

# 산천어 (*Oncorhynchus masou masou*) 정자의 냉동보존에 미치는 희석액과 동해방지제의 영향

임한규 · 이철호<sup>1</sup> · 민병화\* · 이정희 · 이채성<sup>1</sup> · 성기백<sup>1</sup> · 이상목  
 국립수산물과학원 양식관리과, <sup>1</sup>국립수산물과학원 영동내수면연구소

## Effects of Diluents and Cryoprotectants on Sperm Cryopreservation of Masou Salmon, *Oncorhynchus masou masou*

Han Kyu LIM, Cheul Ho LEE<sup>1</sup>, Byung Hwa MIN\*, Jung Uie LEE, Chae Sung LEE<sup>1</sup>, Ki Baik SEONG<sup>1</sup> and Sang Mok LEE  
 Aquaculture Management Division, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-902, Korea  
<sup>1</sup>Cold-Water Inland Fisheries Research Institute, Yangyang 215-821, Korea

We experimentally determined the physico-chemical properties of seminal plasma as well as the sperm cryopreservation techniques of masou salmon, *Oncorhynchus masou masou*. Seminal plasma contained 18±1 mmol/L potassium, 144±4 mmol/L sodium, 116±3 mmol/L chloride, 83.2±3.1 mg/L calcium, 14.8±0.7 mg/L magnesium, 45±9 mg/L glucose, and 1.0±0.0 g/L total protein. The osmolality and pH of seminal plasma were 287±7 and 7.7±0.1 mmol/kg, respectively, and the spermatocrit was 28±2. The rate of embryonic survival at the eyed-stage and the hatching rate were highest in 10% methanol with 300 mM glucose. Compared to DMSO or glycerol, methanol served as a better cryoprotectant of masou salmon sperm.

Key words: Cryoprotectant, Diluent, *Oncorhynchus masou masou*, Sperm cryopreservation

### 서 론

어류의 정자를 냉동하여 장기간 보존하는 기술은 양식어류의 종묘생산에 있어 어미의 배란·배정 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 연구자들이 어류 정자의 냉동보존기술의 개발에 주력하고 있음에도 불구하고 아직 종묘생산 현장에서는 효과적으로 활용되고 있지 못한 실정이다. 그러므로 정자 냉동보존 기술이 인간이나 가축에서 활용되고 있는 것처럼 어류에서도 정자의 냉동보존을 위한 정자의 기초 생리활성에 관한 연구와 함께 실제 종묘생산시 활용할 수 있는 간편하고 실용적인 기술의 확보가 우선되어야 할 것이다. 어류정자의 냉동보존에 관한 연구는 Blaxter (1953)의 연구를 시작으로 많은 연구결과들이 보고된 바 있으며, 지금까지도 활발한 연구가 전개되고 있다. 어류 정자의 냉동보존에 대해서는 담수 어류와 연어과 어류 및 해수 어류를 대상으로 희석액과 동해방지제의 종류와 농도, 냉동속도, 해동방법 등에 관하여 많은 연구가 수행되었으며, 그 결과들에 대해서는 몇몇 연구자들에 의해 체계적으로 정리되었다 (Chao and Liao, 2001; Kusuda, 2004). 최근에는 양식산업에 유용한 어류나 멸종위기에 처한

종의 정자를 보존하려는 연구가 세계 각국에서 진행되고 있다 (Chang and Chang, 2002; Billard et al., 2004). 산천어, *Oncorhynchus masou masou*는 송어가 바다로 내려가지 않고 일생을 하천에서 생활하는 종으로 한국에서는 무지개송어와 같이 양식되는 경우가 많으며 최근에는 자연 상태의 자원을 증강시키기 위하여 강원지역을 중심으로 인공종묘 생산된 치어를 하천에 방류 하고 있다. 산천어를 양식하는 경우 수컷이 암컷보다 일찍 성숙하여 암컷을 공격하는 문제가 있어 종묘생산에 어려움이 있다. 따라서 본 연구에서는 산천어의 인공 종묘생산시 활용할 수 있는 정자의 냉동보존 기술을 확보하고자, 산천어 정자의 냉동보존을 위한 적정 희석액과 동해방지제를 구명하였다.

