

## 자주복(*Takifugu rubripes*) 정액의 물리·화학적 성상과 냉동보존 전후 정자의 미세구조<sup>+</sup>

장윤정 · 장영진 · 임한규  
부경대학교 수산과학대학 양식학과

## Physico-chemical Properties of Milt and Fine Structure of Cryopreserved Spermatozoa in Tiger Puffer (*Takifugu rubripes*)<sup>+</sup>

Yun Jeong CHANG, Young Jin CHANG and Han Kyu LIM  
Department of aquaculture, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

Experiments were performed to find out the physico-chemical properties of milt, and morphological changes of cryopreserved spermatozoa in tiger puffer, *Takifugu rubripes*. The average number of sperm and spermatocrit in milt stripped were  $9.81 \pm 0.34 \times 10^{10}/ml$  and  $97.8 \pm 0.8$ , respectively. While total lipid concentration from seminal fluid was higher than that from sperm, total protein concentration from sperm was higher than that from seminal fluid. Na and K concentrations in sperm and those in seminal fluid were similar each other. However, glucose from sperm and seminal fluid were not detectable. Spermatozoon of tiger puffer was consisted of head, middle piece and tail. Size of head showing horseshoe shape was  $0.65 \pm 0.10 \mu m$  in diameter and  $1.35 \pm 0.30 \mu m$  in length. The head fully containing chromatin did not have acrosome. Mitochondrion in middle piece was  $0.2 \mu m$  in average diameter and flagellum showed 9+2 structure. A few of cryopreserved spermatozoa showed morphologically loose or swollen plasma membranes.

**Key words:** tiger puffer, *Takifugu rubripes*, milt property, cryopreservation, sperm, structural change

### 서 론

어류 정자의 냉동보존 기술은 어획현장에서의 인공수 정시 암수를 동시에 구해야 하는 부담을 덜어주며, 산란기 동안 암수의 산란과 방정시 시간적 차이를 보이는 종이나, 자성선숙(protogyny)이나 응성선숙(protandry)으로 인해 암수간의 연령차가 많은 어종의 인공수정을 용이하게 한다. 또한 절멸 위기에 처한 재래종의 보존과 우량형질을 가진 어류의 교잡 및 선발육종을 가능하게 하고, 정자를 간편하게 수송할 수 있게 하며, 질병에 감염된 수컷의 정자를 인공수정에 사용하는 위험부담을 감소시킬 수 있는 등 여러가지 장점을 가지고 있다. 이러한 정자 냉동보존의 장점에도 불구하고, 냉동보존에 관한 최근까지의 연구는 주로 회석액, 동해방지제, 냉동물, 해동용액 및 해동속도에 국한되고 있으며, 냉동보존시 사용되는 회석액의 조성을 결정하는 데에 있어 기초자료로 활용되는 정액의 성상에 관한 연구는 몇몇 담수어류(Linhart et al., 1991; Lahnsteiner et al., 1994)와 turbot, *Scophthalmus maximus* (Suquet et al., 1993)를 비롯한 일부 해수어류에서만 이루어져, 그 연구결과가 미미한

실정이다. 전자현미경을 이용한 어류 정자의 형태에 관한 연구는 280여종에 대해 이루어져 있으나(Mattei, 1991), 냉동보존후 정자의 형태변화에 관한 연구는 greyling, *Thymallus thymallus* (Lahnsteiner et al., 1992) 및 Atlantic croaker, *Micropogonias undulatus* (Gwo and Arnold, 1992) 등의 몇몇 어종에 그치고 있다. 따라서 냉동 전후에 있어서 정자형태의 이상 유무를 비교·분석하기 위한 자료가 부족한 실정이다.

본 연구에서는 해수어류인 자주복, *Takifugu rubripes* 정자의 효과적인 냉동보존을 위한 기초자료를 얻고자 정액의 물리·화학적 성상을 파악하고 냉동보존 전후 정자의 미세구조를 조사하였다.

