

## 4배체 참굴(*Crassostrea gigas*)의 정자 동결보존

박미선 · 민병화\* · 임현정 · 허영백 · 도용현 · 명정인

국립수산과학원 양식관리과, <sup>1</sup>서해수산연구소 해역산업과, <sup>2</sup>남동해수산연구소

### Sperm Cryopreservation of Tetraploid Pacific Oysters *Crassostrea gigas*

Mi Seon Park, Byung Hwa Min\*, Hyun-Jeong Lim<sup>1</sup>, Young baek Hur<sup>2</sup>, Yong Hyun Do and Jeong-In Myeong

Aquaculture Management Division, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-902, Korea

<sup>1</sup>West Sea Fisheries Research Institute, National Fisheries Research and Development Institute, Incheon 400-420, Korea

<sup>2</sup>Southeast Sea Fisheries Research Institute, National Fisheries Research and Development Institute, Tongyeong 650-943, Korea

The goal of this study was to evaluate the effects of cryoprotectants [dimethyl sulfoxide (DMSO), methanol, polyethylene glycol, and propylene glycol], cryoprotectant concentrations (10% and 20%), equilibration time (3, 10, and 30 min), cooling rate (3°, 5°, 7°, and 10°/min), and straw size (0.25 and 0.5 mL) for sperm cryopreservation of tetraploid Pacific oysters. There was a significant difference among the four cryoprotectants, with 10% DMSO yielding the highest post-thaw survival and activity index of sperm. A significant relationship was observed between the cryoprotectant and its concentration. The sperm with equilibration times of 30 min yielded higher post-thaw survival and activity indices than those with 3 and 10 min equilibration times. The sperm cooled at a rate of 5°/min yielded the highest post-thaw survival and activity index, and the results were significantly different from those observed for cooling at 7° and 10°/min. Post-thaw survival and activity indices of sperm using a 0.25-mL straw were significantly higher than those using a 0.5-mL straw.

Key words: Tetraploid, Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, Sperm, Cryopreservation

### 서론

참굴(*Crassostrea gigas*)은 우리나라에서 매우 중요한 양식 대 상품종으로 2013년 양식생산량은 약 24만톤으로 국내 패류 양식생산량의 80% 이상을 차지하고 있다(MOF, 2014). 그러나 1960년대 이후 지금까지 50여 년 동안 지속된 양식으로 인하여 어장의 노후화가 갈수록 심화되고 있으며, 인구 증가와 산업의 발달에 따른 생활하수와 산업폐수 등으로 양식환경이 점차 열악해져 가고 있다. 또한 근년에는 정확한 원인은 규명되고 있지 않고 있으나, 이상 기후, 생물학적 및 이화학적 환경 오염의 부가적 작용에 기인한 유생의 채묘부진 현상과 성패의 비만도 저하 등이 지속적으로 발생하여 참굴 양식어가에 상당한 경제적 인 손실을 초래하고 있다.

지금까지 우리나라에서는 양성용 참굴 인공종묘는 2배체(diploid)에 국한하여 생산되어져 왔으나, 최근 염색체 조작에

의한 3배체 굴 양식은 미국, 프랑스, 호주, 중국 등 많은 나라에서 각광받고 있다. 그 이유는 3배체(triploid) 참굴은 2배체에 비해 질병내성이 강하며, 생물학적으로 불임이기 때문에 성숙에 필요한 에너지를 성장과 육질부 비만에 이용할 수 있으며, 또한 주 산란철인 여름철에도 수확이 가능하기 때문이다(Guo et al., 1996; Park et al., 1999). 따라서 3배체 참굴 양식은 현재와 같이 열악해져 가는 양식환경에서 보다 높은 생산성과 수익성을 기대해 볼 수 있다. 3배체 굴은 1980년대 Stanley et al. (1981)에 의해 버지니아굴(*Crassostrea virginia*)에서 최초로 유도된 바 있으며, 1990년대 말까지 주로 cytochalasin B 처리로 제 2극체를 억제하는 방법으로 생산되었는데, 이후로는 4배체(tetraploid) 굴이 생산됨에 따라 정상 2배체와 4배체를 교배하여 3배체를 생산하고 있다(Guo et al., 1996; Eudeline et al., 2000a, 2000b). 3배체 생산시 화학적인 방법과 비교해 볼 때, 2배체와 4배체의 교배에 의한 방법은 100% 신뢰할 수 있으며, 또한 높

