

숭어(*Mugil cephalus*) 정자의 냉장·냉동보존

장영진·최윤희·임한규*·고강희**

부경대학교 양식학과

*국립수산진흥원 울진수산종묘배양장

**동경대학교 이학부

Gold Storage and Cryopreservation of Grey Mullet (*Mugil cephalus*) Sperm

Young Jin Chang, Youn Hee Choi, Han Kyu Lim* and Kang Hee Kho*

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

*Uljin Hatchery, National Fisheries Research and Development Institute, Uljin 767-860, Korea

**School of Science, The University of Tokyo, Tokyo 113, Japan

Experiments were performed to study the activity and fertility of grey mullet (*Mugil cephalus*) sperm after the courses of cold storage and cryopreservation.

The head of spermatozoon showing spherical shape was sized $1.26 \pm 0.08 \mu\text{m}$ in diameter and its nucleus contained numerous granular chromatin. Flagellum of tail showed typical 9+2 structure. Preservation of grey mullet sperm was the most effective when it was stored with serum of the same species at 0°C and sperm activity index was similar in egg-tris, 0.1 M, 0.3 M and 0.5 M glucose. When grey mullet sperm were cryopreserved in MFRS as diluent with 10% dimethyl sulfoxide was effective compared with other diluents. Some of post-thawed spermatozoa showed the enlarged head and ruptured plasma membrane compared with unfrozen spermatozoa.

Key words : Grey mullet, *Mugil cephalus*, Sperm, Cold storage, Cryopreservation

서론

1853년 De Quatrefages에 의해 어류 정자활성에 관한 연구가 보고된 이래, 어류 배우자의 보존은 수산과학자들에게 주된 관심대상이 되어왔다. 특히 정자보존에 관한 초기 연구에서는 비보존 상태에서 정자의 생존력을 연장시키는 데 주안점을 두었으나, 1953년 Blaxter에 의해 청어 정자의 냉동보존이 성공적으로 이루어짐으로써, 이 성과를 유용어류 종묘생산에 접목시키기 위한 연구의 필요성이 부각되었다. 따라서 최근에는 냉동 정

자의 생존력을 유지하기 위해, 다양한 동해방지제, 희석액, 평형시간, 항생제 사용, 냉동률, 해동률, 해동 후 정자의 미세구조, 활성, 생존율, 수정률, 기형률 등 보다 세밀한 연구가 진행되고 있다 (Chao et al., 1992; Erdahl et al., 1984; Gwo, 1994; Gwo et al., 1991; Gwo and Arnold, 1992). 어류 정자의 냉동보존은 양식산업에서 가장 성공적으로 적용된 하나의 방법으로서, 산란기 중 암수의 산란 및 방정의 시간적 차이에서 비롯되는 인공수정의 어려움과 암수 성비의 불균형에 의한 시·공간적인 인공수정의 어려움을 해결할 수 있다.

*이 논문은 1996년도 농림부 농립수산특정연구사업(현장애로기술개발) 연구결과의 일부임.

능성어와 같이 암컷이 먼저 성숙하는 자성선속형(protogyny) 어류나 감성돔과 같이 수컷이 먼저 성숙하는 웅성선속형(protandry) 어류의 배우자를 동시에 구할 수가 있으며, 종간의 교잡이나 종내의 선발육종이 편리하다. 또한 앞으로 알의 보존이 가능해진다면, 쏘가리, 산천어, 열목어와 같은 절멸위기에 있는 재래종이나 희귀종의 배우자 보존을 통하여 유전자원의 소멸을 방지하고, 우량종의 선택교배나 인공 종묘생산시 겪게되는 여러가지 어려움을 해결할 수 있다(장 등, 1997).

본 연구에서는 수온과 염분 등의 환경변화에 대한 적응력이 강하여 세계적인 양식어종으로 부각되고 있으면서도, 최근까지 자연산란이 이루어지지 않아 인공 종묘생산에 어려움을 겪고 있는 송어(*Mugil cephalus*)를 재료로 정액의 냉장·냉동 보존방법에 대한 실험을 실시하여 안정적인 종묘생산에 대한 기초자료를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

실험에 이용한 어미는 목포 근해와 강화도에서 어획한 송어으로써, 실험어의 전장은 47.4 ± 5.5 cm, 체중은 $1,182 \pm 332$ g이었다. 정액은 비뇨생식공 주위를 가법계 눌러 오줌과 배설물을 미리 제거한 후 마른 가아제로 비뇨생식공 주위를 깨끗이 닦은 다음, 복부 압박법으로 채취하여 시험관에 넣어 밀봉한 후, 실험에 사용하기 전까지 얼음을 채운 ice box에 보관하였다.