### 재료 및 방법

실험에 사용한 자주복 수컷 어미는 수조사육한 2~3년 생 5마리로서, 전장 43.5~45.1 cm, 체중 1.7~2.0 kg이었다. 어체로부터 정액을 채취하기 위하여 실험어를 3-aminobenzoic acid ethyl ester (MS-222) 200 ppm에 마취시킨 후, 비뇨생식공 주위를 가볍게 눌러 오줌과 배설물을

<sup>+</sup> 이 논문은 1996년도 농림부 농림수산특정연구사업(현장으로기술개발) 연구결과의 일부임.

미리 제거하였다. 이후 가제로 비노생식공을 깨끗이 닦은 다음, 복부를 부드럽게 압박하여 채정하였다. 채취된 정액은 시험관에 넣어 밀봉한 후 얼음을 채운 ice box에서 보관하였으며, 채정후 1시간 이내에 사용하였다. 정액은 7일 간격으로 3회 채취하였으며, 채취된 정액의 물리적 성상은 개체별로 조사하여 평균을 구하였고, 화학적 성상은 각 개체의 정액을 pooled하여 측정하였다. 정자의 농도는 2% eosin 용액으로 정자를 염색한 다음, 광학현미경 아래에서 혈구계산판에 의해 계수하였으며, spermaticrit는 일반적인 혈액분석 방법인 microhematocrit법을 변형하여 측정하였다(Bouck and Jacobson, 1976). 정액을 원심분리(15,000 rpm, 10분)하여 얻은 정장의 삼투질농도와 pH는 각각 삼투질농도측정기(The Advanced™ Osmometer)와 pH측정기(pH/Ion Meter EP-880)를 사용하여 분석하였다. 정액을 원심분리하여 얻은 정자와 정장의 총 단백질, 총 지질 및 glucose 함량은 각각 biuret반응법, 비색정량법, 효소법으로, Na 및 K 농도는 불꽃분광법으로 분석하였다(由岐, 1984). 정자를 냉동시키기 위하여, 희석액으로 Alsever's solution을, 동해방지제로 ethylene glycol을 사용하여 정액 : 희석액 : 동해방지제의 비율이 0.15 : 0.72 : 0.13으로 되도록 혼합하였다. 이 희석정액이 주입된 0.5 ml 용량의 straw를 액체질소 증기(-76°C)에 의해 천천히 1차 냉동한 다음, 신속히 액체질소(-196°C)에 넣어 2차 냉동하였다(奥村 · 廣瀬, 1991). 냉동된 정자는 액체질소 탱크에 24시간 저장한 후 30 ± 1°C의 항온수조에서 10초 이내에 해동시켰다. 어미로부터 채취한 직후의 신선한 정자와 냉동보존후 해동한 정자의 미세구조를 비교하기 위하여 투과전자현미경(JEM 1200 E-XII, 60~80 Kv, JEOL, Japan)으로 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 정액의 성상

정액과 정액을 원심분리하여 얻은 정장의 물리적 성상은 Table 1과 같다. 정장의 pH와 삼투질농도는 각각 8.2 ± 0.2, 383.4 ± 2.1 mOsm/kg이었다. 자주복 정장의 pH는 turbot의 7.3 (Suquet et al., 1993)과 송어, *Mugil cephalus*의 7.4 (Chao et al., 1975) 보다 높았고, 감성돔, *Acanthopagrus schlegelii*의 8.3 (Chang et al., 1995; Chang, 1997), 대서양연어, *Salmo salar*의 8.3 (Hwang and Idler, 1969), 기수정 어류인 pejerrey, *Odontesthes bonariensis*의 8.3 (Strussmann et al., 1994) 및 잉어과 어류의 8.1~8.5 (Lahnsteiner et al., 1994)와는 비슷한 수준으로 약

**Table 1. Physical properties of milt or seminal fluid of tiger puffer, *Takifugu rubripes***

Property	Origin	Mean ± SD
pH	Seminal fluid	8.2 ± 0.2
Osmolality (mOsm/kg)	Seminal fluid	383.4 ± 2.1
Spermaticrit	Milt	97.8 ± 0.8
Sperm concentration ( $\times 10^{10}/\text{ml}$ )	Milt	9.81 ± 0.34

