

희석액과 보존온도에 따른 강도다리 (*Platichthys stellatus*) 정자의 냉장보존 효과

임한규*, 안철민, 손맹현, 박민우, 김응오, 변순규¹
국립수산과학원 양식연구팀, ¹국립수산과학원 어류연구센터

Effect of Diluents and Temperature on Sperm Storage in Starry Flounder (*Platichthys stellatus*)

Han Kyu Lim*, Cheul Min An, Maeng Hyun Son, Min-Woo Park, Eung Oh Kim and Soon Gyu Byun¹
Aquaculture Research Team, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-902, Korea
¹*Finfish Research Center, National Fisheries Research and Development Institute, Ulsan 767-860, Korea*

Experiments were performed to find out the physico-chemical properties of milt and sperm motility in various storage conditions using starry flounder (*Platichthys stellatus*). The average sperm concentration and spermatocrit in stripped milt were $6.00 \pm 0.98 \times 10^8 / \text{mL}$ and 72 ± 5 , respectively. The osmolality and pH were 337 ± 9 mmol/kg and 7.7 ± 0.1 , respectively. The sperm of starry flounder was preserved with artificial seminal plasma (ASP), Stein's solution (SS) and marine fish Ringer's solution (MFRS) at 0°C, 2°C, and 4°C. The most effective condition for cold storage was SS at 0°C, and the preserved sperm remained motile for 30 days.

Keywords: Starry flounder, *Platichthys stellatus*, Sperm, Sperm storage

서 론

어류 정자의 냉장보존은 양식 대상 어류의 종묘생산시 어미의 방란·방정 시기와 성비의 차이에 따른 문제점들을 극복할 수 있게 하며, 특히 어획된 자연산 어미를 이용하여 채란할 경우 정액의 확보나 수정과정 등을 간편하게 할 수 있는 장점이 있다. 운동성의 감소나 수정능력의 저하 없이 정자를 단기간 냉장상태로 보존할 수 있는 방법의 개발은 종묘생산 현장에서 보존정자의 상용화를 촉진시킬 수 있을 것이다(Lim et al., 1997).

이처럼 어류 정자의 보존은 많은 장점을 가지고 있으며, 그 보존 방법은 크게 단기간동안 냉장 보존하는 방법과 장기간동안 냉동보존하는 방법으로 나눌 수 있다. 냉동보존 방법은 장기간 정자를 보존할 수 있다는 장점은 있지만 냉동과정이 복잡하고 프로그램 동결기나 액체질소탱크 등 많은 장비가 필요하다는 단점이 있다(Lim, 1998). 따라서 실제 인공종묘생산 현장에서 산란기간 동안 간편하게 사용할 수 있는 정자의 냉장보존방법이 요구되고 있다.

지금까지 국내외에서 어류정자의 냉장보존에 관한 연구는 희

석액에 따른 보존효과(Chao et al., 1975; Hara et al., 1982; McNiven et al., 1993; Lim et al., 1997; Chang et al., 1999a; Chang et al., 1999b; Chang et al., 2002; DeGraaf and Berlinsky, 2004; Lim et al., 2005)에 관한 연구와 그 외에 산소공급에 따른 정자의 수정능력 향상(Stoss and Holtz, 1983; DiLauro et al., 1994), 항생제 사용에 따른 보존기간 연장(Stoss et al., 1978; Saad et al., 1988; Chao et al., 1992; Brown and Mins, 1995; Chang et al., 2002) 및 희석액의 농도에 따른 수정률의 검토(Erdahl and Graham, 1987) 등 최적의 냉장보존방법을 찾기 위한 방향으로 연구가 진행되어 왔었다.

