

강도다리(*Platichthys stellatus*) 정자의 냉동보존에 미치는 희석액과 동해방지제의 영향

임한규*, 안철민¹, 노경언², 민병화
국립수산물연구원 양식관리팀, ¹국립수산물연구원 자원회복사업단,
²부경대학교 수산생물학과

Effects of Diluents and Cryoprotectants on Sperm Cryopreservation in Starry Flounder (*Platichthys stellatus*)

Han Kyu Lim*, Cheul Min An¹, Gyong Ane Noh² and Byung Hwa Min
Aquaculture Management Team, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-902, Korea
¹Fisheries Resources Restoration Development and Management Center, National Fisheries Research
and Development Institute, Busan 619-902, Korea
²Department of Fisheries Biology, Graduate School, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

An experiment was performed to obtain cryopreservation techniques of starry flounder (*Platichthys stellatus*) sperm. Milt obtained from 24 males were cryopreserved using two diluents, artificial seminal plasma (ASP) and Stein's solution (SS) with three cryoprotectants, dimethyl sulfoxide (DMSO), methanol, and glycerol concentrated from 5% to 20%. Post-thaw sperm activity (motility and/or speed) revealed the highest in 10% DMSO and 15% methanol in ASP and SS as diluent. Motility and speed of cryopreserved sperm were decreased according to increase of glycerol concentration. To conclude, DMSO was a better cryoprotectant than methanol or glycerol for cryopreservation of starry flounder sperm. Glycerol was incongruent cryoprotectant because of toxic to starry flounder sperm. Most cryopreserved spermatozoa without cryoprotectant showed the enlarged head with granulated chromatin and ruptured plasma membrane by freezing and thawing injuries compared with unfrozen normal spermatozoa.

Keywords: Starry flounder, *Platichthys stellatus*, Cryopreservation, Cryoprotectant, Diluent

서 론

어류의 정자를 살아있는 상태로 냉동보존하는 기술은 양식어류의 종묘생산에 있어 어미의 방란·방정 시기가 일치하지 않거나 성비가 고르지 못할 때 발생하는 문제를 해결할 수 있게 한다. 그리고 수컷 어미의 사육관리에 소요되는 노력과 경비를 절약할 수 있게 할 뿐만 아니라, 우량종의 선택교배를 가능하게 하고 우량종이나 재래종의 보존을 간편하게 한다(Lim, 1998). 이와 같이 어류정자의 냉동보존기술이 많은 장점을 가지고 있고, 세계적으로 많은 나라에서 어류 정자의 냉동보존기술의 개발에 주력하고 있음에도 불구하고 한국에서는 아직 이 분야에 대한 관심과 연구가 미진한 상태이다. 그러므로 정자 냉동보존 기술이 이미 의학이나 축산학 분야에서 활용되고 있는 것처럼 어류 정자의 냉동보존을 위한 정자의 기초 생리활성에 관한 연

구와 함께 실제 종묘생산시 활용할 수 있는 기반기술의 확보가 우선되어야 할 것이다.

어류정자의 냉동보존에 관한 연구는 Blaxter (1953)의 연구로 효시로 많은 연구결과들이 보고된 바 있으며, 지금까지도 활발한 연구가 전개되고 있다. 어류 정자의 냉동보존에 대해서는 담수어류와 연어과 어류 및 해수어류를 대상으로 희석액과 동해방지제의 종류와 농도, 냉동속도, 해동방법 등에 관하여 많은 연구가 수행되었으며, 그 결과들에 대해서는 Chao and Liao (2001)와 Kusuda (2004)에 의해서 체계적으로 정리되었다. 최근에는 양식산업에 유용한 어류나 멸종위기에 처한 종의 정자를 보존하려는 연구가 세계 각국에서 진행되고 있으며, 국내에서도 자연산란이 어려워 양질의 수정란을 얻기 어려운 양식 대상종에 대한 연구결과들이 발표되었다(Chang et al., 1999a, b).