알카리성을 나타냈다. 해수어류 정장의 삼투질농도는 일반적으로 담수어류 보다 높다. 무지개송어 정장의 삼투질농도는 297 mOsm/kg이고, 금붕어, *Carassius auratus*와 잉어, *Cyprinus carpio*에서는 각각 317, 302 mOsm/kg (Morisawa, 1985), 황복, *Takifugu obscurus*에서는 266 mOsm/kg (장, 1997; Chang, 1997)인 것으로 알려져 있다. 그러나 해수어류인 복섬, *Fugu niphobles*에서는 342 mOsm/kg (Morisawa, 1985), 감성돔에서는 359 mOsm/kg (Morisawa, 1985)과 382 mOsm/kg (Chang et al., 1995; Chang, 1997)인 것으로 나타나, 담수어류에 비해 40~80 mOsm/kg 정도 높다. 담수어류와 해수어류는 혈장 삼투질농도에서도 서로 약간 차이를 나타내는데, 담수어류인 금붕어와 잉어는 각각 266 mOsm/kg과 302 mOsm/kg (Morisawa et al., 1983)으로 해수어류인 감성돔의 342 mOsm/kg (Chang et al., 1995)에 비해 낮은 편이다. 이와 같이 해수어류의 혈장 및 정장의 삼투질농도가 담수어류에 비해 약간 높은 것은 환경수의 삼투질농도와 관련이 있는 것으로 판단된다. 본 연구에서 자주복 정장의 삼투질농도는 383.4 ± 2.1 mOsm/kg로 Morisawa (1985)의 연구결과와 비슷한 수준을 보였다. 채정기간 동안 ml당 정자수는  $8.5 \times 10^{10} \sim 10.1 \times 10^{10}$  (평균  $9.81 \pm 0.34 \times 10^{10}$ )이었으며, 채정기간의 후반에는 정자수가 점차적으로 감소하는 경향을 보였다. 자주복 정액 1 ml당 정자수는 bluefin tuna, *Thunnus thynnus*의  $5.94 \pm 0.72 \times 10^{10}$  (Doi et al., 1982), turbot, *Scophthalmus maximus*의  $3.83 \pm 0.59 \times 10^{10}$  (Suquet et al., 1993) 보다는 많았고, 대서양연어의  $9.5 \pm 3.2 \times 10^{10}$  (Aas et al., 1991)과는 비슷한 수준이었다. 또한 자주복의 spermaticrit는 97.8 ± 0.8로 whitefish, *Coregonus clupeaformis*의 26.6, yellow perch, *Perca flavescens*의 64.7, 무지개송어, *Oncorhynchus mykiss*의 25.8 (Ciereszko and Dabrowski, 1993)에 비해 훨씬 높았다.

정액을 원심분리하여 얻은 정자 및 정장의 화학적 성상은 Table 2와 같다. 총 지질 함량은 정자에 비해 정장에서 높은 값을 보였으나, 총 단백질 함량에 있어서는 정장에 비해 오히려 정자에서 높았다. 그러나 glucose는 정자와 정장 모두에서 검출되지 않았다. 어류 정액에서 정자의 보호역할(Cruca, 1969)을 하는 것으로 추정되는

**Table 2. Chemical properties of sperm and seminal fluid of tiger puffer, *Takifugu rubripes***

Property	Sperm	Seminal fluid
Total protein (g/100 ml)	1.4 (1.4)	0.1~0.2 (0.13)
Total lipid (mg/100 ml)	27~33 (30.0)	82~89 (85.5)
Glucose (mg/100 ml)	ND	ND
Na (mEq/l)	48~49 (48.3)	49~51 (50.0)
K (mEq/l)	47~48 (47.3)	50~51 (50.3)

( ): average, ND: not detectable.

총 단백질 함량은 자주복의 정장에서 0.13 g/100 ml로서 turbot 정장의 0.88 g/100 ml (Suquet et al., 1993)와는 비슷하였으나, Kruger et al. (1984)이 보고한 잉어의 0.13 mg/100 ml 보다는 매우 높았다. 자주복 정액에서는 glucose가 검출되지 않았기 때문에 앞으로 정자와 정액에서의 영양원으로서 다른 당류를 검출해 볼 필요가 있다. Na와 K 함량은 정장과 정자 모두에서 각각 48~51 mEq/l, 47~51 mEq/l로 서로 비슷한 수준이었다.