본 연구는 최근 동해안 지역의 특산종이며 새로운 양식 대상종으로 주목받고 있는 강도다리(*Platichthys stellatus*)의 인공종묘생산 기술을 개발하기 위한 연구의 일환으로 수행되었다. 아직 강도다리 양식에 관한 기술이 확립되지 않아 종묘생산을 위한 어미는 전적으로 어획한 어미를 육상수조에 순치한 후 사용하고 있다. 이 경우 강도다리 어미는 자연산란을 하지 않아 인위적으로 알과 정액을 채취하여 인공수정을 시도하고 있으며 이러한 과정중 앞에서 언급한 것과 같은 많은 문제점들이 발생하고 있다. 따라서 본 연구의 목적은 강도다리 정자를 산란기간동안 간편하게 냉장보존할 수 있는 적합한 조건을 찾는 데 있다.

*Corresponding author: limhk@nfrdi.re.kr

재료 및 방법

정액채취를 위한 실험어로는 국립수산물학원 수산생명과학본부와 어류연구센터의 사육시스템에서 사육한 강도다리 24마리(체장 29.1±0.6 cm, 체중 623.6±26.5 g)를 사용하였다. 정액을 얻기 위하여 실험어를 200 ppm 농도의 3-aminobenzoic acid ethyl ester에 마취시킨 다음 해수와 배설물에 오염되지 않도록 주의하며 복부를 여러번 가볍게 문질러 정액을 채취하였다. 채취된 정액은 1.5 mL 튜브에 넣어 밀봉한 후 실험에 사용될 때까지 얼음을 채운 ice box에서 보관하였고 실험 전 정자의 활성을 조사하여 활성이 높은 정자만 냉장보존 실험에 이용하였다.

냉장보존 실험 전, 강도다리 정자의 보존에 적합한 인공정장을 제조하기 위하여 채취된 정액의 pH, 삼투질농도 및 정자수를 각각 pH meter (istek Model 735P, Korea), osmometer (VAPRO®, USA) 및 혈구계산판을 이용하여 측정하였다. Spermatocrit는 microhematocrit법을 변형하여 측정하였으며 원심분리 후 정장의 생화학적 조성은 생화학분석기(Fuji Dri-Chem 3500, Japan)로 분석하였다. 각각의 분석결과를 토대로 강도다리 정자의 냉장보존용 인공정장(artificial seminal plasma, ASP)을 만들었으며 냉장보존에는 인공정장 외에도 해산어류생리식염수(marine fish Ringer's solution, MFRS)와 Stein's solution (SS)을 희석액으로 사용하였고, 희석하지 않은 원정액을 대조구로 사용하였다(Table 1). 온도에 따른 냉장보존 효과를 파악하기 위하여 정액은 각 희석액과 1:4의 비율로 혼합한 후 0, 2, 4°C로 설정된 인큐베이터에 보존하면서 약 5일 간격으로 운동성을 파악하였다.

정자의 운동성을 평가하기 위하여 보존된 정액을 인공해수에 300배 희석하여 정자운동성 관찰용 slide glass (Teflon Printed Glass Slide; 21 wells; diameter of each well, 4 mm; Funakoshi Co., Japan) 위에 4 µl 씩을 분주하여 cover slide 없이 운동성을 관찰하였다. 운동성은 현미경(Axioskop 2 plus ZEISS, Germany)에 부착되어 있는 video camera와 video-timer가 있는 VHS video-recorder로 기록하였다. Video-timer는 정자의 희석과 동시에 가동하여, 정자 운동이 종료할 때까지 video tape에 녹화하였다. 녹화된 tape를 모니터상에서 재생하면서 정자의 움직이는 속도와

비율을 측정하였으며 정자활성지수(sperm activity index, SAI)는 Strüssmann et al. (1994)의 방법을 변형하여 구하였다.

모든 실험은 3반복으로 실시하였으며, 한 시료 당 3회 측정하여 평균을 이용하였다. 각 실험 결과로부터 얻어진 모든 측정값들은 평균±표준오차로 표시하였으며, 측정값들 사이의 유의차 유무는 SPSS-통계 패키지(version 11.5)를 사용하여 95%의 신뢰수준에서 ANOVA와 Tukey's multiple range test로 검정하였다.

