으로 하였을 때 보존 7일째 정자의 생존율은 각각 $59.0 \pm 1.5\%$, $56.7 \pm 6.2\%$ 로, 다른 희석액에 비해 유의하게 높았으며($P < 0.05$), 두 희석액 사이에는 유의차가 인정되지 않았다.

희석비율에 따른 보존효과

11가지 희석액 중 SAI와 정자의 생존율이 높았던 1% NaCl을 희석액으로 하고 정액의 희석비율을 달리하여 0±0.5°C에서 20일간 보존한 결과, 정액을 20배 이상의 비율로 희석한 것은 20배 미만으로 희석하여 보존한 것에 비해 보존 1일째에 SAI가 급격히 감소하였고, 모든 희석비율에서 보존 20일째의 SAI는 0으로 나타났다 (Fig. 2). 그러나 보존 20일째에 정자의 생존율은 최저 12.8%에서 최고 46.7%로 나타나, 운동하지 않는 정자라 할지라도 생존하고 있음을 알 수 있었다. 여러 가지 희석비율 중 가장 좋은 보존 결과를 보인 것은 1% NaCl을 사용하여 정액을 3배와 5배로 희석한 것으로, 보존 20일째 정자의 생존율은 각각 $46.7 \pm 2.7\%$ 와 $45.2 \pm 2.9\%$ 로 다른 희석비율에 비해 유의하게 높았으며($P < 0.05$), 두 희석비율 사이에는 유의차가 인정되지 않았다.

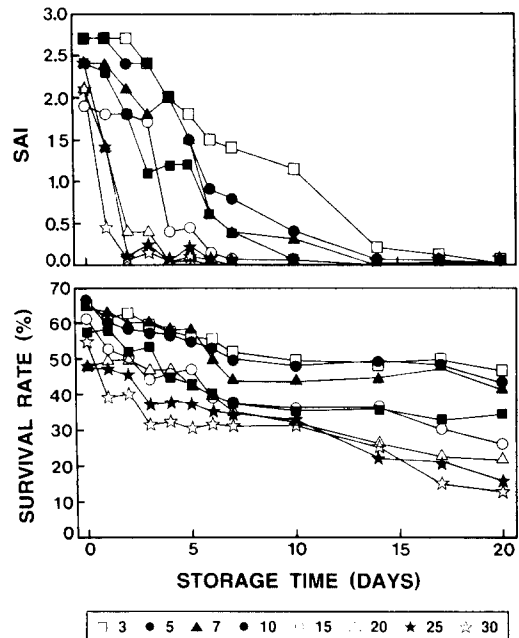


Fig. 2. Variations of spermatozoa activity index (SAI) and survival rate in tiger puffer spermatozoa stored at 0°C for 20 days with different dilution rates in 1% NaCl diluent.

온도에 따른 보존효과

1% NaCl을 희석액으로 하여 정액을 5배 희석한 후, 보존온도를 달리하여 20일간 보존한 결과는 Fig. 3과 같다. 보존 6일째의 SAI는 0°C와 5°C에서 보존한 정자의 경우 각각 0.9, 1.1을 보인 반면, 10°C 이상에서 보존한 것은 0.3 이하로 급격히 낮아졌다. 0°C와 5°C에서 보존한 정자의 보존 20일째 생존율은 각각 44.5±3.3%, 42.8±1.7%로 다른 처리구에 비해 유의하게 높았으며(P < 0.05), 두 온도 사이에는 유의차가 인정되지 않았다. 그러나 10°C와 20°C에서 보존한 정자의 보존 20일째 생존율은 각각 0.5±0.8%, 0±0.0%로 보존효과가 매우 낮았다.