2. 정자의 미세구조

자주복 정자는 머리, 중편 및 꼬리로 구성되어 있었다. 머리는 말발굽 모양으로 황복 정자와 비슷하였으나, 공모양을 나타내는 송어와 감성돔의 정자와는 형태적 차이를 보였다(장, 1997). 머리의 장경은 1.16~1.92 μm (평균 1.35 ± 0.30 μm)였고, 단경은 0.51~0.74 μm (평균 0.65 ± 0.10 μm)였다. 본 연구에서 냉동전 자주복 정자의 머리는 장경 1.35 ± 0.30 μm로, 1.26 μm인 송어(장 등, 1997), 1.6 μm인 흑연, *Aristichthys nobilis*, 초어, *Ctenopharingodon idella*, 흰줄납줄개, *Rhodens ocellatus* 및 백연, *Hypophthalmichthys molitrix*의 정자와 비슷한 크기였으나(Emeljanova and Makeeva, 1985), 연어과 어류에 비해서는 작았고(Linhart et al., 1991), 복어류 정자 중에서도 작은 편이었다(Miyaki et al., 1993). 치밀한 핵질로 충만한 머리는 그 선단에 첨체구조를 가지지 않았다(Fig. 1A). 두개의 중심소체는 머리 뒤쪽의 함입한 곳에 위치하며, 서로 직각으로 배치되어 있었고, 원단중심소체(distal centriole)는 편모와 연결되어 있었다. 미토콘드리아는 머리의 아래쪽에 붙어 있으며(Fig. 1B), 직경은 0.2 μm 전후이고, 그 갯수는 7개로 7~9개인 잉어, 백연과 비슷한 수준이었으나, 흑연, 흰줄납줄개, stone moroko, *Pseudorasbora parva* (Linhart et al., 1991)에 비해서 많았다. 편모는 전형적인 9+2 구조를 나타내는 1쌍의 중심소관과 9쌍의 미소관으로 구성되어 있었다(Fig. 1C). 그러나 유럽산 뱀장어, *Anguilla anguilla* (Linhart et al., 1991)에서는 9+0 구조를 나타내는 수도 있다.

냉동보존후 해동한 정자는 평균 생존율 72.0 ± 2.9%로

서 활발한 운동성을 나타냈으며, 대부분이 신선한 정자의 구조와 차이를 보이지 않았으나, 동해를 입은 소수의 정자에서는 편모(Fig. 2A)와 머리 주변의 세포막이 이탈되어 있었다(Fig. 2B). 정자가 동해를 입는 경우에 편모의 응축, 9+2 구조의 축사꼬임, 미토콘드리아 및 세포막 파괴, 미토콘드리아의 탈락 등의 변화가 나타나는 것으로 알려져 있다(Gwo and Arnold, 1992; Lahnsteiner et al., 1992). Gwo and Arnold (1992)는 이러한 정자형태의 변화들은 해동후 정자의 운동성을 감소시키는 주된 원인이라고 하였다. 이와 같은 해동후 일부 정자의 형태 변화가 정자의 운동성 및 알과의 수정에 어떠한 영향을 미치는지에 관하여 보다 면밀한 연구가 필요하다.

참 고 문 헌

Aas, G.H., T. Refstie and B. Gjerde. 1991. Evaluation of milt quality of Atlantic salmon. *Aquaculture*, 95, 125~132.

Bouck, G.R. and J. Jacobson. 1976. Estimation of salmonid sperm concentration by microhematocrit technique. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 105, 534~535.

Chang, Y.J. 1997. Present and future studies on the cryopreservation of fish gametes. *Suisanzoshoku*, 45, 557~564.

Chang, Y.J., H.K. Lim and K.H. Kho. 1995. Properties of semen and sperm motility in black seabream, *Acanthopagrus schlegeli*. *J. Aquaculture*, 8, 149~157. (in Korean)

Chao, N.H., H.P. Chen and I.C. Liao. 1975. Study on cryogenic preservation of grey mullet sperm. *Aquaculture*, 5, 389~406.

