발생과 생식 제 16권 제 2호, 77~85 (2012)
Dev. Reprod. Vol. 16, No. 2, 77~85 (2012)

담수순화 감성돔(*Acanthopagrus schlegeli*) 정자의 냉동보존 조건별 활성평가

정민환[1] · 임한규[1] · 도용현[1] · 김종현[1] · 손맹현[1] · 장영진[2,†]

[1]국립수산과학원 양식관리과, [2]부경대학교 해양바이오신소재학과

Assessment of Sperm Activity of Black Porgy(*Acanthopagrus schlegeli*) Acclimated in Freshwater on Cryopreservation Condition

Min Hwan Jeong[1], Han Kyu Lim[1], Yong Hyun Do[1], Jong Hyun Kim[1], Maeng Hyun Son[1] and Young Jin Chang[2,†]

[1]Aquaculture Management Division, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-902, Korea
[2]Dept. of Marine Bio-materials and Aquaculture, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

ABSTRACT : Various cryoprotective agents (CPA) were tested to establish the best conditions for the cryopreservation of sperm from black porgy *Acanthopagrus schlegeli* acclimated and raised in freshwater (BFW). Survival rates of frozen/thawed sperm from BFW were higher in the order of dimethy sulfoxide (DMSO), glycerol, ethylene glycol (EG) and methanol. Sperm motility was higher in the order of glycerol, DMSO, EG and methanol. These effects were the same in thawed sperm from black porgy raised in seawater (BSW). Thus, optimum CPA for sperm cryopreservation of BFW and BSW were DMSO and glycerol where the highest survival rates and sperm motility were found at the concentration of 10%. In particular, the survival rates and motility of thawed sperm from BFW and BSW after cryopreservation using 10% DMSO were better than when cryopreserved using 10% glycerol. On the other hand, for the thawed sperm from both BFW and BSW, the longer the preservation period was, the lower the survival rates and sperm motility were. Notably, the higher the concentration of CPA was, the lower the survival rates and sperm motility were.

Key words : *Acanthopagrus schlegeli*, Freshwater acclimation, Sperm activity, Cryoprotective agents, Cryopreservation

요 약 : 담수에서 사육한 감성돔 *Acanthopagrus schlegeli*(담수감성돔) 냉동/해동 정자의 생존율이 가장 높았던 결빙억제제(cryprotective agent, CPA)는 dimethyl sulfoxide(DMSO)였으며, 다음으로 glycerol, ethylene glycol(EG) 그리고 methanol 순이었다. 해동 후 정자운동성은 glycerol, DMSO, EG, methanol 순으로 높았으며, 이상의 결과들은 해수에서 사육한 감성돔(해수감성돔)에서도 나타났다. 담수 및 해수감성돔 정자의 냉동보존시 적정 CPA는 DMSO와 glycerol이었으며, 생존율과 정자운동성이 가장 높았던 적정 농도는 모두 10%였다. 특히 10% DMSO로 냉동보존한 담수 및 해수감성돔 해동정자의 생존율과 정자운동성은 10% glycerol로 냉동보존한 해동정자보다 높게 나타났다. 냉동보존기간에 따른 담수 및 해수감성돔 해동정자의 생존율과 정자운동성을 측정한 결과, 대부분 보존기간이 길어질수록 감소하였으며, CPA의 농도가 높을수록 생존율과 정자운동성은 급격히 감소하였다. 그러나 5% DMSO로 냉동보존한 해동정자의 생존율 및 정자운동성은 차이는 보이지 않았다.

서 론

최근 양식산업에 유용한 어패류 및 멸종위기 종의 배우자를 장기간 보존하려는 연구가 세계 각국에서 진행되고 있으며, 이중 정자의 냉동보존에 관한 연구는 이미 오래전부터 활발히 진행되어왔다(Chang & Chang, 2002; Billard et al., 2004). 어류 정자의 냉동보존에 관한 연구는 Blaxter(1953)

† 교신저자: 장영진, 부산광역시 남구 대연3동 599-1 부경대학교 수산과학대학 해양바이오신소재학과. (우) 608-737, (전) 051-629-5915, (팩) 051-629-5908, E-mail: yjchang@pknu.ac.kr

가 청어(*Clupea pallasii*) 정자의 냉동보존을 성공적으로 이룬 이후, 유용 어류의 정자 냉동보존에 관한 많은 연구결과가 보고되고 있다. 어류 정자의 냉동보존 기술은 양식 어류의 종묘생산에 있어 어미의 방란 · 방정 시기가 불일치하거나 성비가 고르지 못할 때 발생하는 채란 · 채정의 비동시화 문제를 해결할 수 있으며, 자성선숙 및 웅성선숙 어종의 인공수정을 용이하게 한다. 또한 수컷 어미의 사육관리에 소요되는 노력과 경비를 절약할 수 있으며, 우량종의 선택교배를 가능하게 하고, 우량종과 유전공학에 의해 생산된 신품종 어류의 격리보존이나 멸종위기에 놓인 재래종의 보존을 간편하게 할 수 있다(Chang et al., 1997; Choi et al., 2007; Chung et al., 2011).

Jeong 등(2010)은 감성돔(*Acanthopagrus schlegeli*)을 장기간 담수에서 사육하였을 때, 정상적인 성장과 생리활성을 보였으며, 생식 및 내분비계 호르몬의 분비 활성도 정상적이었다고 하였다. 또한 담수에 장기간 사육하더라도 정자형성 및 생식주기 등의 번식생리와 관련된 기본특성도 변하지 않아 정액이 정상적으로 방출된다고 하였다. 그러나 이와 같은 담수사육 감성돔의 정자라 할지라도 염분이 0 psu인 담수에서는 운동성을 획득하지 못하여 정상적인 수정이 이루어지기 어렵다. 따라서 담수사육 감성돔을 사용한 종묘생산에서는 수정 및 부화를 위한 적절한 수질환경이 만들어지기 전까지는 배우자를 저장하거나, 담수사육 감성돔 정자를 새로운 유전자원으로서 장기간 안정적으로 보존할 필요가 있다. 이를 위하여 현 단계에서는 냉동보존 방법이 가장 효과적이라 할 수 있다.