송어 정액의 냉장보존에 적합한 희석액을 찾기 위해 송어 혈청, egg-tris, 해수어류 생리식염수(MFRS¹), Alsever's solution², 0.1 M, 0.3 M, 0.5 M glucose, lactose, 0.1 M, 0.2 M, 0.3 M sodium citrate 등의 11가지 희석액을 정액과 2:1의 비율로 섞은 후, 희석정액별로 6 ml vial(\varnothing 1.1 cm)에 분주하였다. 분주가 완료된 희석정액은 0℃에서 보존하면서, 1일 간격으로 정자의 운동성을 조사하였다. 냉장보존 후 정자의 운동성을 파악하기

위하여 장 등(1997)의 방법을 사용하여 정자활성지수(sperm activity index, SAI)를 조사하였다(Table 1).

희석액에 따른 정자의 냉동보존 효과를 조사하기 위한 실험에서는 희석액으로 MFRS, 0.3 M glucose, 0.15 M sodium citrate를, 동해방지제로 10% dimethyl sulfoxide (DMSO)를 사용하였다. 정액:희석액:DMSO는 0.2:0.7:0.1의 비율로 혼합하였으며 평형시간은 1분 이내로 하여 straw법으로 액체질소(-196℃)에 1일간 보존한 후, 30 ± 1 ℃의 항온수조에서 10초 이내에 해동하여 냉동보존 효과를 파악하였다. 해동시킨 정자로 수정후 난발생과정을 조사하기 위하여 신선한 비보존 정자와 함께 송어의 산란기에 어획현장에서 얻어진 배란 직후의 알을 사용하여 수정시켰다.

송어 정자의 일반적 구조와 냉동·해동과정에서 받는 물리적 손상 여부는 투과전자현미경(JEM 1200 E-XII, 60~80 Kv, JEOL, Japan)을 이용하여 조사하였다.

결 과

비보존 정자는 공모양의 머리를 가지고 있었으며, 직경 1.26 ± 0.08 μ m, 길이 1.06 ± 0.07 μ m였다. 첨체를 가지지 않은 머리의 핵은 과립상의 염색질로 채워져 있었다(Fig. 1). 미토콘드리아는 공모양으로 머리의 뒤끝에 위치하며 편모는 1쌍의 중심소관과 9쌍의 미소관으로 구성된 전형적인 9+2 구조였다(Fig. 1).

정자의 냉장보존시 희석액별 보존 1일 후 SAI는 원정액과 Alsever's solution에서 2.5와 2.2로 비교적 활발한 운동성을 보였고, 0.3 M sodium citrate에서는 0.3으로 운동성이 가장 저조하였다. 그후 보존 3일째까지 모든 희석액에서 SAI가 급격히 떨어져서 MFRS와 Alsever's solution에서 1.2였고, 0.1 M sodium citrate에서는 0.4로 가장 낮았다. 보존 4일째부터는 SAI가 완만하게 감소

¹NaCl 1.35 g+KCl 0.06 g+NaHCO₃ 0.002 g+CaCl₂ 0.025 g+MgCl₂ 0.035 g+증류수 100 ml

²Na₃C₆H₅O₇·2H₂O 0.8 g+glucose 2.05 g+NaCl 0.4 g+증류수 100 ml

Table 1. Numerical index for the evaluation of sperm motility

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

SAI = score × % motile spermatozoa/100

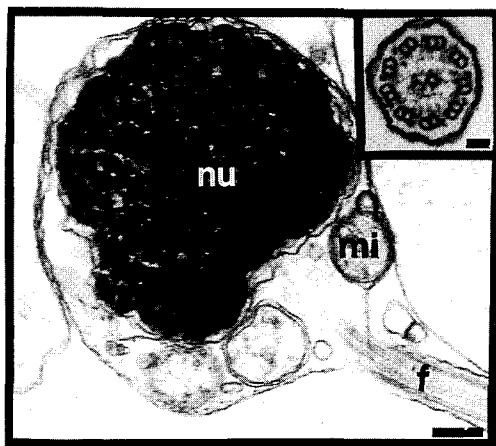


Fig. 1. Electron micrograph of unfrozen spermatozoon in *Mugil cephalus*. An insert indicates the cross section of tail showing a flagellum with normal membrane and 9+2 structure of microtubule. f : flagellum, mi : mitochondrion, nu : nucleus, Bar = 0.2 μm.