Ciereszko, A. and K. Dabrowski. 1993. Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique. *Aquaculture*, 109, 367~373.

Cruea, D.D. 1969. Some chemical and physical characteristics of fish sperm. *Trans. Ame. Fish. Soc.*, 4, 785~788.

Doi, M., T. Hoshino, Y. Taki and Y. Ogasawara. 1982. Activity of the sperm of the bluefin tuna, *Thunnus thynnus* under fresh and preserved conditions. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 48, 495~498.

Emeljanova, N.G. and A.P. Makeeva. 1985. The ultrastructure of spermatozoa in some cyprinid fishes (Cyprinidae). *Voprosy Ichtiol.*, 25, 461~468.

Gwo, J.C. and C.R. Arnold. 1992. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa: evaluation of morphological changes. *J. Exp. Zool.*, 264, 444~453.

Hwang, P.C. and D.R. Idler. 1969. A study of major cations, osmotic pressure and pH in seminal components of Atlantic salmon. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 26, 413~419.

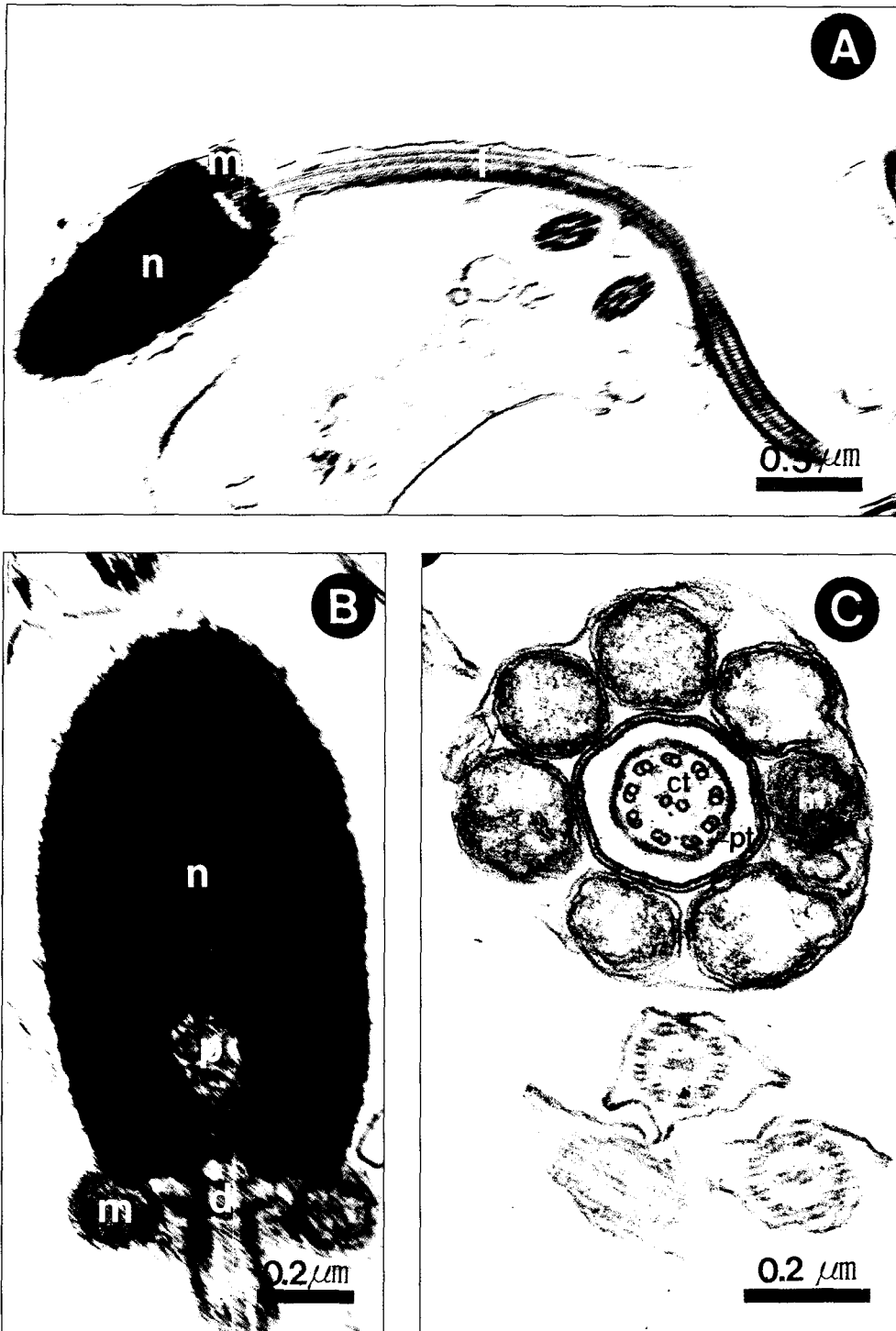


Fig. 1. *Takifugu rubripes*. Electron micrographs of unfrozen spermatozoa. A: Sagittal section of spermatozoon showing head with compact chromatin, mitochondria and flagellum. B: Sagittal section of head showing proximal centriole and distal centriole. C: Cross section of middle piece showing a flagellum surrounded by seven mitochondria. Note the 9+2 pattern of flagellum. ct: central microtubules, d: distal centriole, f: flagellum, m: mitochondrion, n: nucleus, p: proximal centriole, pt: peripheral microtubules.