결 과

강도다리 정액의 특성을 파악하고 이를 이용하여 인공정장을 제조하기 위하여 강도다리 정액과 정장의 특성 및 화학적 성분을 분석한 결과, 정자의 농도는 mL당 6.00±0.98×10⁸마리였으며, 정장의 pH와 삼투질농도는 각각 7.7±0.1과 337±9 mmol/kg이었다. Spermatocrit는 72±5였으며, 정장의 K⁺, Na⁺, Cl⁻ 및 glucose 농도는 각각 5.4±1.2, 155±7, 99±20 mmol/L 및 14±3 mg/dL이었다(Table 2).

0°C에서 정자를 냉장보존한 결과는 Fig. 1과 같았다. ASP와 MFRS 및 대조구에서는 보존 5일째부터 정자의 활성이 급격히 감소하여 16일째까지만 운동성이 관찰되었다. 그러나 SS를 희석액으로 사용한 경우 30일째까지 SAI는 1.7±0.3, 움직이는 정자의 비율은 11.5±1.2%, 운동속도는 67.9±8.6 µm/sec로 정자의 활성이 높게 유지되었다(Fig. 1). 2°C에서는 대조구 및 ASP와 MFRS를 희석액으로 사용한 경우 16일째까지 정자의 활성이 관찰되었으며, SS에서는 5일째까지는 다른 실험구들 보다 정자의 운동성이 높게 나타났으나 10일째까지만 정자의 운동성을 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 4°C의 경우 5일째와 10일째의 SAI와 10일째의 움직이는 정자의 비율을 제외하면 정자의 활성은 16일째까지 모든 실험구에서 유의적인 차이가 없었다. 그러나 25일째에는 대조구와 ASP에서는 정자의 활성을 관찰할 수 없었다(Fig. 3).

Table 2. Properties of milt and seminal plasma of starry flounder (*Platichthys stellatus*) (mean±SE)

Property	Mean±SE
Ca (mg/dL)	23.9±1.2
Mg (mg/dL)	25.1±9.7
Na ⁺ (mmol/L)	155±7
K ⁺ (mmol/L)	5.4±1.2
Cl ⁻ (mmol/L)	99±20
Glucose (mg/dL)	14±3
Total protein (g/dL)	0.5±0.5
Osmolality (mmol/kg)	337±9
pH	7.7±0.1
Spermatocrit (%)	72±5
SC (×10 ⁸ /mL)	6.00±0.98

SC: Sperm concentration.

Table 1. Constituents of diluents used in cold storage

	ASP	SS	MFRS
KCl (g/L)	0.31	0.40	0.60
NaCl (g/L)	8.65	7.50	13.50
CaCl ₂ (g/L)	0.3	-	0.35
MgCl (g/L)	0.3	-	0.02
Glucose (g/L)	1.5	1.00	-
NaHCO ₃ (g/L)	1.0	2.00	0.03
pH	7.7	8.21	7.70
Osmolality (mmol/kg)	322	291	444

ASP, artificial seminal plasma; MFRS, marine fish Ringer's solution; SS, Stein's solution.