하였으며, 10일째에는 송어 혈청을 제외한 모든 희석액에서 0.2~0.8로 낮아졌다. 그러나 송어 혈청에서는 10일간의 전 보존기간 중 지속적으로 높은 SAI (1.1~1.2)를 나타냈다(Fig. 2).

송어 정액을 동해방지제로 10% DMSO를 사용하여 냉동한 뒤 해동하여 정자의 운동성을 측정 한 결과, MFRS, 0.15 M sodium citrate 및 0.3 M glucose의 희석액에서 SAI는 각각 0.6, 0.4, 0.6으로 나타나, 대조구인 비보존 정액(SAI 2.8) 보다 낮았다. 냉동후 해동시킨 정자의 수정률은 Fig. 3과 같이 대조구인 비보존 정액의 정자는 평균 65.7±2.4%였으며, 희석액별로 보존한 정자의 수정률은 MFRS, 0.15 M sodium citrate 및 0.3 M

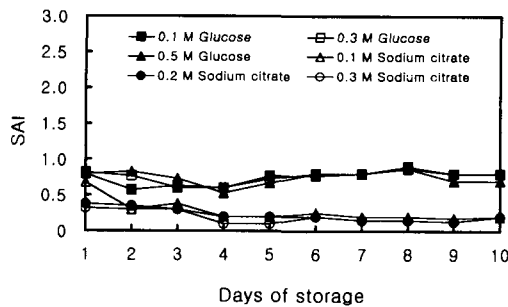
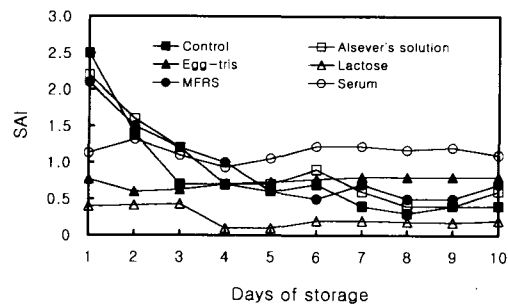


Fig. 2. Changes of SAI in *Mugil cephalus* sperm stored at 0°C with eleven diluents for 10 days.

glucose에서 각각 60.2±4.3%, 55.2±6.8%, 44.8±4.2%였다.

희석액별 냉동보존 후 해동시켰을 때, 각 희석액에서 일부 정자는 형태적으로 손상을 입었는데, 원형질막이 이탈되거나 머리의 모양이 찌그러져 있었다. 손상이 심한 것에서는 머리로부터 미토콘드리아가 이탈되었으며, 이탈된 미토콘드리아는 외막이 부풀어 오르거나 소실되는 구조적 변화를 보였다(Fig. 4).

송어의 배란된 미수정란을 냉동보존한 정자와 비보존 정자로 수정시켰을 때, 수정란의 발생과

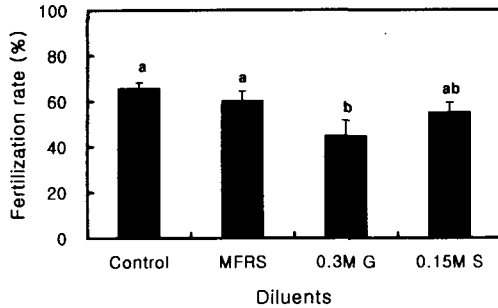


Fig. 3. Effects of three diluents with 10% dimethyl sulfoxide on fertilization rate of *Mugil cephalus* sperm stored at -196°C . Different letters on the bars are significantly different ($P < 0.05$).

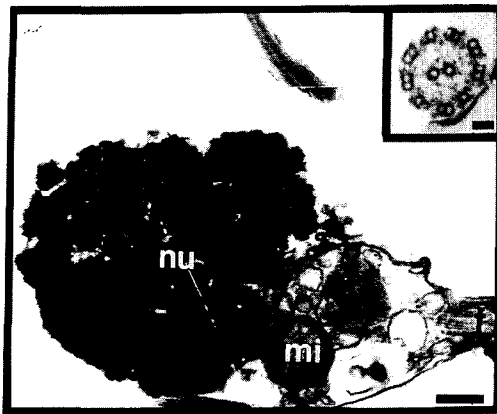


Fig. 4. Electron micrograph of frozen spermatozoon in *Mugil cephalus*. Note the head having ruptured cell membrane. An insert indicates the cross section of tail showing the rupture of flagellum membrane. f: flagellum, mi: mitochondrion, nu: nucleus, Bar = $0.2 \mu\text{m}$.