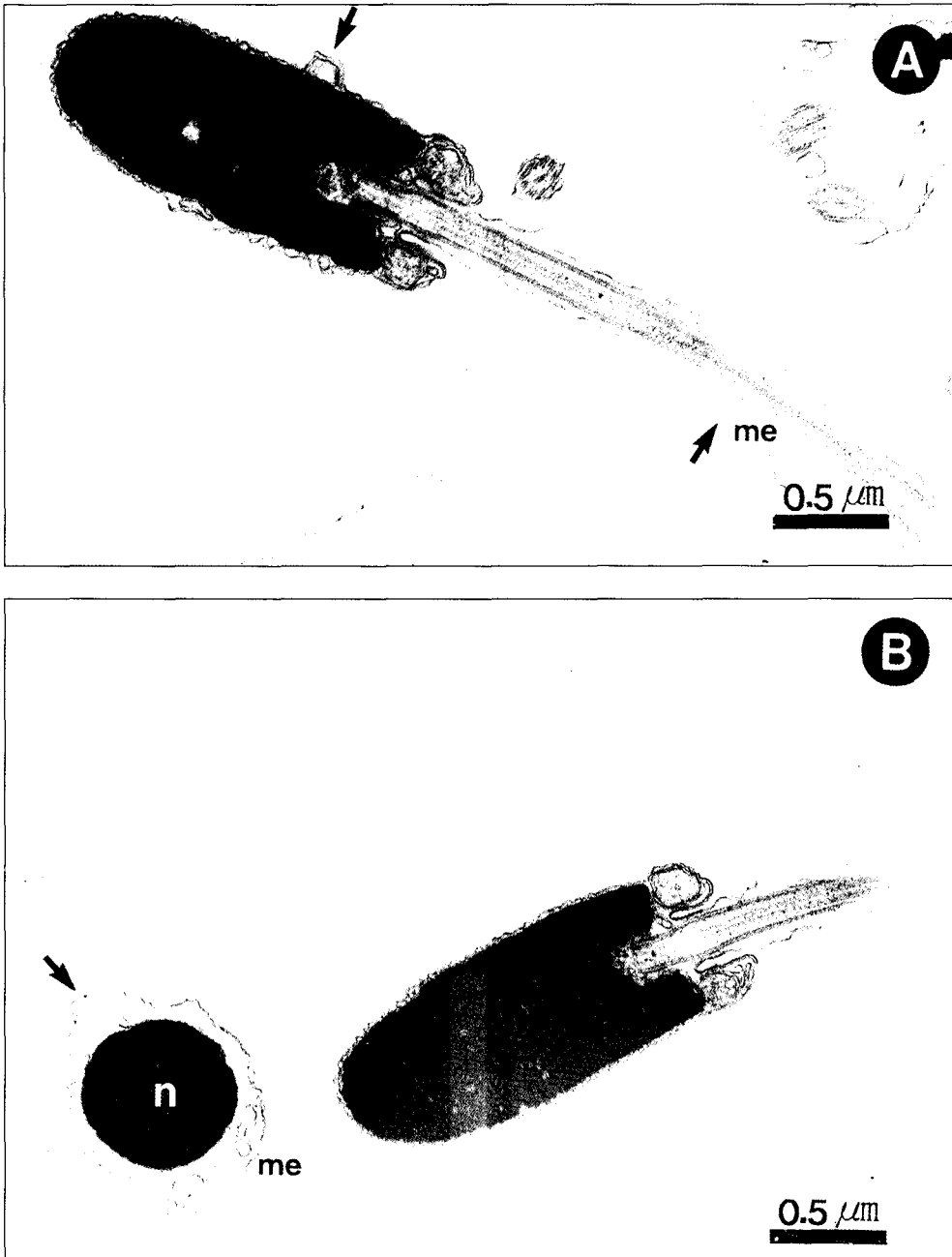


Fig. 2 *Takifugu rubripes*. Electron micrographs of a few of cryopreserved spermatozoa. A: Sagittal section of a spermatozoon, B: Cross and sagittal sections of spermatozoa head. me: plasma membrane, n: nucleus. Arrows: Damaged plasma membranes.

Kruger, J.C. De W., G.L. Smit, J.H.J. Van Vuren and J.T. Ferreira. 1984. Some chemical and physical characteristics of the semen of *Cyprinus carpio* L. and *Oreochromis mossambicus* (Peters). *J. Fish. Biol.*, 24, 263~272.

Lahnsteiner, F., R.A. Patzner and T. Weismann. 1994. The testicular main ducts and the spermatic ducts in

some cyprinid fishes. II. Composition of the seminal fluid. *J. Fish Biol.*, 44, 459~467.

Lahnsteiner, F., T. Weismann and R.A. Patzner. 1992. Fine structural changes in spermatozoa of the grayling, *Thymallus thymallus* (Pisces: Teleostei), during routine cryopreservation. *Aquaculture*, 103, 73~84.

- Linhart, O., V. Slechta and T. Slavik. 1991. Fish sperm composition and biochemistry. *Bull. Inst. Zool., Academia Sinica, Monograph*, 16, 285~311.
- Mattei, X. 1991. Spermatozoa ultrastructure and its systematic implications in fishes. *Can. J. Zool.*, 69, 3038~3055.
