

## 황복(*Takifugu obscurus*) 정자의 냉동보존 및 해동정자의 수정능력

장영진 · 임한규 · 장윤정 · 김형선\*

부경대학교 양식학과

\*한국해양연구소

## Sperm Cryopreservation and Fertility of Post-thaw Sperm in River Puffer, *Takifugu obscurus*

Young Jin Chang, Han Kyu Lim, Yun Jeong Chang and Hyung Sun Kim\*

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

\*Korea Ocean Research and Development Institute, Ansan, P.O. Box 29, Ansan 425-600, Korea

To obtain fundamental data for sperm cryopreservation in river puffer (*Takifugu obscurus*), the proper conditions of cryopreservation were investigated. In the sperm cryopreservation of river puffer, marine fish Ringer's solution (MFRS) was found to be good diluent and dimethyl sulfoxide (DMSO) was proved to be superior to glycerol as a cryoprotectant. The highest fertilization rate was achieved when river puffer sperms were cryopreserved with MFRS adding 5% DMSO.

Key words : River puffer, *Takifugu obscurus*, Sperm, Cryopreservation, Fertility

### 서 론

최근 해수어류 양식산업에서는 그 생산량의 대부분을 차지하고 있는 넙치, 조피볼락 이외에 품종의 다양화를 위한 새로운 양식 대상종의 개발과 지역 특산어종의 양식 개발이 요구되고 있다. 우리나라의 지역 특산어종중에서 하천에 소생하여 산란하는 습성 때문에 자연 자원량이 남획에 의해 급격히 감소하고 있는 황복(*Takifugu obscurus*)은 고소득 양식대상 어종으로 관심을 끌고 있다. 황복이 양식 대상종이 되기 위해서는 인공 종묘의 확보가 우선되어야 하며, 이러한 종묘는 양질의 알과 정자의 획득에서 비롯된다. 그러나 황복에서는 아직까지 인위적인 어미사육이 이루어지지 않고 있는 실정이므로, 이러한 양질의 배우자를 얻는 데 어려움이 많다. 따라서 이를 해결하기

위한 방법의 하나로서 배우자 보존 방법인 정자의 냉동보존이 필요하다.

정자의 장기보존 방법인 냉동보존에 관한 연구는 1866년에 Mantegazza가 인간의 정자를 -17℃에서 냉동했다가 해동시켰을 때 생존하였다는 보고(森澤·星, 1994) 이후, 꾸준히 진행되어 왔다. 이러한 연구 결과들을 바탕으로 의학이나 축산업에서는 이미 냉동정자의 사용이 일반화되었고, sperm bank도 구축되어져 있다. 수산업에서는 1949년 Blaxter (1953)가 반년간 냉동보존했던 청어 정액으로 인공수정에 성공한 이후, 많은 연구자들에 의해 정자 냉동보존에 관한 연구가 이루어져 오고 있다. 그러나 의학이나 축산업과는 달리 냉동보존된 정자의 사용이 수산업에서는 아직 일반화되어 있지 않으며 이에 관한 연구도 연어과 어류 등의 몇몇 어류에 한정되어 이루어지

고 있는 등 아직 초보적 단계에 있는 실정이다. 따라서 이 연구에서는 양식개발 신품종으로 대두되고 있는 황복의 정자 냉동보존 기술개발을 위한 기초자료를 얻고자 하였다.

### 재료 및 방법

실험어로는 산란기인 5월중에 임진강에서 어획된 황복 어미를 사용하였다(Table 1).

**Table 1. Measurement of the fish used for this experiment**

	Total length (cm)	Body weight (g)
Male	30.5~33.5 (31.5)*	510~615 (580)
Female	33.0~35.0 (34.2)	710~850 (740)

\*average

어체로부터 정액을 채취하기 위하여 실험어를 3-aminobenzoic acid ethyl ester (MS-222) 200 ppm에 마취시킨 후, 비노생식공 주위를 눌러 오줌과 배설물을 미리 제거한 다음, 복부를 압박하여 채정하였다. 채취된 정액은 시험관에 넣어 밀봉한 후 냉동보존 실험에 사용하기 전까지 얼음을 채운 ice box에서 보관하였다. 수정에 이용된 알은 충분히 성숙한 어미의 배를 부드럽게 압박하여 배란된 알을 채취하였으며, 이때 피가 섞여 나오지 않은 알만을 선별하여 즉시 사용하였다.