어류 정자의 냉동보존시 해동 후 정자의 생존율 및 운동성을 유지하기 위하여 다양한 결빙억제제(cryoprotective agent, CPA), 희석액, 평형시간, 냉동률 및 해동률 등에 대한 종별 최적조건을 탐색하게 되는데, 이중 CPA는 어류 정자의 냉동과 해동시 빙결정형성 및 동해를 억제하는 핵심적인 역할을 한다. 어류 정자의 냉동보존시 주로 사용하는 CPA로 dimethyl sulfoxide(DMSO), ethylene glycol(EG), glycerol, methanol 등이 있으며, 연구대상 종별로 적정 CPA와 농도를 결정해야 한다. 본 연구에서는 장기간 담수에서 사육한 감성돔(담수감성돔)으로부터 채취한 정자의 효과적인 냉동보존을 위한 적정 CPA와 농도를 조사하고, 냉동보존기간에 따른 정자의 생존율 및 운동성을 파악하여, 해수사육 감성돔(해수감성돔)의 정자와 비교하였다.

재료 및 방법

실험에 사용한 정액은 담수 및 해수 순환여과수조에서 1년 이상 장기간 실내 사육한 2년생 감성돔(담수감성돔: 전장 22.5±1.8 cm, 체중 232.4±55.6 g, 해수감성돔: 전장 21.7±1.9 cm, 체중 185.0±47.3 g)으로부터 채취하였다. 담수감성돔은 Min 등(2003)의 방법을 이용하여 해수(32 psu)에서 사육 중인 감성돔을 10 psu의 저염분 해수에서 24시간 동안 안정시킨 후, 담수(0 psu)로 옮겨 1년 이상 사육하였다. 실험어로부터 정액을 채취하기 이전에 배설물에 의한 정액 오염을 방지하기 위하여 채정 24시간 전부터 절식시켰으며, 실험어를 200 ppm 2-phenoxyethanol로 마취한 다음 복부를 부드럽게 압박하여 채정하였다. 채취한 정액 중 일부를 인공해수(32 psu, pH 7.7; NaCl 27 g, KCl 0.7 g, CaCl2 1.2 g, $MgCl_2$ 4.6 g, $NaHCO_3$ 0.5 g, 증류수 1,000 mL)에 희석하여 생존율이 98% 이상이며 운동성이 매우 활발한 정액만 실험에 사용하였다.

CPA 종류 및 농도에 따른 담수 및 해수감성돔 정자의 냉동보존 효과를 비교하기 위하여 희석액은 해수감성돔 정장의 이온조성을 바탕으로 제조한 인공정장(artificial seminal plasma, ASP; osmolality 320 mOsm/kg, pH 7.7, NaCl 10.05 g, KCl 0.29 g, $CaCl_2$ 0.66 g, $MgCl_2$ 0.57 g, glucose 1.05 g $NaHCO_3$ 1.0 g, 증류수 1,000 mL), CPA는 DMSO, EG, glycerol 및 methanol를 사용하였으며, 농도는 각각 5, 10, 15 및 20%로 하였다. 시료의 냉각과정에서 CPA가 농도별로 첨가된 희석액에 정액을 4:1의 비율로 희석하여 3분간 평형시간을 준 다음, 0.5 mL straw에 봉입하였다. 이후 각 straw를 액체질소 증기(−76℃)로 3분간 1차 냉각한 다음, 액체질소(−196℃)에 바로 넣어 급속 냉각하였다. CPA 종류 및 농도별로 냉동된 정액 straw를 보존 당년(24시간), 보존 1년 그리고 보존 2년 후에 25℃의 항온수조에 30초간 급속 해동 후 정자의 생존율 및 운동성을 측정 · 비교하였다.

냉동보존한 정자의 생존율을 측정하기 위하여 해동된 각각의 정액을 5% eosin-10% nigrosin(Blom, 1950; Fribourgh, 1966)에 염색한 다음, 정자의 염색 정도에 따라 생존 여부를 판별하였으며, 광학현미경으로 각각 3회 측정하여, 전체 정자수에 대한 살아있는 정자수의 비율로 생존율을 나타내었다. 또한 정자의 운동성을 평가하기 위하여 해동된 정액을 인공해수와 1:100의 비율로 희석하여 정자운동성 관찰용

Table 1. Numerical index for the evaluation of sperm activity index (SAI)

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

SAI = score × % motile sperm / 100.

slide glass(Teflon Printed Glass Slide; 21 wells; diameter of each well, 4 mm; Funakoshi Co., Japan) 위에 5 μL씩을 분주하여 cover slide 없이 운동성을 광학현미경으로 관찰하였다. 정자의 운동성은 Table 1의 운동지수에 따라 점수를 부여하고, 각각의 운동점수와 운동정자의 비율에 따라 Strüssmann 등(1994)의 방법을 변형하여 정자활성지수(sperm activity index, SAI)를 계산하였다.

모든 측정값은 평균±표준오차로 나타냈으며, 유의차는 SPSS-통계패키지(version 12.0)를 이용하여 independent samples *t*-test와 one-way ANOVA-test(Duncan's multiple range test)에 의해 검정하였다(P<0.05).