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2014.0853>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Kor J Fish Aquat Sci 47(6) 853-859, December 2014

Received 12 September 2014; Revised 24 November 2014; Accepted 9 December 2014

\*Corresponding author: Tel: +82. 51. 720. 2432 Fax: +82. 51. 720. 2439

E-mail address: pkmbh@korea.kr

은 생존율을 보인다(Guo and Allen, 1994; Wang et al., 1999). 따라서 4배체의 육종혈통을 이용하는 것은 3배체 생산에 있어 매우 중요하며, 이를 위한 4배체 참굴 정자의 냉장·동결보존은 4배체 참굴 육종을 위한 결정적인 기술 중의 하나가 될 수 있다. 현재 우리나라에서는 국립수산물과학원에서 3배체 참굴 생산을 위하여 4배체 참굴을 자체적으로 소량 생산하고 있으나, 아직까지는 미국으로부터 4배체 모패를 대부분 들여오고 있는 실정이다. 그러나 이들 모패(수컷)의 수입은 그 과정(수송, 검역 등)에서 건강 및 번식생리상태에 악영향을 미쳐 성숙·방정이 원활하지 않을 수 있으며, 이는 최종적으로 2배체와의 교배를 어렵게 만드는데, 4배체 참굴 정자동결보존은 이를 해결하기 위한 방법이 될 수 있다.

2배체 참굴의 정자동결보존은 국내외적으로 그 기술이 확립되어져 왔으나(McFadzen, 1995; Adams et al., 2004; park et al., 2013), 4배체의 경우 Dong et al. (2005a, 2006) 연구를 제외하고는 거의 찾아볼 수 없는 실정이며, 또한 이들 연구의 결과, 4배체 정자를 동결보존하여 해동하였을 때 운동성, 수정률 및 부화율이 2배체 정자보다 현저히 낮은 것으로 나타나, 아직 4배체 정자의 동결보존에 대한 연구가 더 이루어져야 할 것으로 여겨진다. 따라서 본 연구에서는 4배체 참굴 정자동결보존의 확립에 기여하고자 적정 동해방지제, 평형시간, 냉각속도 등을 탐색하였다.

**재료 및 방법**

**실험 모패 및 정자 현탁액**

4배체 참굴 모패는 2014년 3월 20일에 미국 4Cs Breeding Technologies, Inc.로부터 구입하여 국립수산물과학원 남동해수산연구소 남해센터의 1톤 FRP에 유수식으로 수육하였다. 구

입당시 모패는 미성숙상태였으며, 모패의 성숙을 위해 *Tetra-selmis suecica*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Nitzschia closterium*을 혼합하여 먹이로 매일 5톤씩 공급하였다. 7월 25일 모패를 무작위로 잡아 패각에 3 mm 구멍을 내어 암수구별 및 성숙상태를 확인하였으며, 총 3마리의 수컷을 선별하여 국립수산물과학원 양식관리과 실험실로 옮겨 정자동결보존에 사용하였다 (Fig. 1)(Table 1).