희석액에 따른 정자의 냉동보존 효과를 조사하기 위하여, Table 2와 같은 조성의 Alsever's solution, egg-tris, 5% glucose 및 해수어류 생리 식염수(marine fish Ringer's solution, MFRS)를 희석액으로 사용하였고, 동해방지제로는 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 최종농도 15%가 되도록 첨가하였다. 희석은 정액 : 희석액 : DMSO = 0.2 : 0.65 : 0.15의 비율로 하였으며 평형시간은 1분 이내로 하여 냉동하였다.

정자의 냉동보존에 적합한 동해방지제의 종류와 농도를 결정하기 위하여, 정액과 희석액의 비율이 1:3이 되도록 정액에 5% glucose를 첨가한

**Table 2. Constituents of diluents tested for cryopreservation of river puffer sperm**

Diluent	Constituent
Alsever's solution	2.05 g glucose, 0.4 g sodium chloride, 0.8 g sodium citrate/DW 100 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/DW 80 ml
5% glucose	5 g glucose/DW 100 ml
MFRS	0.346 g CaCl <sub>2</sub> , 0.597 g KCl, 0.017 g MgCl <sub>2</sub> , 13.5 g NaCl, 0.025 g NaHCO <sub>3</sub> /DW 1,000 ml

DW: distilled water, MFRS: marine fish Ringer's solution

후, DMSO와 glycerol을 각각 최종농도가 5, 10, 15, 20%가 되도록 혼합하여 평형시간을 1분 이내로 하여 냉동하였다.

적합한 보존조건을 결정하기 위하여 여러 가지 희석액 중 보존효과가 좋았던 MFRS를 희석액으로 하고 동해방지제인 DMSO의 농도를 달리하여 첨가한 후, 평형시간을 1분 이내로 하여 냉동하였다.

전술한 각 실험에서의 정자 냉동을 위하여 희석정액이 주입된 0.5 ml 용량의 소 정자보존용 straw를 액체질소 증기(-76℃)에 의해 천천히 1차 냉동한 다음, 신속히 액체질소(-196℃)에 넣어 2차 냉동하였다(奥村·廣瀨, 1991). 냉동된 정자는 액체질소 탱크에 15일간 저장한 후 30±0.5℃의 항온수조에서 10초 이내에 해동시켰다.

보존정자의 알에 대한 수정은 건식법으로 3회 실시하였으며, 수정 후 낭배기로 발생이 진행된 배의 수를 계수하여 수정률을 구하였다.

실험 데이터는 ANOVA를 실시하고, 최소 유의차 검정(LSD)으로 평균간의 유의한 차이 여부를 조사하였다.

**결 과**

정자의 냉동보존에 적합한 동해방지제의 종류와 농도를 결정하기 위하여, 5% glucose를 희석액으로 하고 동해방지제의 종류와 농도를 달리하여 정액과 혼합하고 냉동한 후 해동한 정자의 수정률은 Table 3과 같다. 동해방지제인 DMSO를 최종농도가 5%가 되도록 첨가하였을 때, 수정률은  $28.3 \pm 3.3\%$ 로 대조구의  $61.7 \pm 3.3\%$  보다는 낮았지만, 다른 농도에 비해서는 유의하게 높았다 ( $P < 0.05$ ). 한편, glycerol을 동해방지제로 사용하였을 때 모든 농도에서 해동정자는 0.0~2.7%의 낮은 수정률을 보여 DMSO에 비해 동해방지제로서의 효과가 떨어지는 것으로 나타났다.