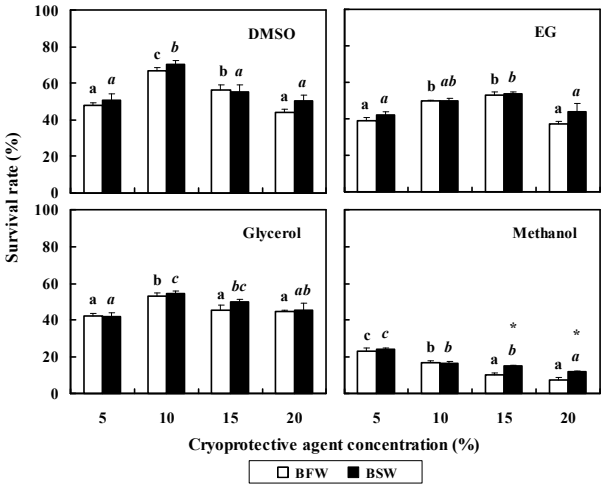

Fig. 1. Effects of various cryoprotective agents (CPA) and their concentrations on survival rate (%) of post-thawed sperm of black porgy *Acanthopagrus schlegeli* reared in freshwater (BFW) and seawater (BSW). Different small letters indicates significant differences among CPAs and between BFW and BSW (P<0.05). Asterisk indicates significant differences between post-thawed sperm of BFW and BSW in each CPA concentration (P<0.05). DMSO: dimethyl sulfoxide, EG: ethylene glycol.

결 과

1. 결빙억제제별 · 농도별 해동정자의 생존율 및 운동성

담수 및 해수감성돔 냉동정자의 해동 후 CPA 종류와 농도에 따른 생존율은 Fig. 1에서 보는 바와 같다. DMSO 농도에 따른 담수 및 해수감성돔 해동정자의 생존율은 5%에서 각각 48.0±1.5, 50.7±3.5%, 10%에서 67.0±1.7, 70.3±2.0%, 15%에서 56.0±3.2, 55.3±3.8% 그리고 20%에서 44.0±1.5, 50.3±3.2%로, 10% DMSO에서 다른 농도에 비해 생존율이 유의하게 높았다(P<0.05). EG 농도에 따른 담수 및 해수감성돔 해동정자의 생존율은 5%에서 각각 39.0±1.7, 42.3±1.5%, 10%에서 49.7±0.3, 50.0±1.2%, 15%에서 53.0±1.5, 54.0±0.6% 그리고 20%에서 37.3±1.2, 44.0±4.6%로, 10%와 15% EG에서 생존율이 높았다. Glycerol은 5%에서 각각 42.3±1.5, 42.0±2.1%, 10%에서 53.0±1.7, 54.7±1.2%, 15%에서 45.7±2.3, 50.0±1.2% 그리고 20%에서 44.7±0.9, 45.3±3.7%로, 10% glycerol에서 다른 농도에 비해 생존율이 높았다. Methanol 농도에 따른 담수 및 해수감성돔 해동정자의 생존율은 5%에서 각각 23.3±1.7, 24.0±1.2%, 10%에서 17.0±1.0, 16.3±0.9%, 15%에서 10.3±0.9, 15.0±0.6% 그리고 20%에서 7.7±1.5, 12.0±0.6%로, 5% methanol에서 다른 농도에 비해 생존율이 유의하게 높았다. 또한 각각의 CPA 농도에서 담수 및 해수감성돔 해동정자의 생존율은 5%와 10% methanol을 제외하고 모두 유의한 차이를 보이지 않았다(P>0.05).

담수 및 해수감성돔 냉동정자의 해동 후 CPA 종류와 농도에 따른 SAI는 Fig. 2에서 보는 바와 같다. DMSO 농도 따른 담수와 해수감성돔 해동정자의 SAI는 5%에서 각각 1.3±0.2, 1.7±0.2, 10%에서 2.7±0.2, 2.5±0.3, 15%에서 1.8±0.2, 1.7±0.2 그리고 20%에서 1.3±0.2, 1.3±0.2로, 10% DMSO에서 다른 농도에 비해 SAI가 높았다. EG 농도에서 SAI는 5%에서 각각 1.2±0.2, 1.2±0.2, 10%에서 각각 2.2±0.2, 2.2±0.2, 15%에서 1.7±0.2, 1.3±0.2 그리고 20%에서 1.0±0.0, 1.2±0.2로 10% EG에서 다른 농도에 비해 SAI가 높았다. Glycerol은 5%에서 각각 2.2±0.2, 2.2±0.2, 10%에서 2.5±0.3, 2.7±0.2, 15%에서 1.8±0.2, 1.7±0.2 그리고 20%에서 1.7±0.2, 1.5±0.3로, 10% glycerol에서 다른 농도에 비해 SAI

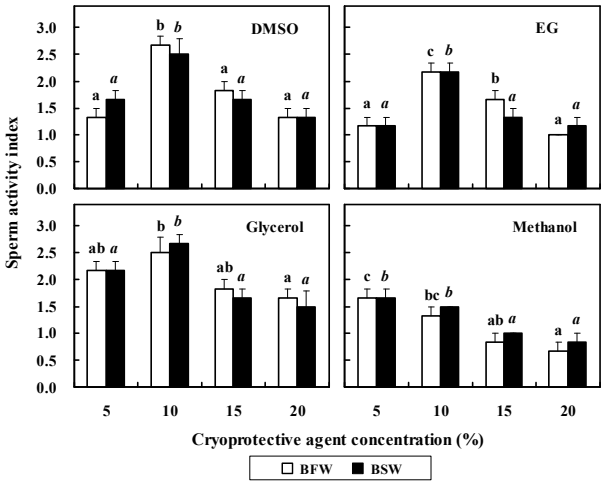

Fig. 2. Effects of various cryoprotective agents (CPA) and their concentrations on sperm activity index of post-thawed sperm of black porgy *Acanthopagrus schlegeli* reared in freshwater (BFW) and seawater (BSW). Different small letters indicates significant differences among CPAs and between BFW and BSW (P<0.05). Asterisk indicates significant differences between post-thawed sperm of BFW and BSW in each CPA concentration (P<0.05). DMSO: dimethyl sulfoxide, EG: ethylene glycol.