### 재료 및 방법

정액과 알을 채취하기 위한 실험어는 국립수산물과학원 영동내수면연구소에서 사육한 산천어 어미로 암컷 10마리 (체장 26.0±2.7 cm, 체중 294.9±74.0 g)와 수컷 25마리 (체장 25.6±1.8 cm, 체중 219.7±38.4 g)를 사용하였다. 정액과 알을 채취하기 위하여 실험어를 200 ppm 농도의 3-aminobenzoic acid ethyl ester (MS-222, Sigma)에 마취시킨 다음 해수와 배설물에 오염되지 않도록 주의하며 복부를 가볍게 문질러 정액과 알을 얻었다. 채취된 정액은 1.5 mL 튜브에 넣어 밀봉한 후 실험에 사용될 때까지 얼음을 채운 ice box에서 보관하였다. 발안율과 부화율을 조사하기 위해 수정실험에 이용한 알은 평균 난경이

\*Corresponding author: pkmbh@hanmail.net

0.49 mm였고 무게는 0.103 g이었다. 정액의 spermatocrit는 micro-hematocrit법을 변형하여 측정하였으며 정장의 pH와 삼투질농도 및 이온 농도를 측정을 위하여 정액을 12,000 rpm으로 15분간 원심분리한 후 그 상등액을 분리하여 분석하기 전까지 -80°C 초저온냉동고에 보관하였다. 정장의 pH와 삼투질농도는 pH meter (Istek Model 735P, Korea)와 삼투압측정기 (The Advanced™ Osmometer, USA)를 각각 이용하여 측정하였으며, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ca 및 Mg 등의 이온과 glucose, protein은 생화학분석기 (Fuji Dri-Chem 3500, Japan)로 조사하였다. 산천어 정자의 냉동보존에 적합한 희석액을 선정하기 위해 1차 실험에서는 무지개송어에서 주로 사용되었던 Erdhal and Graham #6 (E&G#6; Erdhal and Graham, 1980)와 300 mM glucose 용액을 DMSO와 함께 사용하였다. 산천어 정자의 냉동보존에 적합한 동해방지제를 찾기 위한 2차 실험에서는 1차 실험에서 결과가 좋았던 300 mM glucose 용액을 각기 다른 동해방지제 [dimethyl sulfoxide (DMSO), methanol, glycerol]와 농도별로 혼합하여 사용하였다.

냉동보존은 동해방지제가 농도별로 첨가된 희석액에 정액을 3:1의 비율로 희석하여 0.5 mL 용량의 정액 냉동보존용 스트로에 넣었다. 정액을 넣은 스트로는 평형시간 없이 액체 질소 증기 (-76°C)에서 two-step으로 냉동한 후, -196°C 액체 질소에서 1일간 보관하였다. 냉동보존한 정액의 수정 능력을 확인하기 위하여 20°C 증류수에서 빠르게 용해시킨 후 미리 준비한 알과 건식법으로 수정시켰다. 부화는 영동내수면연구소 부화동의 아트킨스부화기 (47×265×80 cm)에 부화틀 (47×55×8 cm)을 3단으로 쌓고 그 안에 각각의 실험구별 3개의 부화통을 설치하여 부화시기까지 관리하였다. 부화용수는 남대천의 하천수를 이용하였으며 수온은 수정시 15.0°C였으나 발생기간 동안 자연수온이 서서히 낮아져 부화시기에는 9.2°C였다. 모든 실험은 3반복으로 실시하였으며, 각 실험 결과로부터 얻어진 모든 측정값들은 평균±표준 오차로 표시하였다. 측정값들 사이의 유의차 유무는 SPSS-통계 패키지 (version 10.5)를 사용하여 95%의 신뢰수준에서 ANOVA와 Tukey's multiple range test 또는 t-test로 검정하였다.