정액을 여러 가지 희석액과 혼합하고 각 혼합액에 15% DMSO를 동해방지제로 각각 첨가하여 15일간 냉동보존한 다음, 해동시킨 정자를 알과 수정시킨 결과는 Fig. 1과 같다. 희석액으로 MFRS를 사용하였을 때, 해동정자의 수정률은  $24.6 \pm 4.1\%$ 로 나타나 다른 희석액에 비해서는 유의하게 높았으나 ( $P < 0.05$ ), 대조구의  $61.7 \pm 3.3\%$ 에 비해서는 낮은 값이었다. 나머지 희석액의 수정률은 0~5.1%로 매우 낮았다.

여러 가지 희석액 중 보존효과가 가장 좋았던 MFRS를 희석액으로 사용하고 동해방지제인 DMSO를 농도별로 첨가한 후 정자를 냉동보존하였을 때, 해동정자의 수정률은 Fig. 2와 같다. 전체적으로 DMSO의 농도가 증가할수록 해동정자의

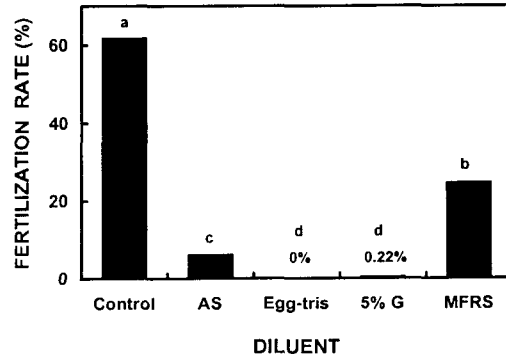


Fig. 1. Post-thaw fertility of river puffer sperm cryopreserved with various diluents. AS: Alsever's solution, G: glucose, MFRS: marine fish Ringer's solution.

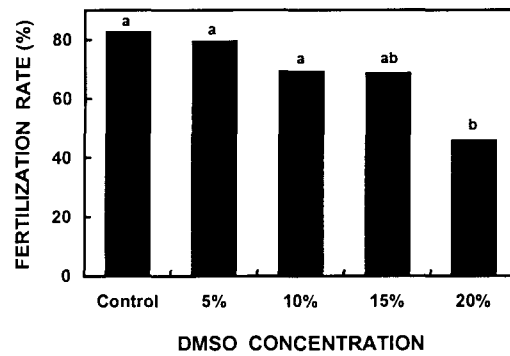


Fig. 2. Post-thaw fertility of river puffer sperm cryopreserved with various concentrations of dimethyl sulfoxide (DMSO).

Table 3. Effects of different concentrations of two cryoprotectants on post-thaw fertility of puffer sperm cryopreserved at  $-196^{\circ}\text{C}$  for 15 days

Cryoprotectant	Diluent	Concentration (%)	Fertilization rate (%)
Unfrozen milt	-	-	$61.7 \pm 3.3^a$
		5	$28.3 \pm 3.3^b$
		10	$0.7 \pm 1.2^{cd}$
		15	$1.0 \pm 1.4^{cd}$
		20	$0.6 \pm 0.9^{cd}$
DMSO	5% glucose	5	$0.0 \pm 0.0^d$
		10	$0.2 \pm 0.5^d$
		15	$0.2 \pm 0.5^d$
		20	$2.7 \pm 1.7^c$
		20	$2.7 \pm 1.7^c$

수정률이 감소하는 경향을 나타냈다. DMSO를 최종농도가 5~15%가 되도록 혼합하여 냉동하였을 때, 수정률은 79.3~68.7%로 다른 농도에 비해 보존효과가 좋았으며, 대조구의 82.5%와도 유의차가 없었다( $P>0.05$ ). 그러나, DMSO를 최종농도가 20%가 되도록 첨가하였을 때는 수정률이 유의하게 낮아져( $P<0.05$ ) 보존효과가 떨어지는 것으로 나타났다.