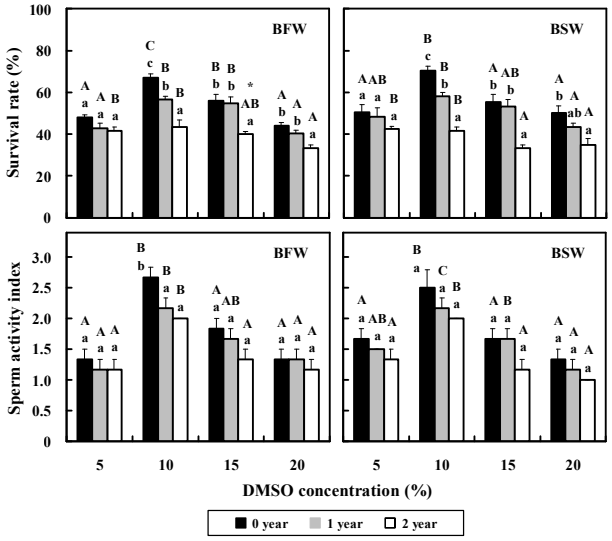

Fig. 3. Effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) concentrations and storage time on survival rate and sperm activity index of post-thawed sperm of black porgy *Acanthopagrus schlegeli* reared in freshwater (BFW) and seawater (BSW). Different small letters indicates significant differences between storage time (years) at each DMSO concentration (P<0.05). Different large letters indicates significant differences between DMSO concentrations at each storage time (P<0.05). Asterisk indicates significant differences between post-thawed sperm of BFW and BSW in each DMSO concentration and storage time (P<0.05).

가 높았다. Methanol 농도에 따른 담수 및 해수감성돔 해동정자의 SAI는 5%에서 각각 1.7±0.2, 1.7±0.2, 10%에서 1.3±0.2, 1.5±0.0, 15%에서 0.8±0.2, 1.0±0.0 그리고 20%에서 0.7±0.2, 0.8±0.2로, 5% methanol에서 다른 농도에 비해 SAI가 높았다. 각각의 CPA 농도에서 담수 및 해수감성돔 사이에 해동정자의 SAI는 모두 유의한 차이를 보이지 않았다(P>0.05).

2. DMSO 농도별 · 보존기간별 해동정자의 생존율 및 운동성

DMSO를 사용하여 냉동보존한 담수 및 해수감성돔 해동정자의 보존기간에 따른 생존율과 SAI는 Fig. 3에서 보는 바와 같다. DMSO 농도 5%에서 보존기간에 따른 담수감성돔 해동정자의 생존율은 보존기간에 상관없이 41.7±1.7～48.0±1.5%로 유의한 차이를 보이지 않았으나, 10%에서는 보존 당년에 67.0±1.7%, 보존 1년째에 56.7±1.7%, 보존 2년째에 43.3±3.3%로 보존기간이 길어질수록 생존율은 유의하게 감소하였다(P<0.05). 15%와 20%에서는 보존 1년까지 해동정자의 생존율이 각각 55.0±2.9～56.0±3.2%, 40.3±1.5～44.0±1.5%로 유의한 차이를 보이지 않았으나, 보존 2년째의 생존율은 각각 40.0±1.2%, 33.3±1.7%로 유의하게 감소하였다(P<0.05). 이와 같은 경향은 DMSO 농도 및 냉동보존 기간에 따른 해수감성돔 해동정자의 생존율에서도 유사하게 나타났다. 또한 DMSO 농도 15%, 보존 2년째의 담수감성돔 해동정자 생존율만 같은 조건의 해수감성돔 해동정자의 생존율보다 유의하게 높았을 뿐 각각의 DMSO 농도 및 보존기간에 따른 담수 및 해수감성돔 해동정자의 생존율은 유의한 차이를 나타내지 않았다(P>0.05).

담수감성돔 해동정자의 냉동보존 기간에 따른 SAI는 DMSO 농도 5%에서 보존기간에 상관없이 1.2±0.2～1.3±0.2로 유의한 차이를 보이지 않았다. 10%에서는 냉동보존 당년에 SAI가 2.7±0.2로 높았으나, 보존 1년과 2년에는 각각 2.2±0.2, 2.0±0.0으로 유의하게 감소하였다(P<0.05). 농도 15%로 냉

동보존한 담수감성돔 해동정자의 SAI는 보존 당년과 1년에 각각 1.8±0.2, 1.7±0.2에서 보존 2년째에 1.3±0.2로 감소하였으나, 보존기간에 따른 유의한 차이는 나타나지 않았다. 농도 20%에서 SAI는 보존기간에 상관없이 1.0±0.0~1.3±0.2로 유의한 차이는 없었으며, 농도 5%와 비슷한 SAI를 나타냈다. 이와 같은 경향은 해수감성돔 해동정자의 SAI에서도 나타나, DMSO로 냉동보존한 담수와 해수감성돔 해동정자의 보존기간에 따른 SAI는 각각의 농도에서 유의한 차이를 보이지 않았다. 또한 각각의 DMSO 농도 및 보존기간에 따른 담수와 해수감성돔 해동정자의 SAI는 유의한 차이를 나타내지 않았다(P>0.05).