수송 직후 각 개체의 생체로부터 정소를 적출한 후 Calcium-free Hanks' balanced salt solution (C-F HBSS: 450 mM NaCl, 18 mM KCl, 3 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 14 mM NaHCO<sub>3</sub>, 18 mM glucose)와 1:10 (w/v)으로 혼합하여 정자 현탁액을 만들어 4℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

**동해방지제**

4배체 정자동결보존에 사용된 동해방지제는 dimethyl sulfoxide (DMSO), methanol (MeOH), polyethylene glycol (PEG, weights of 200), propylene glycol (PG) 총 4가지를 사용하였으며, 동해방지제 농도는 동결보존할 총량(동해방지제+정자현탁액량)의 10%와 20%로 하였다. 본 실험에 사용된 모든

Table 1. Basic parameters of tetraploid Pacific oyster *Crassostrea gigas* used for this experiments

No.	Shell length (mm)	Shell height (mm)	Shell width (mm)	Total weight (g)	Meat weight (g)
1	33.80	54.30	17.55	18.31	2.97
2	38.51	72.29	21.88	37.08	6.36
3	38.36	81.16	30.82	47.13	8.10

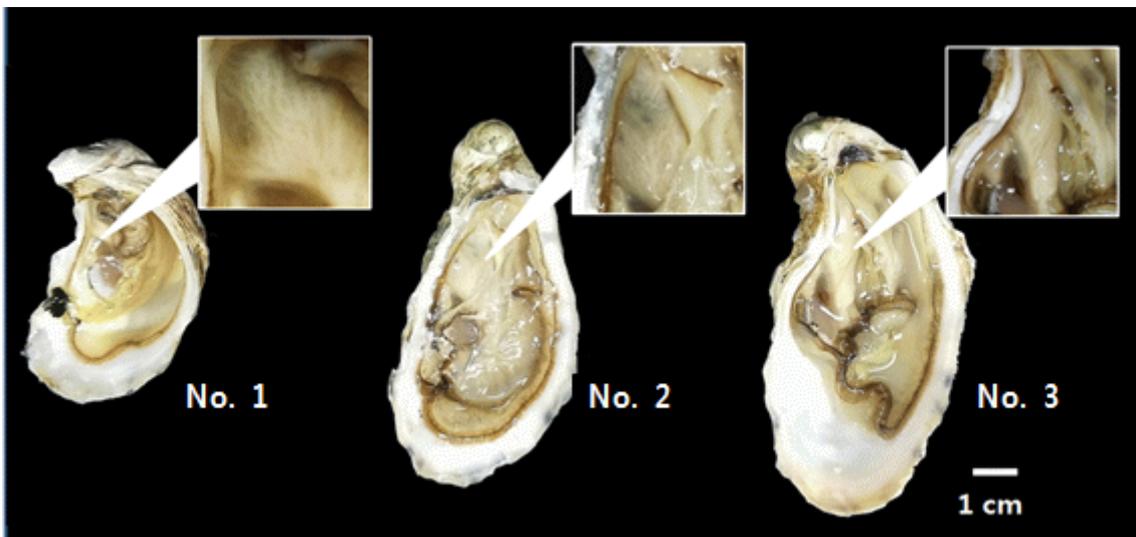


Fig. 1. Testis development of tetraploid Pacific oyster *Crassostrea gigas*, used in this experiments.

시약은 Sigma-Aldrich Co.의 제품을 사용하였다.

평형시간

동결보존시 평형시간 조건을 구명하기 위하여 정자 현탁액을 동해방지제 종류별, 농도별로 혼합한 다음 평형시간을 3, 10, 30 분으로 설정하였다. 이때 정자 냉각속도는 -80℃까지 분당 3℃로 냉각시킨 후, 액체질소(-196℃)로 옮겼다.

냉각방법 및 속도

평형시간 노출 이후 냉각은 프로그램 동결기(Computer Controlled Rate Freezer 14S, SY-LAB, Austria)를 이용하여 4가지의 속도(냉각률)로 하였다:실온→-80℃ (3, 5, 7, 10℃/분)→액체질소. 동해방지제 및 평형시간은 각각 10% DMSO 및 30분으로 하였으며, 0.25 mL straw를 사용하였다.

Straw

동결보존시 적정 straw의 크기를 조사하기 위하여 0.25 및 0.5 mL의 2가지 straw (Cassou, IMV, France)를 사용하였다. 이때 동해방지제 및 평형시간은 각각 10% DMSO 및 60분으로 하였으며, 동결은 -80℃까지 분당 3℃로 냉각시킨 후, 액체질소(-196℃)로 옮겼다.