## 고 찰

정자를 냉동보존하는 데 있어 중요한 조건 중의 하나는 희석액이다. 어류 정자보존을 위한 희석액은 희석시 정자가 삼투압 자극에 의해 활성화되는 것을 방지하기 위해 삼투질농도가 정장과 유사하여야 하며, 그 조성도 정장의 유기화합물이나 이온 조성과 비슷한 것이어야 한다(Jamieson, 1991). 황복 정자의 냉동보존에서는 MFRS가 적합한 희석액이었으나, northern pike, *Esox lucius*에서는 Erdahl · Graham의 희석액에 난황을 첨가한 것이 해동 후 운동성과 수정률이 높았으며(Babiak et al., 1995), 잉어, *Cyprinus carpio*에서는 Kurokura의 희석액에 난황을 첨가한 것이 보존효과가 좋은 것으로 나타났다(Babiak et al., 1997). 또한 일반적으로 해수어류의 정자를 보존하는 데는 간단한 조성의 희석액을 주로 많이 이용하나, 연어과 어류의 정자는 희석액의 조성에 대해 매우 민감하게 반응하는 것으로 알려져 있다(Kurokura and Hirano, 1980). 이처럼 어종마다 보존에 적합한 희석액이 다른 것은 정장 조성의 차이에서 기인하는 것으로 생각된다.

정자의 냉동보존을 위해 필요한 여러 가지 요인 중 가장 중요한 것은 정자가 동해를 입는 것을 방지해 주는 동해방지제라 할 수 있다. 이러한 동해방지제는 친수성이어야 하고 세포막에 대한 투과성이 높아야 하며, 정자에 대한 독성이 낮아야 한다(Jamieson, 1991). 황복에서는 동해방지제로 5% DMSO를 사용하였을 때, 해동정자의 수정률이  $28.3 \pm 3.3\%$ 로 glycerol이나 다른 농도의 DMSO

를 사용하였을 때에 비해 보존효과가 좋았다. Barramundi, *Lates calcarifer*에서도 5% DMSO를 동해방지제로 사용하는 것이 보존효과가 가장 좋았으며, 그 이상의 농도에서는 해동 후 운동성이 감소하는 것으로 보고(Leung, 1987)되어, 황복과 동일한 경향을 보였다. DMSO는 세포내로의 투과속도가 빠르고, 세포막을 투과할 때 온도에 의해 영향을 받지 않기 때문에, glycerol이나 methanol과 같은 다른 동해방지제에 비해 널리 사용되며(Jamieson, 1991), cobia, *Rachycentron canadum* (Caylor et al., 1994)와 yellow perch, *Perca flavescens* (Ciereszko et al., 1993)에서는 다른 동해방지제에 비해 냉동보존 효과가 좋은 것으로 알려져 있다. DMSO와 함께 널리 이용되고 있는 다른 동해방지제로서 glycerol을 들 수 있다. Glycerol은 DMSO에 비해 독성이 약하고(Jamieson, 1991), 몇몇 담수어류의 정장에서도 검출되었으며(Piironen and Hyvarinen, 1983), yellowfin seabream, *Acanthopagurus australis* (Thorogood and Blackshaw, 1992), Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (Bolla et al., 1987) 및 sharptooth catfish, *Clarias gariepinus* (Steyn and Van Vuren, 1987) 등의 어종에서는 glycerol이 정자를 냉동보존하는 데 효율적인 동해방지제인 것으로 보고되어 있다. 그러나 황복에서는 glycerol이 정자의 냉동보존을 위한 동해방지제로 부적합하였는데, 이러한 경향은 연어과 어류(Piironen, 1993)와 grouper, *Epinephelus tauvina* (Gwo, 1994)에서도 보고된 바 있다. 또한, DMSO를 20%이상의 농도로 첨가하였을 때, 해동 후 수정률이 감소하는 등 악영향이 나타나는 것으로 알려져 있는데(Stoss and Holtz, 1983), 황복에서도 DMSO를 20%의 농도로 첨가하였을 때 수정률이 유의하게 낮아져, 이러한 사실과 일치하는 경향을 보였다. 이처럼 어종마다 적합한 동해방지제의 종류와 농도는 차이가 있으므로, 어류 정자를 냉동보존하고자 할 때는 어종별로 적합한 동해방지제의 개발에 충분한 연구가 뒤따라야 한다.