3. EG 농도별 · 보존기간별 해동정자의 생존율 및 운동성

EG를 사용하여 냉동보존한 담수 및 해수감성돔 해동정자의 보존기간에 따른 생존율과 SAI는 Fig. 4에서 보는 바와 같다. EG 농도 5%에서 보존기간에 따른 담수감성돔 해동정자의 생존율은 보존 당년과 1년째에 각각 39.0±1.7%, 37.0±1.5%로 차이를 보이지 않았으나, 보존 2년째 생존율은 16.7±1.7%로 유의하게 감소하였다. 농도 10%에서 당년에 생존율은 49.7±0.3%, 보존 1년에 43.3±1.7%, 보존 2년에 31.0±2.1%로 보존기간에 길어질수록 생존율은 유의하게 감소하였다(P<0.05). 농도 15%에서 당년과 보존 1년째에 생존율은 각각 53.0±1.5%, 50.0±2.9%로 차이를 보이지 않았으나, 보존 2년에는 38.3±4.4%로 생존율은 유의하게 감소하였다(P<0.05). EG 농도 20%에서 당년과 보존 1년째에 생존율은 각각 37.3±1.2%, 33.3±1.7%로 차이를 보이지 않았으나, 보존 2년에 생존율은 10.0±5.3%로 다른 농도와 마찬가지로 유의하게 감소하였다(P<0.05). 이와 같은 경향은 해수감성돔 해동정자에서 나타났으며, 특히 15%와 20%로 냉동보존한 해수감성돔 해동정자의 생존율은 보존 당년과 보존 1년에 비해 보존 2년에 급격히 감소하였다.

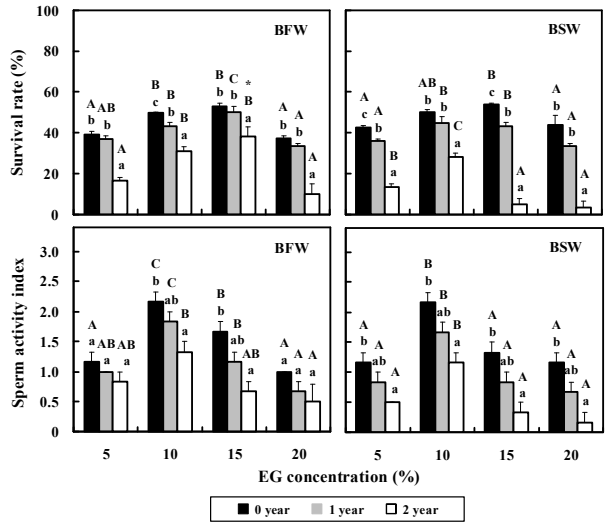

Fig. 4. Effects of ethylene glycol (EG) concentrations and storage time on survival rate and sperm activity index of post-thawed sperm of black porgy *Acanthopagrus schlegeli* reared in freshwater (BFW) and seawater (BSW). Different small letters indicates significant differences between storage time (years) at each EG concentration (P<0.05). Different large letters indicates significant differences between EG concentrations at each storage time (P<0.05). Asterisk indicates significant differences between post-thawed sperm of BFW and BSW in each EG concentration and storage time (P<0.05).

EG를 사용하여 냉동보존한 담수감성돔 해동정자의 보존기간에 따른 SAI는 농도 5%에서 보존기간에 상관없이 0.8±0.2~1.2±0.2로 차이를 보이지 않았다. 그러나 10%와 15%로 냉동보존한 해동정자의 생존율은 보존 당년에 각각 2.2±0.2, 1.7±0.2, 보존 1년째에 1.8±0.2, 1.2±0.2, 보존 2년째에 1.3±0.2, 0.7±0.2로 보존기간이 길어질수록 감소하였다(P<0.05). 농도 20%에서 생존율은 0.5±0.3~1.0±0.0으로 5%와 마찬가지로 차이를 나타내지 않았다. 해수감성돔 해동정자의 SAI는 모든 농도에서 담수감성돔 10%와 15%와 같이 보존기간이 길어질수록 유의하게 감소하는 경향을 보였다. 또한 각각의 EG 농도 및 보존기간에 따른 담수와 해수감성돔 해동정자의 SAI는 차이를 나타내지 않았다.

4. Glycerol 농도별 · 보존기간별 해동정자의 생존율 및 운동성

Glycerol를 사용하여 냉동보존한 담수 및 해수감성돔 해동정자의 보존기간에 따른 생존율과 SAI는 Fig. 5에서 보는 바와 같다. Glycerol 농도 5%에서 보존기간에 따른 담수감성돔 해동정자의 생존율은 보존 당년과 1년에 각각 42.3±1.5%, 38.3±2.0%로 차이를 보이지 않았으나, 보존 2년에 생존율은 31.7±1.7%로 유의하게 감소하였다(P<0.05). 농도 10%에서 당년에 생존율은 53.0±1.7%이었으나, 보존 1년과 2년에 생존율은 35.0±2.9%, 30.0±0.0%로 유의하게 감소하였다(P<0.05). 이와 같은 결과는 농도 15%와 20%에서도 나