## 결과 및 고찰

산천어 정액의 spermatocrit는 28±2였으며 정장의 pH와 삼투질농도는 각각 7.7±0.1과 287±7 mmol/kg이었다. 정장의 생화학조성은 glucose와 total protein이 각각 45±9 mg/L와 1.0±0 g/L였고, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> 및 Cl<sup>-</sup>이 각각 144±4, 18±1, 116±3 mmol/L였다 (Table 1). 산천어 정액이나 정장의 특성을 파악하는 것은 정자에 대한 기초 생리학적 정보를 얻을 뿐만 아니라 정자의 보존방법을 개발하기 위한 중요한 자료를 제공하기 때문에 매우 중요하다. 산천어 정액의 spermatocrit는 해수어류에 비해 매우 낮은 수준이 나타나고 있다. 실제로 담수어종들인 whitefish (*Coregonus clupeaformis*)와 yellow perch (*Perca flavescens*), 무지개송어 (*O. mykiss*) (Ciereszko and Dabrowski,

Table 1. Chemical property of milt and seminal plasma from masou salmon. n=6

| Property                 | Mean±SEM |
|--------------------------|----------|
| Na <sup>+</sup> (mmol/L) | 144±4    |
| K <sup>+</sup> (mmol/L)  | 18±1     |
| Cl <sup>-</sup> (mmol/L) | 116±3    |
| Ca (mg/L)                | 83.2±3.1 |
| Mg (mg/L)                | 14.8±0.7 |
| Total protein (g/L)      | 1.0±0.0  |
| Glucose (mg/L)           | 45±9     |
| Osmolality (mmol/kg)     | 287±7    |
| pH                       | 7.7±0.1  |
| Spermatocrit             | 28±2     |

1993) 및 muskellunge (Lin et al., 1996)의 spermatocrit가 각각 26.6, 64.7, 25.8 및 35.7였으나 해산어류인 감성돔 (*Acanthopagrus schegeli*) (Lim, 1998)은 평균 90 이상이었고 강도다리 (*Platichthys stellatus*) (Lim et al., 2006)와 말쭉치 (*Thamnonomus modestus*) (Le et al., 2007)도 각각 72와 73으로 산천어나 기타 다른 담수어류들보다는 상대적으로 높은 값을 보였다. 이러한 차이는 환경수의 삼투질농도에 영향을 받았기 때문으로 예상되나 어류의 spermatocrit는 어종간 뿐만 아니라 동종 내에서도 어체의 연령, 성숙도, 크기 및 사육 환경조건 등에 따라 차이를 나타내므로 각 결과들의 절대적 비교는 어렵다. 일반적으로 담수어류의 체내 삼투질농도는 해수어류보다 낮다. 산천어는 287±7 mmol/kg로 무지개송어 (Morisawa, 1985)와 비슷한 수준이었으나 감성돔 (Lim, 1998)이나 강도다리 (Lim et al., 2006)보다는 낮은 수준이었다. 한편 산천어 정장의 단백질, glucose 및 이온의 함량은 해산어류인 감성돔 (Lim, 1998)이나 강도다리 (Lim et al., 2006) 및 말쭉치 (Le et al., 2007)와는 많은 차이를 보였고 무지개송어 (data not shown)와도 차이를 보여 종 특이성이 매우 컸다.

산천어 정자의 냉동보존에 적합한 희석액을 파악하기 위해 동해방지제로 DMSO를 사용하여 인공수정 시킨 결과, 발안율과 부화율은 각각 Table 2, 3과 같다. 신선한 정액을 사용한 대조구의 발안율은 93.5±2.8%로 매우 높았다. E&G#6 희석액을 이용하여 냉동보존한 경우 5% DMSO에서 발안율이 3.2±0.5%로 가장 높았으나, 다른 DMSO 농도와 유의한 차이는 보이지 않았으며 대조구와 비교해 볼 때 매우 낮은 수준이었다. 그러나 300 mM glucose를 사용하였을 때 5% 및 10% DMSO에서 각각 14.7±1.7%, 32.1±3.9%로 대조구를 제외한 나머지 실험구보다 높았으며, E&G#6를 사용했을 때 보다 유의하게 높은 값을 보였다 (Table 2). 부화율은 발안율과 비슷한 경향이였으며, 희석액으로 300 mM glucose를 사용하였을 때가 E&G#6를 사용했을 때 보다 높았다 (Table 3). 냉동보존의 효과는 희석액과 동해방지제의 종류에 따라 달라질 수 있다. 냉동보존시 희석액을 사용하는 목적은 첫째 정자의 장기생존에 불리한 원정액 (whole semen)의 조건을 변화시키며, 둘째 적극적으로 정자의 생존성을 보호하는 조건을 부여하며, 셋째 정액의 양을 증가시키기 때문이다. 일반적으로 어류정자의 보존을 위해 희석액이 갖추어야 할 조건은 희석시 삼투질