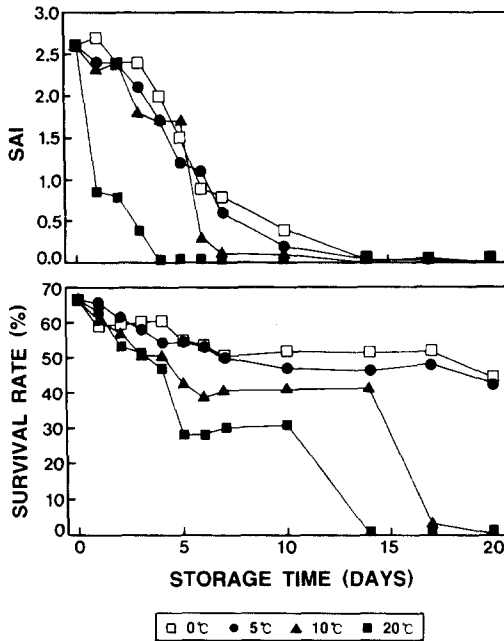


Fig. 3. Variations of spermatozoa activity index (SAI) and survival rate in spermatozoa stored for 20 days with different storage temperatures.

항생제 첨가에 따른 보존효과

1% NaCl을 희석액으로 하여, 원정액을 5배 희석한 후, 항생제인 neomycin과 gentamicin을 농도별로 첨가한 다음, 20일간 0±0.5°C에서 보존하였을 때의 결과는 Fig. 4와 같다. Neomycin

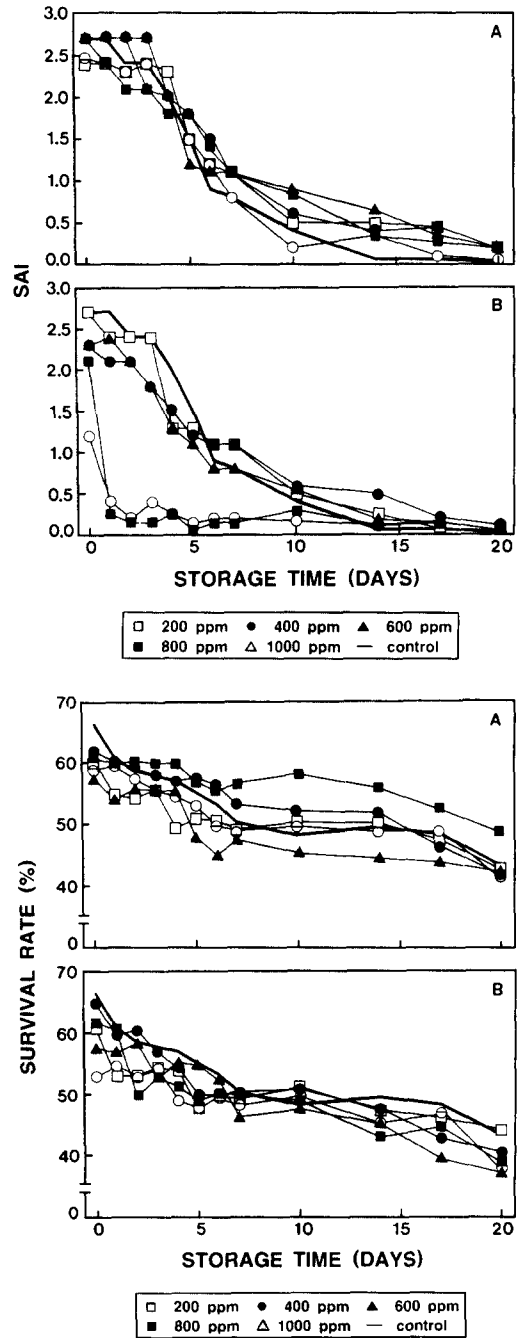


Fig. 4. Variations of spermatozoa activity index (SAI) and survival rate in spermatozoa stored at 0°C for 20 days with two antibiotics of different concentrations. A : neomycin, B : gentamicin.

200~1,000 ppm의 첨가농도별 SAI는 보존기간동안 서로 큰 차이 없이 비슷하였으나, gentamicin에서는 800 ppm 이상에서 보존 1일째에 SAI가 급격히 낮아졌다. 가장 우수한 보존효과를 보인 것은 neomycin 800 ppm구로서, 보존 20일째의 SAI와 정자의 생존율은 각각 $0.2 \pm 0.0\%$, $48.7 \pm 1.6\%$ 로 다른 처리구에 비해 유의하게 높았다($P < 0.05$). 항생제를 첨가하지 않았던 대조구의 SAI와 정자 생존율은 800 ppm의 neomycin을 첨가한 것에 비해 낮은 결과를 보였다.