해산어류의 양식이 활발하게 전개되고 있는 국내외 정황으로 볼 때, 기존의 어류정자 냉동보존 연구결과들을 바탕으로 양식 대상 유용어류를 포함한 다양한 어종에 대한 비교 연구가 필요

*Corresponding author: limhk@nfrdi.re.kr

하다. 따라서 본 연구에서는 해산어류의 인공 종묘생산시 활용할 수 있는 정자의 냉동보존 기술을 확보하고자, 산업적으로 유용한 어류인 강도다리(*Platichthys stellatus*)를 대상으로 정자의 냉동보존을 위한 적정 희석액과 동해방지제를 구명하였다.

재료 및 방법

정액채취를 위한 실험어는 국립수산과학원 양식연구본부와 동해특성화연구센터의 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 ester (MS-222, Sigma, USA)에 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 box에 보관하였고, Lim et al. (2006)의 방법에 따라 실험 전 정자의 활성을 조사하여 활성이 높은 정자만 냉동보존 실험에 이용하였다.

강도다리 정자의 냉동보존용 희석액으로는 강도다리의 정장 조성을 바탕으로 제조한 인공정장(artificial seminal plasma, ASP)과 Stein's solution (SS)을 이용하였으며(Lim et al., 2006), 동해방지제로는 dimethyl sulfoxide (DMSO), methanol, glycerol을 사용하였다. 냉동보존은 동해방지제가 농도별로 첨가된 희석액에 정액을 3:1의 비율로 희석하여 0.5 mL 용량의 정액 냉동보존용 스트로에 넣었다. 정액을 넣은 스트로는 평형시간 없이 액체질소 증기에서 two-step으로 냉동한 후, -196°C 액체질소에서 1년간 보관하였다. 냉동보존한 정액의 활성을 확인하기 위하여 20°C 증류수에서 빠르게 용해시킨 후 정자의 활성을 측정하였다.

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 $4 \mu\text{L}$ 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 측정하였다.

냉동보존 전과 후에 강도다리 정자의 내부 미세구조를 관찰하기 위하여 투과전자현미경용 표본을 제작하였다. 시료는 전고정(pre-fixation)한 후 PBS로 10분간 세척한 다음, 1% osmium tetroxide (OsO_4)로 4°C 에서 2시간동안 후 고정(post-fixation)하였다. 고정이 끝난 재료는 PBS로 세척하고 50~100%의 단계별 ethanol 농도에서 15분씩 탈수하였다. 탈수가 끝난 시료는 propylene oxide와 epon 812에 포매하였다. 포매된 정자의 시료는 ultramicrotome에 의해 두께 $0.5 \mu\text{m}$ 로 semithin section한

다음, toluidine blue로 염색하여 관찰할 부위를 결정하였다. 관찰부위가 정해진 시료는 70 nm 두께로 초박절하였다. 초박절된 절편은 uranylacetate와 lead citrate 용액으로 이중염색하여 투과형전자현미경(JEM 1200 E-XII, JEOL, Japan)으로 관찰하였다. 투과전자현미경으로 관찰된 정자에 대해서는 정자의 머리 크기와 미세구조, 편모의 구조 등과 냉동과 해동과정 중 입은 구조적 손상을 조사하였다.

모든 실험은 3반복으로 실시하였으며, 한 시료 당 3회 측정하여 평균을 이용하였다. 각 실험 결과로부터 얻어진 모든 측정값들은 평균값 \pm 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

ASP를 희석액으로 사용하여 동해방지제의 농도별로 1년 동안 냉동보존한 강도다리 정자의 냉동보존 효과를 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 동해방지제로 DMSO를 사용한 경우 움직이는 정자의 비율은 모든 농도에서 유의한 차이를 보이지 않았으나 10% 농도에서 최고값을 보였으며 운동속도 역시 10%에서 가장 빨랐다. Methanol의 경우 움직이는 정자의 비율은 15% 농도에서 가장 높았으며 운동속도는 10~20% 범위에서 유의한 차이를 보이지 않았지만 15%가 가장 높은 값을 보였다. Glycerol