동결보관 및 해동

정자 동결후 액체질소에서 24시간 보관하였으며, 이후 straw를 30℃항온수조에서 7초간 급속 해동한 다음 정자의 생존율 및 운동성을 측정하였다.

정자 생존율 및 운동성

정자의 생존 및 운동성은 동결 전·후의 정자현탁액 2 μL를 C-F HBSS 40 μL와 섞어 정자 운동성 관찰용 슬라이드글라스 (Teflon Printed Glass Slide; 21 wells; diameter of each well, 4 mm; Funakoshi Co., Japan)에 2 μL를 분주하여 광학현미경 (Axio Scope A1, Carl Zeiss, Germany)으로 관찰하였다. 운동성을 가지는 모든 정자는 생존한 것으로 간주하였으며, 생존율이 1% 이하는 1%로 나타내었다. 정자 운동성은 운동지수(Table 2)에 따라 점수를 부여 하고, 각각의 운동점수와 운동정자의 비율에 따라 Strüssmann et al. (1994)의 방법을 변형하여 정자 활성지수(sperm activity index, SAI)로 나타내었다.

통계분석

모든 실험은 3회 반복으로 수행하였으며, 결과값은 평균±표준편차로 나타내었다. 유의차는 SPSS-통계패키지(version

Table 2. Score for the evaluation of sperm activity index (SAI)

Score	Motility characteristics
3	Sperm display forward movement rapidly
2	Sperm display forward movement slowly
1	Sperm display forward movement moderately
0	Immobile sperm

SAI = score × % motile sperm/100.

18.0)를 이용하여 one or two way ANOVA-test (Duncan's multiple range test) 및 t-test 의해 검정하였다(P<0.05).

결 과

정자 생존율 및 정자활성지수

3마리의 4배체 참굴 정자의 동결보존 전 생존율은 88.8±2.1-92.6±1.2%였으며, 정자활성지수(SAI)는 2.7±0.1-2.8±0.1로 개체간의 유의적 차이를 보이지 않았다(Table 3).

평형시간에 따른 정자의 해동후 생존율 및 SAI

동결보존시 평형시간별 동해방지제에 따른 정자의 해동후 생존율 및 SAI를 조사한 결과, 평형시간이 3분일 때, 모든 동해방지제에서 해동후 생존율이 1%이하, SAI는 0.01로 나타났다(Table 4). 평형시간이 10 및 30분일 때, 해동후 생존율은 DMSO가 다른 동해방지제보다 유의하게 높았으며, 또한 DMSO와 MeOH의 10%가 20%보다 높았다(Fig. 2). 해동후 SAI는 생존율과 동일한 양상으로 나타났다.

실험에 사용한 10% 동해방지제를 대상으로 평형시간별 해동후 생존율 및 SAI의 유의차를 검증한 결과, DMSO 및 MeOH에서는 10 및 30분이 3분보다 유의하게 높았으며, PEG와 PG에서는 30분이 3 및 10분보다 유의하게 높았다(Table 4).

냉각속도 따른 정자의 해동후 생존율 및 SAI

동해방지제로 10% DMSO를, 평형시간은 30분, 0.25 mL straw를 사용하였을 때, 냉각속도에 따른 정자의 해동후 생존율 및 SAI는 Fig. 3에 나타내었다. 냉각속도가 분당 3, 5℃/분일 때 생존율은 각각 17.0±3.1%, 18.4±1.8%로 7, 10℃/분의 11.4±1.9%, 7.6±0.7%보다 유의하게 높았다. 또한 SAI 역시 생존율과 유사한 경향을 보였다.