고 찰

어류정자의 액상보존에 영향을 미치는 주요 요인으로는 희석액, 희석비율, 보존온도 및 항생제 등이 있다. 이 가운데 적절한 희석액을 결정하는 것은 액상보존의 효과를 높이기 위해 선결되어야 할 요건이다. 어종에 따라 다양한 종류의 희석액이 이용되어지고 있는데(Truscott et al., 1968; Chao et al., 1975; Scott and Baynes, 1980; Hara et al., 1982), 이런 희석액들이 갖추어야 할 가장 중요한 요건은 희석 후에도 정자가 운동하지 않도록 하여 운동에 필요한 에너지가 소비되는 것을 효과적으로 억제시키는 데에 있다(Ohta and Izawa, 1996). 자주복 정자의 액상보존을 위한 적정 희석액을 결정하는 실험에서는 MFRS와 1% NaCl이 적절한 희석액인 것으로 나타났다. Hara et al. (1982)이 milkfish, *Chanos chanos*의 정자를 $0 \sim 4^\circ\text{C}$ 에서 보존하였을 때, 동종의 혈청이 다른 희석액들 보다 뛰어난 보존효과를 보였다고 하였다. Chao et al. (1975)은 송어, *Mugil cephalus*의 운동성을 유지하는 데 있어 6, 10 및 12%의 sodium citrate가 좋은 희석액이라고 보고하였다. 이처럼 액상보존에 있어 적절한 희석액의 종류는 어종에 따라 차이가 있으므로, 정자의 운동을 억제시킬 수 있고 삼투질농도나 이온조성이 정장과 유사한 희석액을 선택하여 사용함으로써 보존효과를 높일 수 있으리라 생각된다.

자주복 정자의 액상보존에서 적정 희석비율은 3~5배로서 bluefin tuna, *Thunnus thynnus*의 정자를 낮은 비율(3배)로 희석할수록 운동성과 수정률이 높다는 Doi et al. (1982)의 결과와 일치한다. Erdahl and Graham (1987)은 희석비율이 높으면 정자의 운동이 개시되어 보존효과가 떨어진다는 dilution effect를 제시하였다. Stoss and Holtz (1983)는 저온(0°C)이 정자의 대사를 감소시켜 보존기간을 연장시키는 데 중요한 역할을 한다고 하였다. 자주복에서도 $0 \sim 5^\circ\text{C}$ 에 정자를 보존했을 때 정자의 활력이 비교적 오래 지속되었다.

액상보존시 희석액에 항생제를 첨가하는 것은 채정시 혼입된 세균의 성장을 억제시켜(Stoss and Refstie, 1983), 정자의 운동성이나 생존율 뿐만 아니라 수정률을 높이는 데 도움이 된다(Stoss et al., 1978; Saad et al., 1988; Chao et al., 1992). 그러나 Stoss et al. (1978)은 적정 농도의 항생제 첨가가 정자의 보존기간을 연장시키지만, 고농도일 때는 역효과가 나타난다고 하였다. 또한 Chao et al. (1992)은 grouper, *Epinephelus malabaricus*의 정자보존시 penicillin이나 neomycin에 비해 500 ppm의 streptomycin을 첨가하였을 때 수정률이 높아짐으로써, 항생제의 종류 뿐만 아니라 항생제의 농도에 따라서도 보존효과에 차이가 있음을 강조하였다. 본 연구에서도 gentamicin에 비해 neomycin 800 ppm이 SAI와 정자의 생존율을 높게 하였다. 이와 같이 정자의 액상보존시 어종에 따른 적합한 항생제의 종류와 농도가 다르므로 이를 충분히 고려하여 항생제를 선택하는 것이 중요하다.

따라서 앞으로는 이러한 액상보존 조건하에서 정자의 보존기간을 연장시킬 수 있도록, 산소의 공급과 이에 따른 정자의 물질대사에 관한 세부적인 연구가 이루어져야 할 것이다.