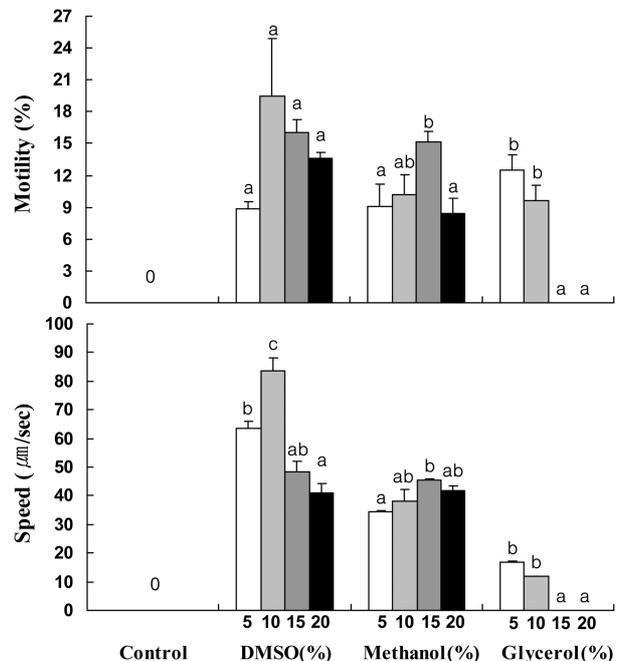


Fig. 1. Sperm motility and swimming speed of starry flounder sperm cryopreserved with artificial seminal plasma (ASP) and three cryoprotectants for one year post-freezing. Control is cryopreserved sperm without cryoprotectants. Different letters indicate significant differences between different concentrations ($P < 0.05$).

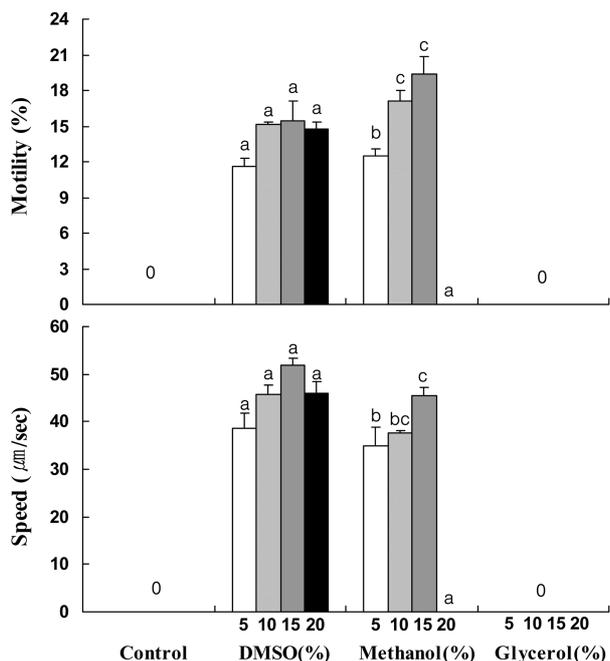


Fig. 2. Sperm motility and swimming speed of starry flounder sperm cryopreserved with Stein's solution (SS) and three cryoprotectants for one year post-freezing. Control is cryopreserved sperm without cryoprotectants. Different letters indicate significant differences between different concentrations ($P < 0.05$).

을 동해방지제로 사용하였을 때는 첨가농도가 높아질수록 정자의 운동성과 운동속도가 낮아지는 경향을 보여 15%와 20%에서는 동해방지제를 사용하지 않은 대조구와 같이 운동성을 관찰할 수 없었다.

희석액으로 SS를 사용한 경우도 ASP를 사용한 경우와 비슷한 결과를 보였다. 동해방지제로 DMSO를 사용하였을 때 모든 농도에서 유의한 차이를 보이지 않았으나 15%에서 최대값을 보였다. Methanol을 사용하였을 때 정자 활성화는 15% 농도까지 증가하였으나 20%에서는 운동성을 관찰할 수 없었다. Glycerol은 모든 농도에서 정자의 활성을 관찰할 수 없었다(Fig. 2).