Straw 크기에 따른 정자의 해동후 생존율 및 SAI

동해방지제로 10% DMSO를, 평형시간은 30분, 냉각속도는

Table 3. The survival and activity index (SAI) of sperm from 3 tetraploid Pacific oyster *Crassostrea gigas* before the cryopreservation

Survival			SAI		
No.1	No.2	No.3	No.1	No.2	No.3
88.8±3.6	91.1±3.9	92.6±2.1	2.7±0.1	2.7±0.1	2.8±0.1

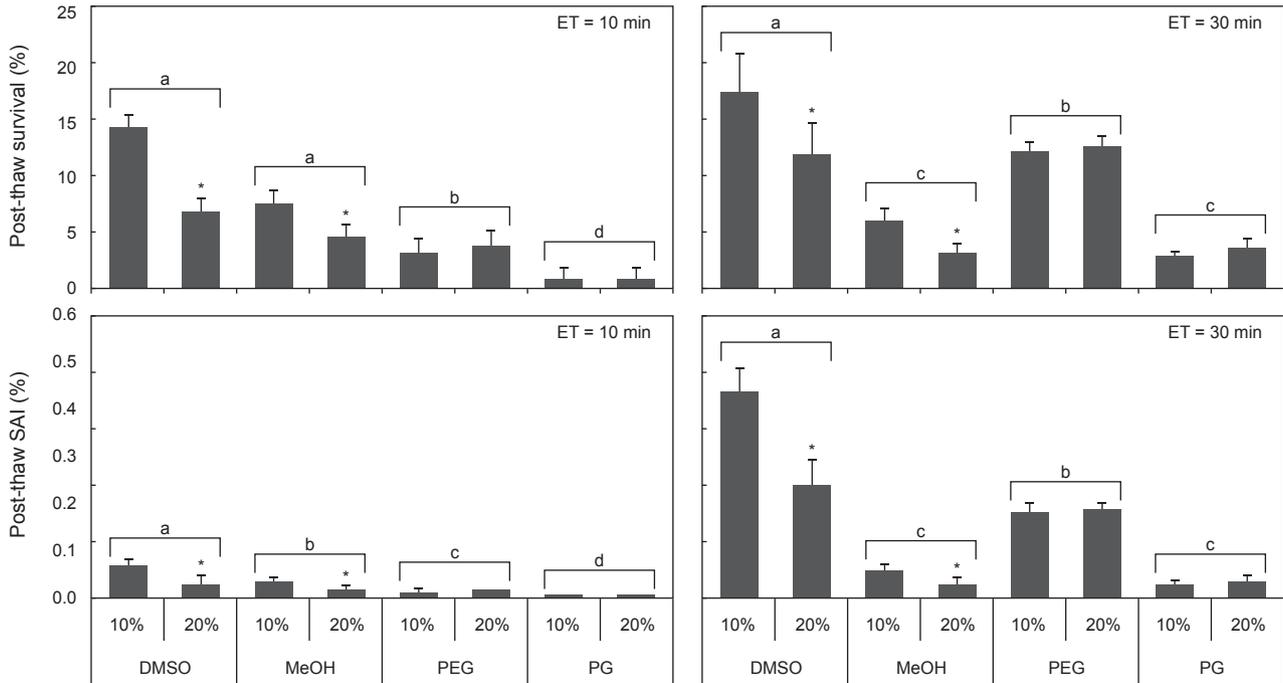


Fig. 2. Post-thaw survival and activity index (SAI) of sperm suspended in 4 cryoprotectant agents (CPAs) at equilibration time of 10 and 30 min. ET: equilibration time. Different letters indicate significant differences between CPA groups ( $P < 0.05$ ). \*Significant difference between 10% and 20% of CPAs ( $P < 0.05$ ).

Table 4. Post-thaw survival and activity index (SAI) of sperm suspended in various cryoprotectant agents (CPAs) of 10% at equilibration time of 3, 10 and 30 min