요 약

자주복(*Takifugu rubripes*)정자의 액상보존을

위한 기초자료를 얻고자, 수조사육한 전장 43.5~45.1 cm, 체중 1.7~2.0 kg의 2~3년생 자주복 수컷을 재료로 하여, 정자의 액상보존 효과를 연구하였다.

희석액으로 marine fish ringer solution과 1% NaCl을 사용하여 7일간 보존하였을 때, SAI와 정자의 생존율이 각각 1.7과 $59.0 \pm 1.5\%$, 1.6과 $56.7 \pm 6.2\%$ 로 가장 높았다. 정자를 3~5 배로 희석하여 보존하였을 때, 가장 높은 SAI와 정자의 생존율을 보였으며, 보존온도로는 0~5 °C가 적절하였다. SAI와 정자의 생존율을 높이기 위한 항생제로는 neomycin (800 ppm)이 효과적이었다.

참 고 문 헌

- Barret, I., 1950. Fertility of salmonid eggs and sperm after storage. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 8 : 125-133.
- Blom, E., 1950. A one-minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. *Fertil. Steril.*, 1 : 176-177.
- Chao, N. H., H. P. Chen and I. C. Liao, 1975. Study on cryogenic preservation of grey mullet sperm. *Aquaculture*, 5 : 389-406.
- Chao, N. H., H. P. Tsai and I. C. Liao, 1992. Short- and long-term cryopreservation of sperm and sperm suspension of the grouper, *Epinephelus malabaricus* (Bloch and Schneider). *Asian Fish. Sci.*, 5 : 103-116.
- Doi, M., T. Hoshino, Y. Taki and Y. Ogawara, 1982. Activity of the sperm of the Bluefin Tuna *Thunnus thynnus* under fresh and preserved conditions. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 48(4) : 495-498.
- Erdahl, A. W. and E. F. Graham, 1987. Fertility of teleost semen as affected by dilution and storage in a seminal plasma-mimicking medium. *Aquaculture*, 60 : 311-321.
- Fribourgh, J. H., 1966. The application of a differential staining method to low-temperature studied on goldfish spermatozoa. *Prog. Fish-Cult.*, 28 : 227-231.
- Hara, S., J. T. Canto and J.M.E. Almendras, 1982. A comparative study of various extenders for milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal), sperm preservation. *Aquaculture*, 28 : 339-346.
- McNiven, M. A., R. K. Gallant and G. F. Richardson, 1993. Fresh storage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen using a non-aqueous medium. *Aquaculture*, 109 : 71-82.
- Ohta, H. and T. Izawa, 1996. Diluent for cool storage of Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. *Aquaculture*, 142 : 107-118.
- Saad, A., R. Billard, M. C. Theron and M. G. Hollebecq, 1988. Short-term preservation of carp (*Cyprinus carpio*) semen. *Aquaculture*, 71 : 133-150.
- Scott, A. P. and S. M. Baynes, 1980. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *J. Fish Biol.*, 17 : 707-739.
- Stoss, J., S. Buyukhatipoglu and W. Holtz, 1978. Short-term and cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) sperm. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 18(4) : 1077-1082.
- Stoss, J. and T. Refstie, 1983. Short-term storage and Cryopreservation of milt from Atlantic salmon and sea trout. *Aquaculture*, 30 : 229-236.
- Stoss, J. and W. Holtz, 1983. Successful storage of chilled rainbow trout (*Salmo gairdneri*) spermatozoa for up to 34 days. *Aquaculture*, 31 : 269-274.
- Strussmann, C. A., P. Renard, H. Ling and F. Takashima, 1994. Motility of pejerrey, *Odontesthes bonariensis* spermatozoa. *Fish. Sci.*, 60(1) : 9-13.
- Truscott, B., D. R. Idler, R. J. Hoyle and H. C. Freeman, 1968. Sub-zero preservation of Atlantic salmon sperm. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 25(2) : 363-372.
- Zar, J. H., 1984. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall Inc. Englewood Cliffs, N.J. 620 pp.