본 연구에서 황복 정자의 냉동보존시 MFRS를

희석액으로 하고 동해방지제로 5% DMSO를 사용하였을 때, 수정률이 79.3±7.5%로 보존효과가 가장 좋았으며, 대조구의 82.5±2.5%와도 유의차가 인정되지 않았다. 그러나 보다 효율적인 정자의 냉동보존을 위해서는 희석액, 희석비율, 냉동률, 평형시간 및 해동온도 등과 같은 냉동보존 조건에 관한 세밀한 연구가 이루어져야 할 것이다.

## 요 약

황복(*Takifugu obscurus*) 정자의 냉동보존을 위한 기초자료를 얻고자, 냉동보존 조건에 관한 연구를 수행하였다. 황복 정자의 냉동보존을 위한 희석액으로는 다른 여러 가지 희석액에 비해 MFRS가 가장 적합하였으며, 동해방지제로는 DMSO가 glycerol에 비해 효과가 좋은 것으로 나타났다. MFRS를 희석액으로 하고 동해방지제인 DMSO를 최종농도가 5%되도록 첨가하여 정자를 냉동보존하였을 때, 해동정자의 수정률은 74.3±7.5%로 가장 보존효과가 좋았다.

## 참 고 문 헌

- Babiak, I., J. Glogowski, M. J. Luczynski, D. Kucharczyk and M. Luczynski, 1995. Cryopreservation of the milt of the northern pike. *J. Fish Biol.*, 46 : 819~828.
- Babiak, J., J. Glogowski, E. Brzuska, J. Szumiec and J. Adamek, 1997. Cryopreservation of sperm of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquacult. Res.*, 28 : 567~571.
- Blaxter, J. H. S., 1953. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature*, 172 : 1189~1190.
- Bolla, S., I. Holmefjord and T. Refstie, 1987. Cryogenic preservation of Atlantic halibut sperm. *Aquaculture*, 65 : 371~374.
- Caylor, R. E., P. M. Biesiot and J. S. Franks, 1994. Culture of cobia (*Rachycentron canadum*) : cryopreservation of sperm and induced spawning. *Aquaculture*, 125 : 81~92.
- 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.
- Gwo, J. C., 1994. Cryopreservation of yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*) spermatozoa. *Theriogenology*, 41 : 989~1004.
- Jamieson, B. G. M., 1991. Fish evolution and systematics : Evidence from spermatozoa. Cambridge University Press, New York, pp. 319.
- Kurokura, H. and R. Hirano, 1980. Cryopreservation of rainbow trout sperm. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 46 : 1493~1495.
- Leung, L. K. P., 1987. Cryopreservation of the spermatozoa of the Barramundi, *Lates niloticus* (Teleostei: Centropomidae). *Aquaculture*, 64 : 243~247.
- Piironen, J., 1993. Cryopreservation of sperm from brown trout (*Salmo trutta m. lacustris* L.) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Aquaculture*, 116 : 275~285.
- Piironen, J. and H. Hyvarinen, 1983. Composition of the milt of some teleost species. *J. Fish Biol.*, 17 : 707~739.
- Steyn, G. J. and J. H. J. Van Vuren, 1987. The fertilizing capacity of cryopreserved sharp-tooth catfish (*Clarias gariepinus*) sperm. *Aquaculture*, 63 : 187~193.
- Stoss, J. and W. Holtz, 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 osmolality of the thawing solution. *Aquaculture*, 32 : 321~330.
- Thorogood, J. and A. Blackshaw, 1992. Factors affecting the activation, motility and cryopreservation of the spermatozoa of the yellowfin bream, *Acanthopagrus australis* (Günther). *Aquacult. Fish. Manag.*, 23 : 337~344.
- 森澤正昭・星元紀, 1994. 精子學. 東京大學出版會. 東京. pp. 350.
- 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.