Equilibration time (min)	DMSO			MeOH			PEG			PG		
	3	10	30	3	10	30	3	10	30	3	10	30
Survival (%)	1±0 <sup>a</sup>	14.5±1.8 <sup>b</sup>	17.7±1.9 <sup>b</sup>	1±0 <sup>a</sup>	7.8±0.6 <sup>b</sup>	6.1±1.1 <sup>b</sup>	1±0 <sup>a</sup>	3.3±0.7 <sup>b</sup>	12.3±0.3 <sup>c</sup>	1±0 <sup>a</sup>	1±0 <sup>a</sup>	3.1±0.3 <sup>b</sup>
ASI	0.01±0 <sup>a</sup>	0.07±0.01 <sup>a</sup>	0.44±0.03 <sup>b</sup>	0.01±0 <sup>a</sup>	0.04±0.01 <sup>b</sup>	0.06±0.01 <sup>c</sup>	0.01±0 <sup>a</sup>	0.02±0 <sup>a</sup>	0.18±0.01 <sup>b</sup>	0.01±0 <sup>a</sup>	0.01±0 <sup>a</sup>	0.03±0 <sup>a</sup>

Different letters indicate significant differences between equilibration time of each CPA ( $P < 0.05$ ).

DMSO, dimethyl sulfoxide; MeOH, methanol; PEG, polyethylene glycol; PG, propylene glycol.

3°C/분을 사용하였을 때, straw 크기에 따른 정자의 해동후 생존율 및 SAI는 0.25 mL에서 각각 17.0±3.1%, 0.43±0.08로 0.5 mL의 2.1±0.5%, 0.01±0보다 유의하게 높았다(Fig. 4).

### 고찰

4배체 참굴의 정자동결보존은 이미 Dong et al. (2005a, 2006) 이 시도한 바 있으나, 해동 후 운동성은 2배체에 비해 매우 떨어지는 것으로 나타나고 있다. 본 연구는 Dong et al. (2006)이 확립한 동결보존 방법을 바탕으로 동해방지별 농도, 평형시간, 동결속도 등의 조건을 보다 확장하여 해동 후 운동성에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다.

동해방지제는 정자의 동결보존 시 가장 중요한 요소로 세포

내 삼투질농도와 빙결정형성 등을 완화·조절하는 역할을 한다 (Jamieson, 1991). 따라서 동해방지제는 중성물질이어야 하며, 친수성이 강하고, 세포막에 대한 투과성이 높고, 세포에 대한 독성이 적어야 한다(Kuwano and Saga, 2000). 그러나 각 어종의 정자는 동해방지제의 종류에 따라 종 특이성을 보이기 때문에 모든 어류에서 공통적으로 사용할 수 있는 동해방지제는 아직 밝혀진 바 없으며, 동해방지제가 세포 동결시 세포를 보호하는 자세한 메커니즘에 관해서도 아직 알려지지 않고 있다 (Kho, 2007). 또한 동해방지제는 세포에 독성을 나타내므로 정자의 동결보존시 적정 동해방지제 종류 및 농도를 찾는 것은 매우 중요하다. 동해방지제는 크게 투과성과 비투과성으로 나눌 수 있는데(Meryman, 1971), 본 연구에서는 투과성인 DMSO,

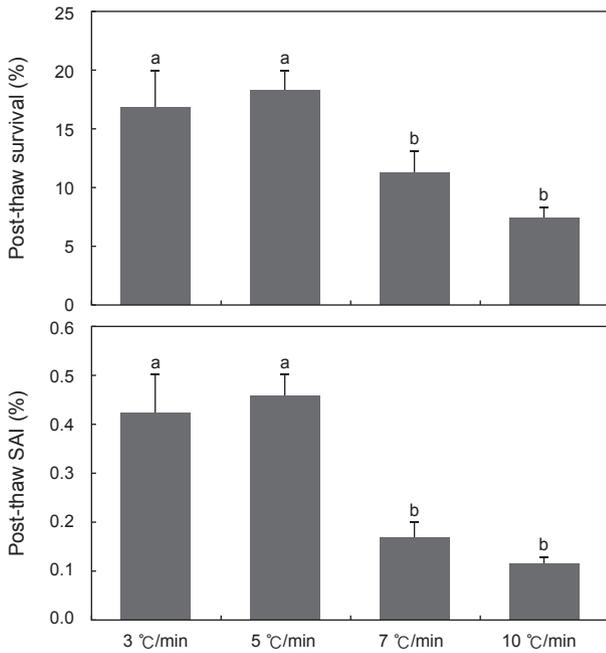


Fig. 3. Post-thaw survival and activity index (SAI) of sperm suspended in 10% DMSO at equilibration time of 30 min using 4 cooling rate. Different letters indicate significant differences between cooling methods ( $P<0.05$ ).