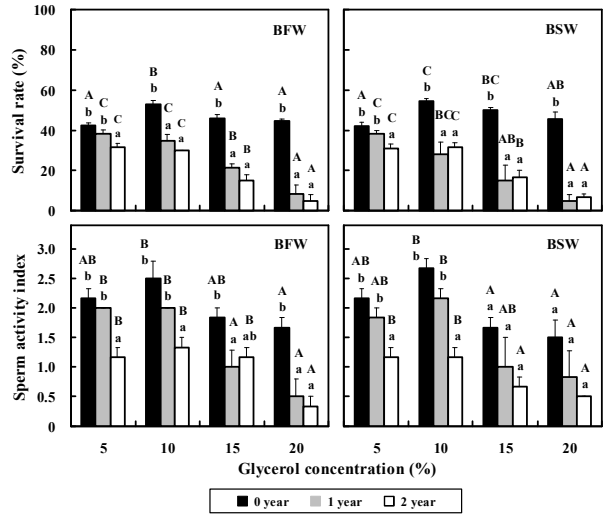

Fig. 5. Effects of glycerol concentrations and storage time on survival rate and sperm activity index of post-thawed sperm of black porgy *Acanthopagrus schlegeli* reared in freshwater (BFW) and seawater (BSW). Different small letters indicates significant differences between storage time (years) at each glycerol concentration (P<0.05). Different large letters indicates significant differences between glycerol concentrations at each storage time (P<0.05). Asterisk indicates significant differences between post-thawed sperm of BFW and BSW in each glycerol concentration and storage time (P<0.05).

타났으며, 특히 농도 20%에서는 보존 당년 생존율이 44.7±0.9%에서 보존 1년과 2년에 각각 8.3±4.4%, 5.0±2.9%로 생존율이 10% 미만으로 급격히 감소하였다. 이와 같은 경향은 해수감성돔 해동정자에서도 나타났다.

Glycerol를 사용하여 냉동보존한 담수감성돔 해동정자의 보존기간에 따른 SAI는 농도 5%와 10%에서 보존 당년에 각각 2.2±0.2, 2.5±0.3, 보존 1년에 각각 2.0±0.0, 2.0±0.0로 차이를 보이지 않았으나, 보존 2년에 5%와 10%의 생존율은 각각 1.2±0.2, 1.3±0.2로 유의하게 감소하였다. 농도 15%와 20%는 보존 당년의 SAI는 각각 1.8±0.2, 1.7±0.2이었으나, 보존 1년에 SAI는 각각 1.0±0.3, 0.5±0.3으로 유의하게 감소하였다. 이와 같은 경향은 해수감성돔 해동정자에서도 나타났으며, 각각의 glycerol 농도 및 보존기간에 따른 담수와 해수감성돔 해동정자의 SAI는 차이를 보이지 않았다.

5. Methanol 농도별 · 보존기간별 해동정자의 생존율 및 운동성

Methanol를 사용하여 냉동보존한 담수 및 해수감성돔 해동정자의 보존기간에 따른 생존율과 SAI는 Fig. 6에서 보는 바와 같다. Methanol 농도 5%에서 보존기간에 따른 담수감성돔 해동정자의 생존율은 보존 당년과 1년에 각각 23.3±1.7%, 21.7±1.7%로 차이를 보이지 않았으나, 보존 2년에 생존율은 13.3±1.7%로 유의하게 감소하였다(P<0.05). 10%에서 생존율은 당년에 17.0±1.0%, 보존 1년에 12.7±1.5%, 보존 2년에 10.0±2.9%로 차이를 보이지 않았다. 15%와 20%에서 보존 당년 생존율은 각각 10.3±0.9%, 7.7±1.5%이었으나, 보존 1년에는 각각 6.7±1.7%, 5.0±2.9%로 보존기간이 길어질수록 생존율은 유의하게 감소하였다(P<0.05). 특히 methanol 농도 20%, 보존 2년에 담수감성돔 해동정자의 생존율은 0%로 살아있는 정자는 관찰되지 않았다.

Methanol를 사용하여 냉동보존한 담수감성돔 해동정자의 보존기간에 따른 SAI는 농도 5%에서 보존 당년에 1.7±0.2에서 보존 1년과 2년째에 각각 0.7±0.2, 0.5±0.0로 유의하게

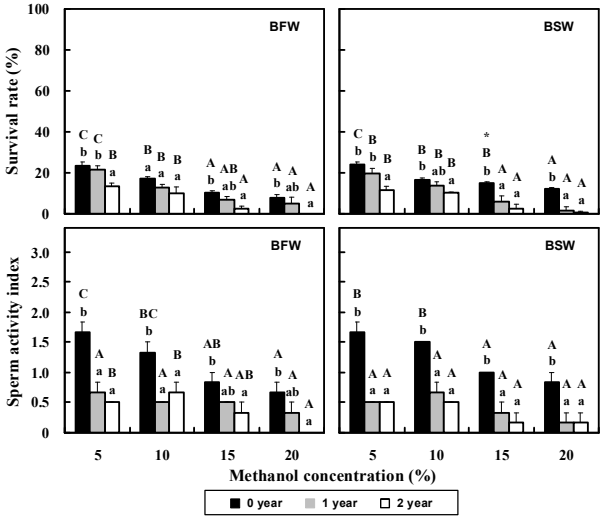

Fig. 6. Effects of methanol concentrations and storage time on survival rate and sperm activity index of post-thawed sperm of black porgy *Acanthopagrus schlegeli* reared in freshwater (BFW) and seawater (BSW). Different small letters indicates significant differences between storage time (years) at each methanol concentration (P<0.05). Different large letters indicates significant differences between methanol concentrations at each storage time (P<0.05). Asterisk indicates significant differences between post-thawed sperm of BFW and BSW in each methanol concentration and storage time (P<0.05).

감소하였다($P<0.05$). 이와 같은 경향은 다른 농도에서 동일하게 나타났으며, 해수감성돔 해동정자에서도 같은 결과를 보였다.