정에서 서로 차이점을 나타내지 않았으며, 부화 시 기형개체도 관찰되지 않았다.

고 찰

경골어류 정자의 머리는 일반적으로 첨체를 가지지 않으며, 외형은 공모양, 타원형 및 창모양을 이룬다(森澤·星, 1994). 본 연구에서 송어의 머

리 형태는 잉어, zebrafish, 미꾸리, 틸라피아, 고등어와 같은 공모양을 나타냈다.

적절한 희석액은 희석 후에도 정자가 운동하지 않도록 하여 운동에 필요한 에너지가 소비되는 것을 효과적으로 억제시키는 것(Ohta and Izawa, 1996)으로, 삼투질농도나 이온조성이 정장과 유사한 조성을 가졌을 경우에 보존효과가 높게 나타난다. 본 연구에서 송어 정자의 냉장보존시(0°C , 10일간) 동종의 혈청을 희석액으로 사용하였을 때 효과가 좋았다. 이는 송어 혈장의 pH나 삼투질농도가 정장과 비슷하기 때문이다. Milkfish, *Chanos chanos*에서도 동종의 혈청을 사용하여 냉장보존하였을 때, 12일간의 보존기간 중 11일까지 정자가 운동하였으며, 보존 5일 쯤까 지 운동성이 30~70%로 높게 유지되어(Hara et al, 1982), 본 연구와 유사한 결과를 나타내었다. 반면, Chao et al (1975)은 본 연구와 같은 재료인 송어 정자를 사용하여 5°C 에서 보존하였을 때, 6, 10 및 12%의 sodium citrate가 정자의 운동성을 유지시키는 데 좋은 희석액인 것으로 나타나 본 연구결과와 차이를 보였는데, 앞으로 보다 세밀한 연구를 통해 적정 희석액을 찾아야 할 것이다.

DMSO는 여러 어종의 정자 냉동보존시 효과적인 동해방지제인 것으로 알려져 있다(Withler and Lim, 1982; Harvey, 1983; Stoss and Holtz, 1983; Erdahl et al., 1984; Gwo et al., 1991; Ciereszko et al., 1993; Gwo, 1994; Cabrita et al., 1998). Atlantic salmon (Truscott and Idler, 1969), gilthead seabream, *Sparus aurata* (Chambeyron and Zohar, 1990), summer whiting, *Sillago ciliata* (Young et al., 1992), 채널메기, *Ictalurus punctatus* (Guest et al., 1976)와 능성어, *Epinephelus malabaricus* (Chao et al., 1992)에서는 10% DMSO를 동해방지제로 사용하였을 때 해동후 정자의 운동활성이 가장 높았다. 따라서 본 연구에서 송어 정자의 냉동보존 실험시 10% DMSO를 동해방지제로 사용하여 희석액별 보존효과를 조사하였다. 그 결과, 냉동보존한 정자의 활성은 비보존한 정자보다 다소 낮았으나, 수정률에서는 희석액을

MFRS를 사용하였을 때 비보존한 정자의 수정률과 유사한 결과를 보여주어($P < 0.05$), 희석액으로 MFRS를 사용하는 것이 다른 희석액에 비해 나은 것으로 생각된다.

냉동보존 후 해동시킨 일부의 송어 정자는 세포막이 이탈되거나 소실되는 등 구조적 변화를 보였는데, Gwo and Arnold (1992)와 Drokin et al. (1998)이 보고한 것처럼 냉동 및 해동과정에 손상을 입은 것으로 보인다.

본 연구에서 냉동보존한 정자를 송어의 배란된 알에 수정시켰을 때, 수정란의 발생과정은 비보존 정자로 수정시킨 배와 차이점을 찾아볼 수 없었다. 따라서 앞으로의 연구는 냉동보존한 정자로 수정시킨 발생배가 계속하여 정상적인 개체로 발생될 수 있을지에 대한 연구가 이루어져야 할 것이다.