- Miyaki, K., K. Yoshikoshi and O. Tabeta. 1993. Scanning electron microscopic observation on cryopreserved spermatozoa in six species of puffer fishes. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59, 891.
- Morisawa, M. 1985. Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleosts. *Zool. Sci.*, 2, 605~615.
- Morisawa, M., K. Suzuki, H. Shimizu, S. Morisawa and K. Yasuda. 1983. Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. *J. Exp. Biol.*, 107, 95~103.
- Strussmann, C.A., P. Renard, H. Ling and F. Takashima. 1994. Motility of pejerrey, *Odontesthes bonariensis* spermatozoa. *Fish. Sci.*, 60, 9~13.
- Suquet, M., G. Dorange, M.H. Omnes, Y. Normant, A. Le-Roux and C. Jauvel. 1993. Composition of the seminal fluid and ultrastructure of the spermatozoa of turbot (*Scophthalmus maximus*). *J. Fish Biol.*, 42, 509~516.
- 奥村重信, 廣瀬慶二. 1991. 凍結保存精子によるアカアマダイの人工受精. *水産増殖*, 39, 441~445.
- 由岐英剛. 1984. 生化学分析法. 南江堂, 東京, 496 pp.
- 장영진. 1997. 해산어류 5종의 정액의 특성과 장·단기 보존. 1997년도 한국양식학회 추계 학술발표대회 요지집, pp. 41~42.
- 장영진, 최윤희, 임한규, 고강희. 1997. 송어, *Mugil cephalus* 정자의 활성과 보존. 1997년도 추계 수산관련 공동학술대회 발표요지집, pp. 115~116.

---

1997년 12월 29일 접수

1998년 5월 4일 수리