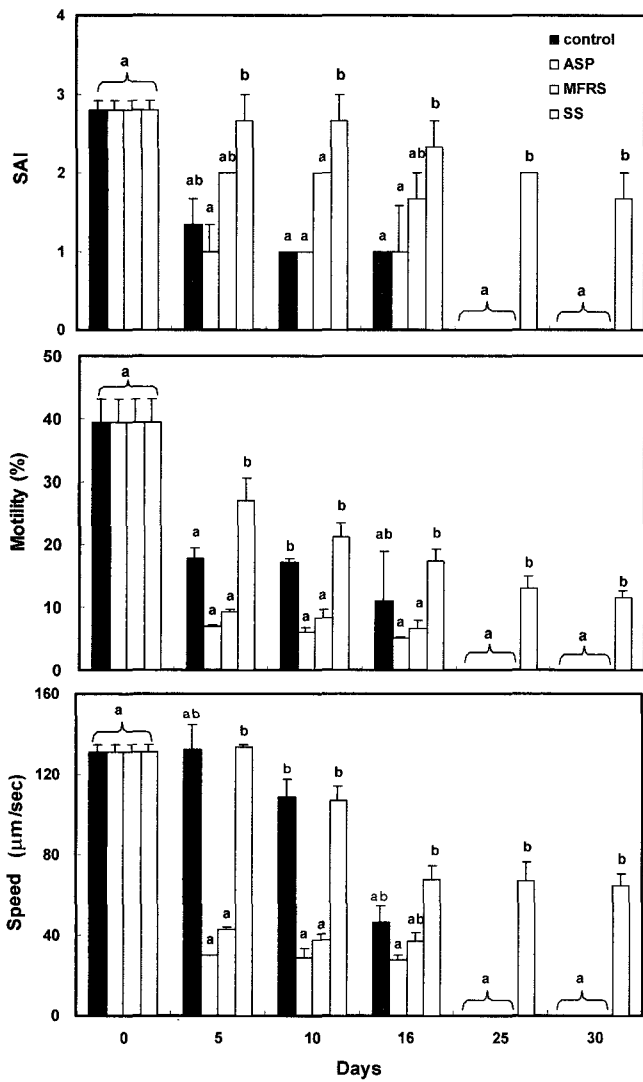


Fig. 1. Changes of sperm activity index (SAI), swimming speed and mobile sperm percentage of starry flounder (*Platichthys stellatus*) sperm stored at 0°C with three diluents. ASP, artificial seminal plasma; MFRS, marine fish Ringer's solution; SS, Stein's solution; control, undiluted milt. Different superscripts indicate significant differences between diluents (P<0.05).

고찰

어류 정자의 냉장보존에 영향을 미치는 주요 요인으로는 희석액의 조성, 희석비율, agitation, 항생제 첨가, 산소공급 및 보존온도 등이 있다. 이 가운데 가장 중요한 요인중 하나는 보존하고자 하는 어종의 정자에 맞는 적절한 희석액을 만드는 일이다. 지금까지 많은 연구에서 어종에 따라 다양한 종류의 희석액이 이용되어왔는데(Lim et al., 2005), 이런 희석액들이 갖추어야 할 가장 중요한 요건은 희석 후에도 정자가 운동하지 않도록 하여 운동에 필요한 에너지의 소비를 효과적으로 억제시키는 데에 있다(Ohta and Izawa, 1996). 가자미류를 대상으로한 이전의 연구(Chang et al., 2002)에서 넙치(*Paralichthys olivaceus*), 참가자