요 약

송어 정액의 냉장 및 냉동보존시 적합한 희석액을 선정하고, 알에 대한 수정률을 평가하였다.

비보존 송어 정자의 머리는 공모양으로 직경 $1.26 \pm 0.08 \mu\text{m}$, 길이 $1.06 \pm 0.07 \mu\text{m}$ 였으며, 과립상의 염색질을 가지고 있었다.

송어 정자의 냉장보존시(0°C , 10일간) 희석액으로는 동종의 혈청이 가장 높은 정자활성을 나타냈으며, egg-tris, 0.1 M, 0.3 M 및 0.5 M glucos 에서는 활성이 서로 비슷하였다. 또한 동해방지제로 10% DMSO, 희석액으로 MFRS를 사용하여 냉동보존한 후 해동시켰을 때 대조구와 유사한 수정률을 보였다. 냉동보존 후 해동시킨 일부 정자 중에서는 세포막이 이탈되거나 소실되는 구조적 변화를 나타냈다.

참 고 문 헌

- Blaxter, J. H. S., 1953. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature*, 172 : 1189~1190.
- Cabrera E., R. Alvarez, L. Anel, K.J. Rana and M. P. Herraiz, 1998. Sublethal damage during cryopreservation of rainbow trout sperm. *Cryobiology*, 37 : 245~253.
- Chambeyron, F. and Y. Zohar, 1990. A diluent for sperm cryopreservation of gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture*, 90 : 345~352.
- 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.
- Ciereszko, A., L. Ramseyer and K. Dabrowski, 1993. Cryopreservation of yellow perch semen. *Progr. Fish-Cult.*, 55 : 261~264.
- De Quatrefages, M.A., 1853. Recherches sur la vitalite des spermatozoides de quelques poissons d'eau douce. *Annales des sciences naturelles* : Troisieme serie, 19 : 341~369.
- Drokin, S., H. Stein and H. Bartscherer, 1998. Effect of cryopreservation on the fine structure of spermatozoa of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brown trout (*Salmo trutta F. fario*). *Cryobiology*, 37 : 263~270.
- Erdahl, A. W., D. A. Erdahl and E. F. Graham, 1984. Some factors affecting the preservation of salmon spermatozoa. *Aquaculture*, 43 : 341~350.
- Guest, W. C., J. W. Avault, Jr. and J. D. Roussel, 1976. Preservation of channel catfish sperm. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 3 : 469~474.
- Gwo, J. C., 1994. Cryopreservation of yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*) spermatozoa (teleost, perciformes, sparidae). *Theriogenology*, 41 : 989~1004.
- Gwo, J. C. and C. R. Arnold, 1992. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa : Evaluation of morphological changes. *J. Exp. Zool.*, 264 : 444~453.
- Gwo, J.C., K. Strawn, M.T. Longnecker and R. Connie, 1991. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa. *Aquaculture*, 94 : 355~375.
- Hara, S., J. T. Canto, and M. E. Almendras, 1982. A comparative study of various extenders for milkfish, *Chanos chanos* (For-

- sskal), sperm preservation. *Aquaculture*, 28 : 339~346.
- Harvey, B., 1983. Cryopreservation of *Sarotherodon mossambicus* spermatozoa. *Aquaculture*, 32 : 313~320.
- Ohta, H. and T. Izawa, 1996. Diluent for cool storage of Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. *Aquaculture*, 142 : 107~118.
- 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.
- Truscott, B. and D. R. Idler, 1969. An improved extender for freezing Atlantic salmon spermatozoa. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 26 : 3254~3258.
- Withler, F. C. and L. C. Lim, 1982. Preliminary observation of chilled and deep-frozen storage of grouper (*Epinephelus tawina*) sperm. *Aquaculture*, 27 : 389~392.
- Young, J. A., M. F. Capra and A. W. Blackshaw, 1992. Cryopreservation of summer whiting (*Sillago ciliata*) spermatozoa. *Aquaculture*, 102 : 155~160.
- 장영진 · 강용진 · 김승현 · 임한규 · 이정용 · 강택영 · 고강희 · 장윤정 · 최윤희, 1997. 해산어류 정자의 생리활성과 장·단기 보존. 농림수산특정연구사업 최종연구보고서, 농림부, pp. 178.
- 森澤正昭 · 星元紀, 1994. 精子學. 東京大學出版會, 東京, 238~246 pp.