고 찰

정자의 냉동보존 효과에 영향을 미치는 주된 요인으로는 희석액, CPA, 평형시간, 냉동속도 및 해동온도 등이 있다. 이중 CPA는 세포내 삼투질농도 상승과 세포내외의 빙결정 형성 등을 완화·조절하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Jamiseon, 1991). 따라서 CPA는 중성물질이어야 하며, 친수성이 강하고, 세포막에 대한 투과성이 높고, 세포에 대한 독성이 적어야 한다. 현재 CPA로서 DMSO, EG, glycerol, proline, sucrose 그리고 methanol 등 여러 가지 물질들이 사용되고 있다. 그러나 각 어종의 정자는 CPA의 종류에 따라 종 특이적인 경향을 나타내기 때문에 모든 어류에서 공통적으로 사용될 수 있는 CPA는 아직 밝혀진 바 없으며, CPA가 세포 냉동시 세포를 보호하는 자세한 기구에 관해서도 아직 알려지지 않고 있다(Kho, 2007). 따라서 어류 정자의 냉동보존시 적정 CPA 종류 및 농도를 찾는 것은 매우 중요한다.

몇몇 연구자가 감성돔 정자의 냉동보존에 관한 연구를 하였으며(Chao et al., 1986; Lim & Chang 1998), 이는 해수에서 정상적으로 성장·성숙된 어류로부터 채정된 정액을 냉동보존한 연구의 결과이다. Lim과 Chang(1998)의 연구보고에 의하면 해수감성돔 정자의 냉동보존시 가장 적합한 CPA는 glycerol이었으며, 농도는 10%였다. 본 연구에서 담수감성돔 정자의 냉동·해동 후 생존율이 가장 높았던 CPA는 DMSO였으며, 다음으로 glycerol, EG 그리고 methanol 순이었다. 또한 SAI가 가장 높았던 CPA는 glycerol이었으며, 다음으로 DMSO, EG 그리고 methanol 순위로, 이와 같은 결과는 해수감성돔 해동정자에서 동일한 결과를 보였다. 따라서 담수 및 해수감성돔 정자의 냉동보존시 적정 CPA는 DMSO와 glycerol이라고 할 수 있으며, 이 두 CPA에서 생존율과 SAI가 가장 높았던 적정 농도는 모두 10%였다. 특히 10% DMSO는 10% glycerol로 냉동하여 해동한 담수 및 해수감성돔 정자의 생존율과 SAI보다 높게 나타나, 최적의 CPA와 농도라고 할 수 있다.

DMSO는 세포내로 투과속도가 빠르고, 세포막을 투과할 때 온도에 의한 영향을 받지 않기 때문에 다른 CPA보다 널리 사용되며(Jamieson, 1991), 참조기(*Larimichthys polyactis*), 황복(*Takifugu obscurus*), 강도다리(*Platichthys stellatus*), 참돔(*Pagrus major*) 등의 (Ciereszko & Dabrowski, 1993; Chang et al., 1999a; Lim et al., 2007; Kho, 2007) 어종에서 다른 CPA에 비해 냉동보존 효과가 좋은 것으로 보고되었다. 본 연구에서 glycerol 역시 담수 및 해수감성돔 정자의 냉동보존에 효과적인 것으로 나타났는데, glycerol은 DMSO보다 독성이 적은 것으로 알려져 있으며(Jamieson, 1991), 이전의 감성돔 정자의 냉동보존에서는 DMSO보다 냉동보존 효과가 좋은 것으로 나타내었다(Lim & Chang, 1998). 담수어종인 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)나 산천어(*Oncorhynchus masou* masou)의 정자 냉동보존에서 methanol은 DMSO, glycerol 등 다른 CPA보다 좋은 결과를 보였다(Lahnsteiner et al., 1997, 2002; Lim et al., 2008). 본 연구에서 담수감성돔 정자의 냉동보존시 CPA로 methanol을 사용했을 때 생존율과 SAI이 가장 낮게 나타나, 다른 CPA보다 냉동보존 효과가 낮은 것으로 보인다. 따라서 장기간 담수환경에서 사육한 담수감성돔 정자라 할지라도 정자 냉동보존시 CPA 효과는 해수감성돔 정자와 동일하게 작용하는 것으로 판단된다.

일반적으로 어류의 정자 냉동보존에 관한 연구는 CPA 종류 및 농도 따라 해동정자의 생존율, 운동성 및 세포손상 등을 조사한 것으로(Jamieson, 1991; Gwo et al., 1993; Chang et al., 1999b), 정자를 액체질소(−196℃)에 며칠 또는 몇 개월 보존 후 결과를 나타낸 것이 대부분이다. 이것은 CPA가 처리된 정자가 액체질소에 들어가면 세포의 모든 대사 작용뿐만 아니라, CPA가 세포에 미치는 영향(독성) 또한 정지될 거라는 판단으로 인한 것이다. 이로 인해 장기간 냉동보존에 따른 정자의 생존율 및 운동성에 미치는 CPA 영향에 관한 연구는 매우 드물었으며, 최근에서야 몇몇 연구자가 중요성을 인식하여 연구결과를 발표하기 시작했다(Liu et al., 2010; Chen et al., 2010).

본 연구에서 어류 정자의 냉동보존시 가장 많이 사용되고 있는 4개의 CPA를 4개의 농도로 담수 및 해수감성돔 정자를 냉동보존하여 3년간 측정한 결과, 대부분 보존기간이 길어질수록 생존율과 SAI는 감소하였다. 특히 CPA 농도가 높을수록 생존율과 SAI는 확연히 감소하였다. 그러나 5% DMSO로 냉동보존한 해동정자의 생존율 및 SAI는 차이는 보이지 않았다. 따라서 담수 및 해수감성돔 정자의 장기간 냉동보존을 위해서 5% DMSO를 CPA로 사용하는 것이 안정적인 것

으로 추정된다. 본 연구결과에서 어종별 정자 냉동보존을 위한 적정 CPA와 농도는 다른 어종이나 장기간 보존을 위한 조건이 될 수 없다는 것을 알 수 있었다. 따라서 앞으로 정자 냉동보존에 관한 연구는 장기보존을 위한 적정 CPA와 농도를 조사하는 것뿐만 아니라, 장기간 냉동보존 중에 CPA가 세포에 미치는 영향에 관해 세밀한 연구가 진행되어야 할 것이다. 또한 어류 정자의 냉동보존시 보존기간동안 액체질소의 기화에 따른 보존용 straw의 노출로 인한 생존율 및 운동성 감소 등에 관한 문제점도 면밀하게 고려해야 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(과제번호: R01-2004-000-10251-0)와 국립수산과학원 경상과제(과제번호: RP-2012-AQ-004) 지원으로 수행되었습니다.