투과형전자현미경으로 관찰한 냉동하지 않은 신선한 강도다리 정자는 머리, 중편부 및 꼬리로 구성되어 있으며, 치밀한 핵질로 충만한 정자의 머리는 직경 1 µm의 구형으로 침체구조가 관찰되지 않았다. 중심립은 머리 뒤쪽의 함입한 곳에 위치하며 서로 직각으로 배치되어 있었고 후부 중심소체는 편모와 연결되어 있었다(Fig. 3A). 동해방지제 없이 냉동보존한 경우, 대부분의 정자들이 머리가 찌그러지거나 부분적으로 수축되는 경우가 많았으며 머리의 원형질막이 이탈되고 염색질이 파립상으로 변하거나 균질화되지 않았다(Fig. 3B). 반면에 냉동보존을 위해 동해방지제를 사용한 경우 부분적으로 정자의 구조적 손상이 관찰되었으나 대부분의 정자는 냉동과 해동과정에서 손상을 입지 않았다(Fig. 3C, D).

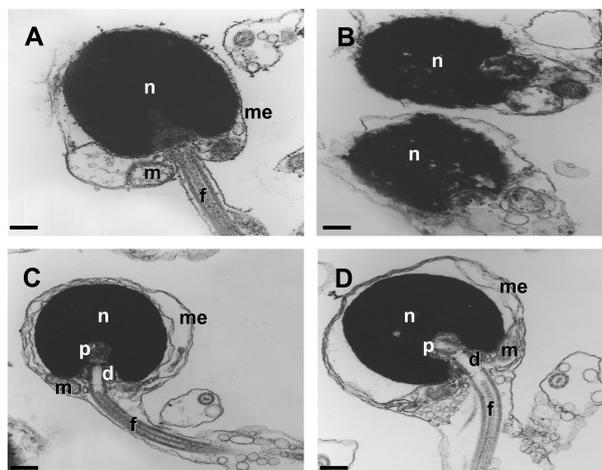


Fig. 3. Electron micrographs of fine structure of spermatozoa in starry flounder. A: unfrozen spermatozoon, B: cryopreserved spermatozoa without cryoprotectants, C: cryopreserved spermatozoa with ASP and 10% DMSO as cryoprotectant, D: cryopreserved spermatozoon with SS and 10% DMSO as cryoprotectant. d: distal centriole, f: flagellum, m: mitochondrion, me: plasma membrane, n: nucleus, p: proximal centriole (scale bar = 0.2 µm).

고찰

정자의 냉동보존 효과에 영향을 미치는 주된 요인으로는 희석액, 동해방지제, 평형시간, 냉동속도 및 해동온도 등이 있다 (Jamieson, 1991). 냉동보존의 첫 과정은 적정 희석액의 선택이라 할 수 있으며, 어류정자의 보존을 위해 희석액이 갖추어야 할 조건은 희석시 삼투질농도 변화에 의해 정자가 활성화되는 것을 방지해야 한다. 따라서 정장(seminal plasma)의 삼투질농도와 유사한 유기 화합물이나 염류를 첨가하는 것이 일반적이다. 넙치(*Paralichthys olivaceus*), 문치가자미(*Limanda yokohamae*), 찰가자미(*Microstomus achne*), 참가자미(*Pleuronectes herzensteini*), Pacific halibut (*Hippoglossus stenolepis*) 정자의 냉동보존을 위해서는 glucose, sodium citrate 및 생리식염수와 같은 간단한 조성의 희석액이 유리한 것으로 보고되고 있다(Saitoh, 1996). Turbot (*Scophthalmus maximus*)이나 Atlantic halibut (*H. Hippoglossus*)에서는 변형된 Mounib's solution이나 Billard's extender를 사용하였을 때 좋은 효과를 보인 것으로 나타났다(Billard et al., 1993; Chereguini et al., 1997; Dreanno et al., 1997; Suquet et al., 1998). 저자 등은 이미 강도다리 정자의 냉장보존 연구에서 강도다리 정장 조성파 유사한 인공정장(ASP)을 만들어 냉장보존 효과를 검토한 바 있으며(Lim et al., 2006), 그 결과를 바탕으로 강도다리를 본 냉동보존 연구에 사용하였다. 강도다리 정자의 냉장보존 연구(Lim et al., 2006)에서 염류만 들어 있는 해산어류용 생리식염수에 비해 glucose가 첨가된 SS나 ASP에서 보존성이 높은 것으로 나타났다. 이것은 일반적으로 sucrose나 trehalose와 같은 당류는 정자의 냉동과정 중 세포막의 인지질을 안정시키기 때문이다(Gwo, 1994). 그러나 어종별