Table 2. The percentage of eyed embryonic survival rate of masou salmon sperm cryopreserved with E&G#6 or 300 mM glucose as diluents, and dimethyl sulfoxide (DMSO) as cryoprotectant. Values are expressed as mean±SEM (n=3). Different letters indicate significant differences among cryoprotectant concentrations (P<0.05). Asterisk indicates difference between diluents (P<0.05)

|                      | Diluents              |                        |
|----------------------|-----------------------|------------------------|
|                      | E&G#6                 | 300 mM glucose         |
| Control (fresh milt) | 93.5±2.8 <sup>a</sup> | 93.5±2.8 <sup>a</sup>  |
| DMSO 0%              | 0.3±0.1 <sup>b</sup>  | 0.4±0.1 <sup>b</sup>   |
| DMSO 5%              | 3.2±0.5 <sup>b</sup>  | 14.7±1.7 <sup>C*</sup> |
| DMSO 10%             | 0.7±0.4 <sup>b</sup>  | 32.1±3.9 <sup>C*</sup> |
| DMSO 15%             | 2.3±2.0 <sup>b</sup>  | 7.2±1.5 <sup>b</sup>   |
| DMSO 20%             | 1.4±1.4 <sup>b</sup>  | 6.7±5.0 <sup>b</sup>   |

Table 3. The percentage of hatching rate of masou salmon sperm cryopreserved with E&G#6 or 300 mM glucose as diluents, and dimethyl sulfoxide (DMSO) as cryoprotectant. Values are expressed as mean±SEM (n=3). Different letters indicate significant differences among cryoprotectant concentrations (P<0.05). Asterisk indicates difference between diluents (P<0.05)

|          | Diluents              |                        |
|----------|-----------------------|------------------------|
|          | E&G#6                 | 300 mM glucose         |
| Control  | 92.4±1.6 <sup>a</sup> | 92.4±1.6 <sup>a</sup>  |
| DMSO 0%  | 0.1±0.1 <sup>b</sup>  | 0.2±0.1 <sup>b</sup>   |
| DMSO 5%  | 1.9±1.9 <sup>b</sup>  | 12.2±4.2 <sup>b*</sup> |
| DMSO 10% | 0.2±0.2 <sup>b</sup>  | 29.9±4.5 <sup>C*</sup> |
| DMSO 15% | 0.2±0.2 <sup>b</sup>  | 4.5±1.2 <sup>b</sup>   |
| DMSO 20% | 0.4±0.4 <sup>b</sup>  | 2.5±0.8 <sup>b</sup>   |

농도 변화에 의해 정자가 활성화되는 것을 방지해야 한다. 따라서 정장 (seminal plasma)의 삼투질농도와 유사한 유기 화합물이나 염류를 첨가하는 것이 일반적이다. 어종별 적합한 희석액의 종류는 어종에 따라 정장의 조성이 중 특이적인 경향을 보이고 있으며, 최근에는 각 어종에 대한 특이적인 여러 종류의 희석액이 보고되고 있다 (Kusuda, 2004). 무지개 송어에서는 E&G#6가 희석액으로 많이 사용되었고 (Cabrita et al., 2001a; b), 그 외에 600 mM sucrose (Ciereszko and Dabrowski, 1996)나 Kurokura의 희석액 (Kurokura and Hirano, 1980) 등이 사용되었다. 일본의 산천어, *O. masou*에서는 300 mM glucose를 사용하였을 때 가장 높은 발안율이 보고된 바 있다 (Ohta et al., 1995; Yamano et al., 1990). 본 연구에서는 300 mM glucose를 희석액으로 사용하였을 때가 E&G#6보다 냉동보존 효과가 좋은 것으로 나타났다. 이것은 일반적으로 glucose나 sucrose, trehalose와 같은 당류는 정자의 냉동과정 중 세포막의 인지질을 안정시키기 때문이다 (Gwo, 1994). 동해방지제의 종류와 농도에 따른 발안율과 부화율은 Fig. 1-3과 같다. DMSO를 동해방지제로 사용한 경우 발안율 및 부화율은 10% 농도가 다른 농도에 비해 유의하게 높았으며 (Fig. 1), methanol을 사용하였을 때 역시 10% 농도에서 가장 높은 발안율 및 부화율을 보였다 (Fig. 2). Glycerol을 사용하였을 경우 발안율 및 부화율은 농도에 따른 유의한 차이를 보이