인용문헌

Billard R, Cosson J, Noveiri SB, Pourkazemi M (2004) Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. Aquaculture 236:1-9.

Blaxter JHS (1953) Sperm storage and cross fertilization of spring and autumn spawning herring. Nature 172: 1189-1190.

Blom E (1950) A one-minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. Fertil Steril 1:176-177.

Chang YJ, Chang YJ (2002) Milt properties of four flatfish species and fine structure of their cryopreserved spermatozoa. J Fish Sci Tech 5:87-96.

Chang YJ, Chang YJ, Lim HK (1997) Cryopreservation of tiger puffer (*Takifugu rubripes*) sperm. Dev Reprod 1:29-36.

Chang YJ, Lim HK, Chang YJ, Kim HS (1999a) Sperm cryopreservation and fertility of post-thaw sperm on river puffer, *Takifugu obscurus*. J Aquacult 12:1-5.

Chang YJ, Lim HK, Chang YJ, Kim HS, Huh HT (1999b) Physico-chemical properties and cold storage of river puffer (*Takifugu obscurus*) milt. J Kor Fish Soc 32: 243-246.

Chao NH, Chao WC, Liu KC, Liao IC (1986) The biological properties of black porgy, *Acanthopagrus schlegeli* and its cryopreservation. Proceedings of the National Science Council of the Republic of China, Part B life Sciences 10:145-149.

Chen YK, Liu QH, Li J, Xiao ZZ, Xu SH, Shi XH, Ma D (2010) Effect of long-term cryopreservation on physiological characteristics, antioxidant activities and lipid peroxidation of red seabream (*Pagrus major*) sperm. Cryobiology 61:189-193.

Choi HY, Jo PG, Kim TI, Bai SC, Chang YJ (2007) The effects of cryopreservation on fine structures of pearl oyster (*Pinctada fucata martensii*) larvae. Dev Reprod 11:79-84.

Chung JK, Lim HK, Son MH, Kim JH, Jeong MH, Chang YJ (2011) Effects of concentration and immersion time of three cryoprotective agents on the embryos development of Abalone *Haliotis discus hannai*. Dev Reprod 15:301-308.

Ciereszko A, Dabrowski K (1993) Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique. Aquaculture 109:367-373.

Fribourgh JH (1966) The application of a differential ataing method to low-temperature studieds on goldfish spermatozoa. Prog Fish-Cult 28:227-231.

Gwo JC, Kurokura H, Hirano R (1993) Cryopreservation of spermatozoa from rainbow trout, common carp and marine puffer. Nippon Suisan Gakkaishi 59:777-782.

Jamieson BGM (1991) Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa. With a survey of lophophorate, echinodern and photochordate sperm and an account of gamete cryopreservation. Cambridge University Press, Cambridge. xiv +319 pp.

Jeong MH, Lim HK, Kim YS, Kim SY, Chang YJ (2010) Sperm collection time, sex steroid hormones and gonadal development of black porgy, *Acanthopagrus schlegeli* acclimated in freshwater. Kor J Fish Aquat Sci 43:474-481.

Kho KH (2007) Effects of cryoprotectants and diluents on cryopreservation of the red seabream, *Pagrus major* sperm. Kor J Ichthyol 19:173-177.

Lahnsteiner F, Mansour N, Weismann T (2002) A new technique for insemination of large egg batches with cryopresered semen in the rainbow trout. Aquaculture 209:359-367.

Lahnsteiner F, Weismann T, Patzner RA (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.

Lim HK, Chang YJ (1998) Effects of diluents and cryoprotectants on cryopreservation of black porgy (*Acanthopagrus schlegeli*) sperm. J Aquacult 11:67-75.

Lim HK, An CM, Noh GA, Min BH (2007) Effects of diluents and cryoprotectants on sperm cryopreservation in starry flounder (*Platichthys stellatus*). J Aquacult 20:173-177.

Lim HK, Lee CH, Min BH, Lee JU, Lee CS, Seong KB, Lee SM (2008) Effects of diluents and cryopretectants on sperm cryoperservation of masou salmon, *Oncorhynchus masou* masou. J Kor Fish Soc 41:267-271.

Liu QH, Chen YK, Xiao ZZ, Li J, Xu SH, Shi XH (2010) Effect of storage time and cryoprotectant concentretions on the fertilization rate and hatching rate of cryopreserved sperm in red seabream (*Pagrus major* Temminck and Schlegel, 1983). Aquacult Res 41:89-95.

Min BH, Kim BK, Hur JW, Bang IC, Byun SK, Choi CY, Chang YJ (2003) Physiological responses during freshwater acclimation of seawater-cultured black porgy (*Acanthopagrus schlegeli*). Kor J Ichthyol 15:265-275.

Strüssmann CA, Renard P, Ling H, Takashima F (1994) Motility of pejerrey *Odontesthes bonariensis* spermatozoa. Fish Sci 60:9-13.

(Received 18 January 2012, Received in revised form 16 May 2012, Accepted 21 May 2012)