적합한 희석액의 종류는 어종에 따라 종특이적인 경향을 보이고 있기 때문에 지금까지 어종에 따라 많은 종류의 희석액이 보고되었다(Kusuda, 2004).

정자는 냉동과 해동과정중 많은 손상을 입을 수 있기 때문에 이를 방지하기 위하여 동해방지제를 사용한다. 동해방지제는 중성으로 친수성이어야 하며, 정자의 세포막에 대한 투과성이 높아야 한다. 뿐만 아니라 정자에 대한 독성도 약해야 한다(Jamieson, 1991). 지금까지 동해방지제로서 DMSO, glycerol 및 methanol 등이 주로 사용되어 왔으나, 이것들은 어종별로 종 특이성을 나타내기 때문에, 모든 어류에 적용될 수 있는 단일한 동해방지제는 아직 없는 것으로 보인다. 본 연구에서는 강도다리 정자 보존을 위하여 동해방지제로 DMSO와 methanol을 사용하였을 때 glycerol을 이용한 경우보다 효과가 우수한 것으로 나타났다. Chang and Chang (2002)도 강도다리에서 10% DMSO를 사용하였을 때 정자의 구조적 손상이 감소하였다고 보고하였고, Saitoh (1996)는 문치가자미, 찰가자미, 참가자미, *P. schrenki* 및 *Verasper moser*에서도 DMSO를 사용하였을 때 냉동보존 효과가 좋았다고 보고하였다. 본 연구에서 glycerol의 농도가 높을수록 정자의 활성이 약해지는 것은 glycerol 독성이 강해지기 때문인 것으로 추측된다.

냉동보존한 정자가 신선한 정자에 비하여 낮은 운동성과 수정률을 나타내는 원인을 밝히기 위하여, 냉동보존 과정 중에 일어날 수 있는 정자의 손상기구를 파악해야 한다. 본 연구에서 일부 냉동보존 정자는 냉동과 해동 과정에서 형태적 손상을 입었으며, 머리의 크기도 팽창되어 있었다. Gwo et al. (1993)은 이러한 형태적 손상이 물리적 압력에 대한 정자 자체의 내성부족 때문에 일어난다고 하였다. 한편, Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*)(Gwo and Arnold, 1992)에서는 정자를 냉동 보존할 때 동해방지제로 DMSO를 사용함으로써 정자의 물리적 손상을 줄일 수 있는 것으로 밝혀지고 있다. 그러나 냉동에 의한 정자의 물리적 손상은 동해방지제의 첨가 유무뿐만 아니라 희석액의 조성, 냉동속도, 해동속도 등과 같은 요인들로부터도 영향을 받을 수 있으므로, 앞으로 이러한 요인들의 상호작용에 관하여 깊이있는 연구가 필요하겠다.

요 약

희석액과 동해방지제로 각각 ASP와 DMSO를 사용하여 1년 동안 냉동보존한 후 해동한 강도다리(*Platichthys stellatus*) 정자의 운동속도는 10% 농도에서 가장 빨랐다. Methanol의 경우 10~20% 범위에서 유의한 차이를 보이지 않았지만 15%에서 가장 높은 값을 보였다. Glycerol을 동해방지제로 사용하였을 때는 첨가농도가 높아질수록 정자의 운동성과 운동속도가 낮아졌다. 희석액으로 SS를 사용한 경우도 ASP와 비슷한 결과를 보였다. 투과형전자현미경으로 관찰한 냉동하지 않은 신선한 강도다리 정자는 머리, 중편부 및 꼬리로 구성되어 있으며, 치밀