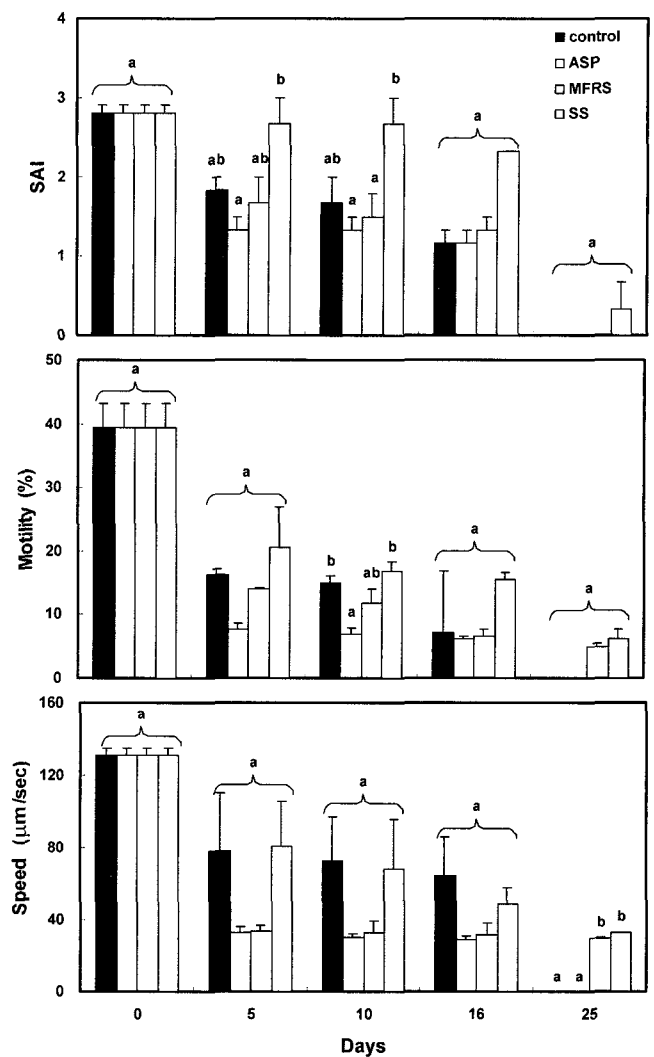


Fig. 2. Changes of sperm activity index (SAI), swimming speed and mobile sperm percentage of starry flounder (*Platichthys stellatus*) sperm stored at 2°C with three diluents. Other details as for Fig. 1.

미 (*Limanda herzensteini*) 및 강도다리의 경우 가장 냉장보존 효과가 좋았던 희석액은 SS였다고 보고하여, 본 연구의 결과와 비슷하였다. 또한 저자 등은 넙치 정자의 냉장보존에 적합한 인공정장을 제조하여 0°C에서 30일간 정자를 보존하였다(Lim et al., 2005). 이것은 보존하고자 하는 대상 어류에 적합한 희석액만 개발된다면 적어도 수 주간은 냉장상태로 간편하게 어류 정자를 보존할 수 있으며 보존정자를 산란기간동안 인공수정에 활용할 수 있다는 것을 의미한다.

Chang et al. (1997)은 자주복 (*Takifugu rubripes*) 정자의 냉장보존을 위한 적정 희석액을 결정하는 실험에서 MFRS과 1% NaCl이 적절한 희석액이었다고 보고하였으며, 황복 (*Fugu ocellatus obscurus*)에서는 0.3 M glucose가 효과가 좋았다고 하였다(Chang et al., 1999b). 그러나 감성돔 (*Acanthopagrus schlegeli*) (Lim, 1998)과 승어 (*Mugil cephalus*) (Chang et al., 1999a)에서는 인공적인 희석액 보다는 동일 어종의 혈청을 사용하였을 때 냉장

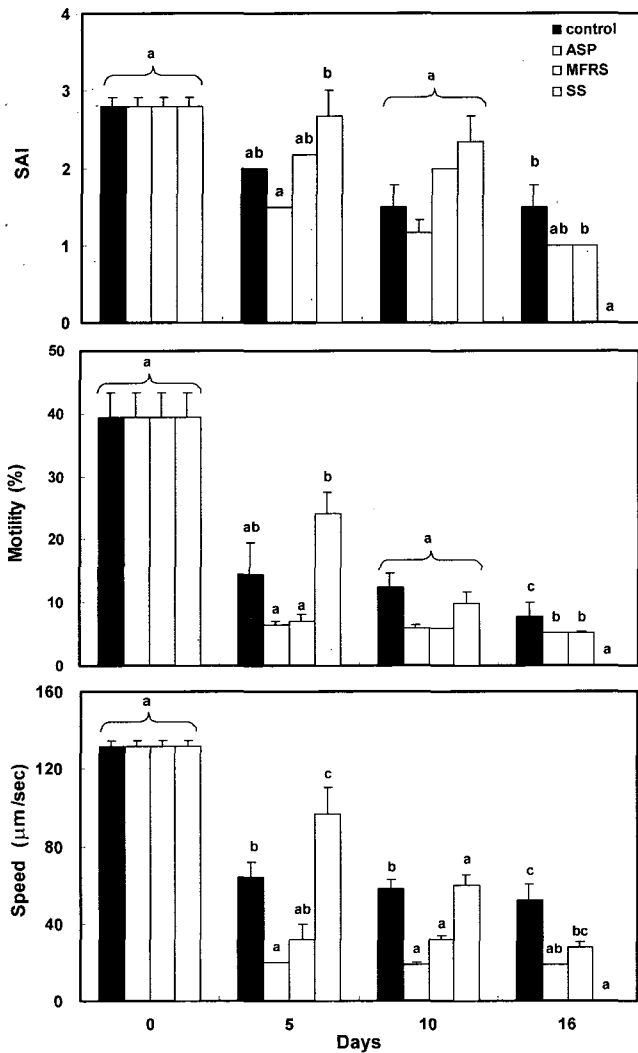


Fig. 3. Changes of sperm activity index (SAI), swimming speed and mobile sperm percentage of starry flounder (*Platichthys stellatus*) sperm stored at 4°C with three diluents. Other details as for Fig. 1.