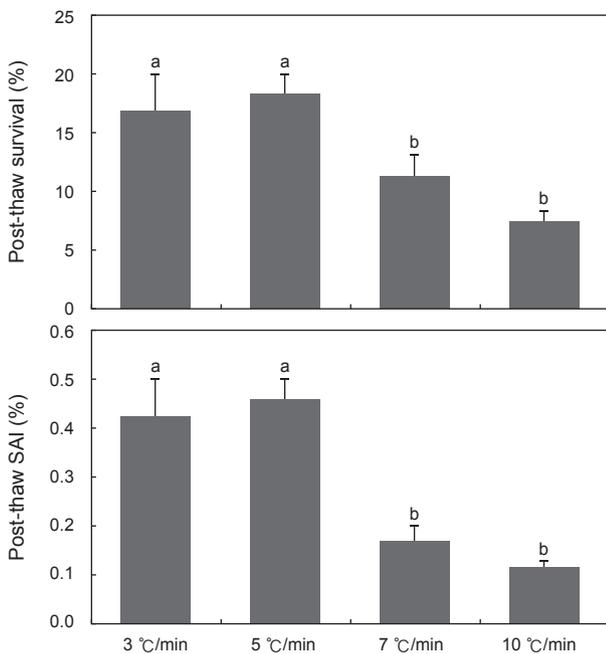


Fig. 4. Post-thaw survival and activity index (SAI) of sperm suspended in 10% DMSO, equilibration time of 30 min in 0.25 mL or 0.5 mL straw. \*Significant difference in straw size ( $P<0.05$ ).

MeOH, PEG, PG를 사용하여 4배체 참굴의 정자를 동결한 결과, 10% DMSO가 가장 적합한 것으로 나타났다. Park et al. (2013)에 따르면 2배체 참굴의 정자동결보존 역시 DMSO가 가장 적합한 동해방지제로 보고하였으며, 그 농도가 15, 10, 20% 순으로 나타났다. 본 연구에서는 정액량의 부족으로 15% 농도를 설정하지는 못하였지만, 아마도 15% DMSO이 적정 농도의 가능성도 배제할 수는 없다. 그러나 2배체 및 4배체 참굴의 정자동결보존시 20%의 DMSO 농도는 정자에 독성을 미치는 것으로 확인 되었다. Dong et al. (2006)은 4배체 참굴 정자동결보존시 동해방지제 2가지를 혼합하였을 때(4% DMSO+6% PEG), 해동후 운동성이 가장 높았으나, 동해방지제 단독 사용 시에는 10% DMSO가 가장 양호하다고 보고하여 본 연구와 유사하였다. 일반적으로 DMSO 이외에도 MeOH은 수서 생물의 정자 동결보존에 광범위하게 사용되는 동해방지제로 알려져 있지만(Tiersch, 2000), 굴에서는 MeOH을 동해방지제로 적합하지 않은 것으로도 보고된 바 있다(Smith et al., 2001). 그러나 Dong et al. (2005b)은 2배체 참굴 정자동결보존시 동해방지제로 MeOH이나 MeOH+PEG를 혼합이 가장 적합하다고 발표하였다. Arctic charr *Salvelinus alpinus*의 정자동결보존시 동해방지제로 20% glycerol이 10% DMSO보다 낫다고 알려져 있지만(Piironen, 1993), 다른 연구에서는 반대의 결과가 나타나고 있다(Richardson et al., 2000). 이처럼 동일종에서 조차 적정 동해방지제가 다르게 나타나는 현상이 종종 나타나 실험적 방법에 대한 논란이 되고 있지만, 아직 이에 대한 정확한 이유는 알려져 있지 않다.