한 핵질로 충만한 구형의 머리에는 침체구조가 관찰되지 않았다. 동해방지제 없이 냉동보존한 경우, 대부분의 정자들이 머리가 찌그러지거나 부분적으로 수축되는 경우가 많았으며 머리의 원형질막이 이탈되고 염색질이 과립상으로 변하거나 균질화되지 않았다. 반면에 냉동보존을 위해 동해방지제를 사용한 경우 부분적으로 정자의 구조적 손상이 관찰되었으나 대부분의 정자는 냉동과 해동과정에서 손상을 입지 않았다.

감사의 글

이 연구는 국립수산물과학원의 수산시험연구과제인 수산생물의 번식기구 연구(RP-2007-AQ-039)의 일부로 수행되었습니다.

참고문헌

- Billard, R., J. Cosson and L. W. Crim, 1993. Motility of fresh and aged halibut sperm. *Aquat. Living Resour.*, 6, 67-75.
- Blaxter, J. H. S., 1953. Sperm storage and cross fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature*, 172, 1189-1190.
- Chang, Y. J., H. K. Lim, Y. J. Chang and H. S. Kim, 1999a. Sperm cryopreservation and fertility of post-thaw sperm in river puffer, *Takifugu obscurus*. *J. Aquaculture*, 12, 1-5. (in Korean)
- Chang, Y. J., Y. H. Chang, H. K. Lim and K. H. Kho, 1999b. Cold storage and cryopreservation of grey mullet (*Mugil cephalus*) sperm. *J. Aquaculture*, 12, 57-62. (in Korean)
- Chang, Y. J. and Y. J. Chang, 2002. Milt properties of four flatfish species and fine structure of their cryopreserved spermatozoa. *J. Fish. Sci. Tech.*, 5, 87-96.
- Chao, N. H. and I. C. Liao, 2001. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. *Aquaculture*, 197, 161-189.
- Chereguini, O., R. M. Cal, C. Dreanno, B. O. Baulny, M. Suquet and G. Maise, 1997. Short-term storage and cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) sperm. *Aquat. Living Resour.*, 10, 251-255.
- Dreanno, C., M. Suquet, L. Quemener, J. Cosson, F. Fierville, Y. Normant and R. Billard, 1997. Cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) spermatozoa. *Theriogenology*, 48, 589-603.
- Gwo, J. C., 1994. Cryopreservation of yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*) spermatozoa. *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., H. Kurokura and R. Hirano, 1993. Cryopreservation of spermatozoa from rainbow trout, common carp, and marine puffer. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59, 777-782.
- Jamieson, B. G. M., 1991. Fish evolution and systematics : Evidence from spermatozoa. Cambridge University Press, New York, 319 pp.
- Kusuda, S., 2004. Current status and perspective of cryopreservation of sperm and blastomeres in fish. *Fish Genetics and Breeding Science*, 34, 1-25. (in Japanese)

- Lim, H. K., 1998. Physiological properties of sperm and gamete preservation in black seabream, *Acanthopagrus schlegeli*. Ph.D. Thesis, Pukyong National University, Busan, Korea, 130 pp. (in Korean)
- Lim, H. K., C. M. An, M. H. Son, M. W. Park, E. O. Kim and S. G. Byun, 2006. Effects of diluents and temperature on sperm storage in starry flounder (*Platichthys stellatus*). J. Aquaculture, 19, 47–51. (in Korean)
- Saitoh, S., 1996. Cryopreservation of flatfish sperm. Sci. Rep. Hokkaido Fish. Exp. Stn, 48, 9–17. (in Japanese)
- Suquet, M., C. Dreanno, B. Petton, Y. Normant, M. H. Omnes and R. Billard, 1998. Long-term effects of the cryopreservation of turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa. Aquat. Living Resour., 11, 45–48.

원고 접수 : 2007년 5월 30일

수정본 수리 : 2007년 8월 1일