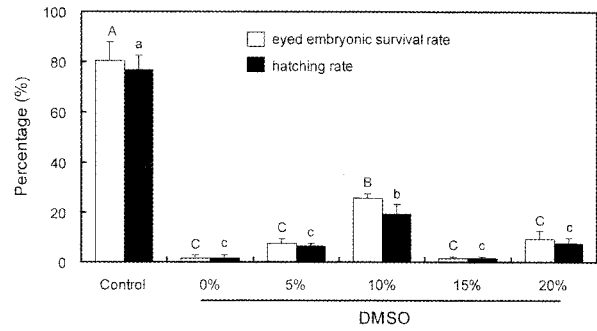


Fig. 1. The percentage of eyed embryonic survival rate and hatching rate of masou salmon sperm cryopreserved with 300 mM glucose and dimethyl sulfoxide (DMSO). Values are expressed as mean±SEM (n=3). Different capital letters indicate significant differences among eyed embryonic survival rate, different small letters indicate significant differences among hatching rate (P<0.05).

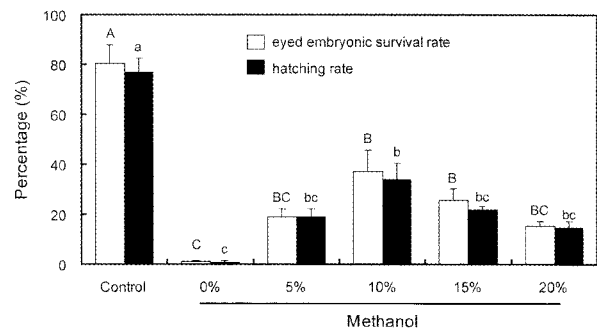


Fig. 2. The percentage of eyed embryonic survival rate and hatching rate of masou salmon sperm cryopreserved with 300 mM glucose and methanol. Values are expressed as mean±SEM (n=3). Different capital letters indicate significant differences among eyed embryonic survival rate, different small letters indicate significant differences among hatching rate (P<0.05).

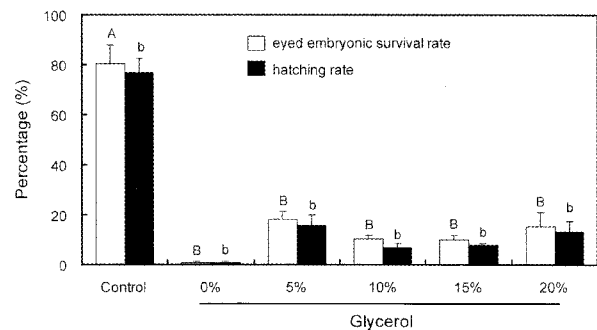


Fig. 3. The percentage of eyed embryonic survival rate and hatching rate of masou salmon sperm cryopreserved with 300 mM glucose. Values are expressed as mean±SEM (n=3). Different capital letters indicate significant differences among eyed embryonic survival rate, different small letters indicate significant differences among hatching rate (P<0.05).

지 않았다 (Fig. 3). 동해방지제별로 가장 높았던 발안율 및 부화율을 비교해 보면 DMSO (10%)는 각각 25.6±1.8%, 19.3±

3.8%, methanol (10%)은  $37.3 \pm 8.4\%$ ,  $33.9 \pm 6.5\%$ , glycerol (20%)은  $15.3 \pm 5.8\%$ ,  $13.2 \pm 4.3\%$ 로 methanol이 산천어의 정자 냉동보존시 가장 적합한 동해방지제로 확인되었다.