보존 효과가 좋았으며, Hara et al. (1982)도 milkfish, (*Chanos chanos*)의 정자를 0~4°C에서 보존하였을 때, 동종의 혈청이 다른 희석액들 보다 뛰어난 보존효과를 보였다고 보고하였다. 이것은 혈청의 삼투질농도와 pH가 정장과 비슷하였기 때문에 정자의 냉장보존에 긍정적으로 작용하였을 것으로 예상된다. 이처럼 냉장보존에 있어 적절한 희석액의 종류는 어종에 따라 차이가 있으므로, 정자의 운동을 억제시킬 수 있고 삼투질농도나 이온조성이 정장과 유사한 희석액을 선택하여 사용함으로써 보존 효과를 높일 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 본 연구에서는 강도다리 정장의 삼투질농도, pH 및 이온조성 등을 분석하여 최대한 정장과 비슷한 ASP를 제작하여 냉장보존에 이용하였으나 SS 보다 좋은 결과를 얻지 못했다. 이것은 SS의 삼투질농도가 ASP 보다 낮아 정자의 운동성을 좀 더 효과적으로 억제시켰고 어류 정자의 운동성에 영향을 미치는 Ca이나 Mg이 없었기 때문이라고 생각되지만 아직 이에 관한 명확한 증거가 없으므로 앞으로

이 부분에 관한 구체적인 연구가 요구된다.

예비실험에서 강도다리 정자는 희석비율이 높아짐에 따라 운동성이 감소하였기 때문에 냉장보존 실험에서는 채취한 정액의 양을 고려하여 정액:희석액의 비율을 1:4로 하였다. 희석비율이 높아질수록 정자의 활성이 급격히 낮아지는 것은 희석비율이 높으면 정자의 운동이 개시되어 보존효과가 떨어지는 “dilution effect” 때문이라고 생각된다(Erdahl and Graham 1987). 이와 같은 결과는 가자미류(Chang et al., 2002), 자주복(Chang et al., 1997) 및 bluefin tuna (Doi et al. 1982)의 정자를 낮은 비율로 희석할수록 운동성과 수정률이 높았다는 결과와 일치하였다.

보존온도는 냉장보존의 기간을 결정하는 요인 중 하나이다. 저온은 정자의 대사를 감소시켜 보존기간을 연장시키고(Stoss and Holtz, 1983) 채정시 감염된 세균의 번식을 억제시키지만 너무 낮은 온도는 정자에게 냉해를 줄 수 있다. 본 실험에서는 강도다리 정자의 냉장보존을 위해 0°C가 가장 좋은 결과를 보여, 지금까지 국내에 보고된 넙치(Lim et al., 2005), 송어(Chang et al., 1999a), 황복(Chang et al., 1999b) 및 감성돔(Lim, 1998)과 같은 결과를 보였다. 그러나 본 연구에서 2°C의 SS 실험구에서 정자의 활성이 다른 실험구보다 낮았던 것은 오염에 의한 세균 번식으로 추정된다. 냉장보존시 희석액에 항생제를 첨가하는 것은 채정시 혼입된 세균의 성장을 억제시켜(Stoss and Refstie 1983), 정자의 운동성이나 생존율뿐만 아니라 수정률을 높이는 데에 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. 따라서 본 연구에서는 항생제를 사용하지 않는 대신 최대한 오염을 방지하기 위하여 멸균 처리된 기구들을 사용하였으나 정액 채취과정에서의 오염을 예방하지 못했을 것으로 생각된다. 따라서 앞으로 좀 더 안정적이고 장기적으로 강도다리 정자를 보존하기 위해서는 항생제 첨가효과에 대한 검토가 선행되어야 하겠다.

요 약

다양한 희석액과 보존온도에 따른 강도다리(*Platichthys stellatus*) 정자의 냉장보존 효과가 검토되었다. 강도다리 어미로부터 채정된 정액의 spermatocrit와 정자농도는 각각 72 ± 5 와 $6.00 \pm 0.98 \times 10^8$ /mL였으며, 정장의 삼투질농도와 pH는 각각 337 ± 9 mmol/kg과 7.7 ± 0.1 이었다. 강도다리 정자의 냉장보존을 위해 희석액으로 인공정장(artificial seminal plasma, ASP), Stein's solution (SS), 해산어류용 생리식염수(marine fish Ringer's solution, MFRS)를 이용하여 각각 0°C, 2°C, 4°C에서 30일간 보존하면서 정자의 활성을 검토하였다. 강도다리 정자의 냉장보존을 위해서 희석액으로는 SS가 가장 효과적이었으며 보존온도는 0°C에서 정자의 활성이 가장 좋아 30일 동안 높은 운동성을 유지하였다.

감사의 글

이 연구는 국립수산물품질관리원의 수산시험연구과제인 수산생물의 변식기구 연구(RP-2006-AQ-002)의 일부로 수행되었습니다.

참고문헌

- Brown, G. G. and S. D. Mins, 1995. Storage, transportation, and fertility of undiluted and diluted paddlefish milt. *Prog. Fish-Cult.*, 57, 64–69.
- Chang, Y. J., Y. J. Chang and H. K. Lim, 1997. Short-term preservation of sperm in the tiger puffer, *Takifugu rubripes*. *J. Aquacult.*, 10, 273–279.
- Chang, Y. J., Y. J. Chang and H. K. Lim, 1999a. Cold storage and cryopreservation of grey mullet (*Mugil cephalus*) sperm. *J. Aquacult.*, 12, 57–62.
- Chang, H. K., Lim, Y. J., Y. J. Chang, H. S. Kim and H. T. Huh, 1999b. Physico-chemical properties and cold storage of river puffer (*Takifugu obscurus*) milt. *J. Korean Fish. Soc.*, 32, 243–246.
- Chang, Y. J., Y. J. Chang, H. K. Lim, J. K. Lee and Y. J. Park, 2002. Cold storage of milt from four species of flatfish. *J. Fish. Sci. Technol.*, 5, 64–74.
- 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.
- DeGraaf, J. D. and D. L. Berlinsky, 2004. Cryogenic and refrigerated storage of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) spermatozoa. *Aquaculture*, 234, 527–540.
- DiLauro, M. N., W. F. Krise, M. A. Hendrix and S. E. Baker, 1994. Short term storage of Atlantic sturgeon sperm. *Prog. Fish-Cult.*, 56, 143–144.
- 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.
- 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.
- 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.
- Lim, H. K., 1998. Physiological properties of sperm and gamete preservation in black seabream, *Acanthopagrus schlegeli*. Ph.D. Thesis, Pukyong National University, Busan, Korea, pp. 130.
- Lim, H. K., C. M. An, M. H. Son, M. W. Park and Y. J. Park, 2005. Effect of diluents for cold storage of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm. *J. Kor. Fish. Soc.*, 38, 232–238.
- Lim, H. K., K. H. Kho and Y. J. Chang, 1997. Effects of diluents on the short-term storage of sperm in black seabream, *Acanthopagrus schlegeli*. *J. Kor. Fish. Soc.* 30, 211–215.
- 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.
- Stoss, J., S. Buyukhatipoglu and W. Holtz, 1978. Short-term and cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) sperm. *Ann. Anim. Biochem. Biophys.*, 18, 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.
- Strüssmann, C. A., P. Renard, H. Ling and F. Takashima, 1994. Motility of pejerrey, *Odontesthes bonariensis* spermatozoa. *Fish. Sci.*, 60, 9–13.

원고접수 : 2005년 12월 11일

수정본 수리 : 2006년 2월 6일