정자는 냉동과 해동과정 중 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 중 특이성을 나타내기 때문에, 모든 어류에 적용될 수 있는 단일한 동해방지제는 아직 없는 것으로 보인다. 본 연구에서는 산천어 정자보존을 위하여 동해방지제로 methanol을 사용하였을 때 가장 좋은 결과를 보였다. 이것은 일본의 산천어와 amago salmon, *O. masou ishikawae*에서 DMSO를 사용하여 좋은 결과를 얻은 연구결과 (Ohta et al., 1995; Yamano et al., 1990)와 차이를 보였으나 무지개송어에서는 동해방지제로서 10% methanol도 좋은 결과를 보였다는 보고가 있다 (Lahnsteiner et al., 1997; 2002). 이러한 차이는 동해방지제와 희석액의 조합에 따라서 달라질 수 있고 냉동방법에 따라서도 달라질 수 있다. 기존에 보고된 일본의 산천어와 amago salmon의 냉동보존 방법은 dry ice를 이용하여 펠렛을 만드는 방법으로 본 연구의 straw법과는 많은 차이가 있다. 따라서 이러한 냉동방법의 차이에 따라서도 동해방지제의 효과가 달라질 수 있으므로 동해방지제의 선택을 위해서는 동해방지제의 효과에 영향을 미치는 여러 가지 요인들을 종합적으로 검토하여야 한다.

## 사 사

이 연구는 국립수산과학원의 수산시험연구과제인 수산생물의 번식기구 연구 (RP-2008-AQ-022)의 일부로 수행되었습니다.

## 참 고 문 헌

- Billard, R., J. Cosson, S.B. Noveiri and M. Pourkazemi. 2004. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. *Aquaculture*, 236, 1-9.
- Blaxter, J.H.S. 1953. Sperm storage and cross fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature*, 172, 1189-1190.
- Cabrita, E., L. Anel and M.P. Herraéz. 2001a. Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. *Theriogenology*, 56, 623-635.
- Cabrita, E., V. Robles, R. Alvarez and M.P. Herraéz. 2001b. Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization. *Aquaculture*, 201, 301-314.
- 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.
- 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.
- Ciereszko, A. and K. Dabrowski. 1996. Effect of a sucrose-DMSO extender supplemented with pentoxifylline or blood plasma on fertilizing ability of cryopreserved rainbow trout spermatozoa. *Prog. Fish-Cult.*, 58, 143-145.
- Erdhal, D. and E.F. Graham. 1980. Cryopreservation of spermatozoa of the brook and rainbow trout. *Cryo-Lett.*, 1, 203-208.
- 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, USA, 319.
- Kurokura, H. and R. Hirano. 1980. Cryopreservation of rainbow trout sperm. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 46, 1493-1495.
- Kusuda, S. 2004. Current status and perspective of cryopreservation of sperm and blastomeres in fish. *Fish Genet. Breed. Sci.*, 34, 1-25.
- Lahnsteiner, F., N. Mansour and T. Weismann. 2002. A new technique for insemination of large egg batches with cryopreserved semen in the rainbow trout. *Aquaculture*, 209, 359-367.
- Lahnsteiner, F., T. Weismann and R.A. Patzner. 1997. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1.2 mL and 5 mL straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. *Aquacult. Res.*, 28, 471-479.
- Le, M.H., H.K. Lim, B.H. Min, S.Y. Kim and Y.J. Chang. 2007. Milt properties and spermatozoa structure of filefish (*Thamnaconus modestus*). *Dev. Reprod.*, 11, 227-233.
- Lim, H.K. 1998. Physiological properties of sperm and gamete preservation in black seabream, *Acanthopagrus schlegeli*. Ph.D. Thesis, Pukyong National University, Korea, 1-130.
- 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*). *Kor. J. Aquacult.*, 19, 47-51.
- Lin, F., L. Liu and K. Dabrowski. 1996. Characteristics

- of muskellunge spermatozoa. I: Ultrastructure of spermatozoa and biochemical composition of semen. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 125, 187-194.
- Morisawa, M. 1985. Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleosts. *Zool. Sci.*, 2, 605-615.
- Ohta, H., H. Shimma and K. Hirose. 1995. Effects of freezing rate and lowest cooling pre-storage temperature on post-thaw fertility of amago and masu salmon spermatozoa. *Fish. Sci.*, 61, 423-427.
- Yamano, K., N. Kasahara, E. Yamaha and F. Yamazaki. 1990. Cryopreservation of masu salmon sperm by the pellet method. *Bull. Fac. Fish., Hokkaido Univ.*, 41, 149-154.
- 
- 2008년 4월 25일 접수  
2008년 8월 11일 수리