정자의 동결전 평형시간은 동해방지제가 정자에 침투하는데 필요하며, 독성을 최소화해야 한다. 일반적으로 적정 평형시간은 어종, 동해방지제와 동해방지제 종류, 온도에 따라 달라진다(Christensen and Tiersch, 1996; Billard and Zhang, 2001; Sansone et al., 2002). 본 연구에서는 10% DMSO를 동해방지제로 사용하였을 때, 평형시간이 3분인 경우 해동후 생존율 및 SAI가 각각 1% 이하, 0.01 이하로 매우 낮았던 반면 30분일 때에는 생존율 및 SAI가 각각 17.7%, 0.44로 가장 높았으나, Park et al. (2013)은 2배체에서는 평형시간이 3분일 때 10% DMSO에서 생존율이 60%이상, SAI는 2이상으로 보고하여 본 연구의 4배체와는 다른 결과를 보였다. 4배체의 정자동결보존시 적정 평형시간이 2배체보다 긴 이유는 4배체 정자의 세포막이 2배체보다 두꺼워 동해방지제가 침투하는 시간이 더 소요되기 때문인 것으로 추정된다. 실제로 4배체 정자의 침체, 정자머리, 미토콘드리아, 꼬리는 2배체의 것 보다 유의하게 크므로(Dong et al., 2005c), 이는 막의 두께 또한 클 가능성을 뒷받침해준다.

정자의 동결보존시 적정 냉각속도는 동해방지제의 종류와 농도뿐만 아니라 희석액, 평형시간, 냉각방법에 따라 좌우된다(Babiak et al., 1999). 굴의 정자동결보존을 위한 냉각속도는 1°C/min부터 액체질소로 바로 냉각하는 것까지 광범위하게 보고된 바 있다(Hughes, 1973; Hwang and Chen, 1973; Dong et

al., 2006). 본 연구에서는 냉각속도를 분당 3, 5, 7, 10°C로 설정하였으며, 5°C에서 가장 해동후 생존율 및 SAI가 높았으나 3°C와는 유의한 차이를 보이지 않았으며, 냉각속도가 빠를수록 생존율은 낮아지는 것으로 나타났다. Dong et al. (2006) 역시 4배체 참굴의 정자동결보존시 적정 냉각속도는 분당 5°C로 보고한 바 있으며, 본 연구와 일치하였다.

수서생물의 정자동결보존시 사용되는 다양한 크기의 straw 또는 cryovial (동결보존용기)은 그 목적에 따라 다르게 사용되는데, 일반적으로 대용량 용기는 주로 현장에서 종묘생산에 사용되며(Richardson et al., 2000; Cabrita et al., 2001), 0.25 mL straw와 같은 소용량 용기는 정자량이 제한적인 어종에 주로 사용된다(Huang et al., 2004). 정자동결보존시 straw의 용량이 작을수록 해동후 운동성이 높다는 결과가 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*) (0.5 mL vs. 1.8 mL vs. 5.0 mL straw) (Cabrita et al., 2001), yellowtail flounder *Pleuronectes ferrugineus* (0.25 mL vs. 1.7 mL straws) (Richardson et al., 1999), 채널메기(*Ictalurus punctatus*) (0.25 mL vs. 0.5 mL straws) (Christensen and Tiersch, 1997). 본 연구에서도 0.25 mL straw를 사용하였을 때 해동후 생존율이 0.5 mL straw보다 8배 정도 높았다. 이처럼 소용량의 straw에서 더 나은 결과가 나오는 것은 소용량의 straw는 대용량의 straw보다 용량에 대한 표면적 비율이 더 높아 냉각 또는 해동시에 열 전달이 균일하고 빠르기 때문이다(Pickett and Berndtson, 1974). 그러나 Dong et al. (2006)은 4배체 참굴의 정자동결보존시 0.25 및 0.5 mL straw 사용시 해동후 운동성에 유의한 차이가 없다고 하여 본 연구와는 다른 결과를 보였는데, 이는 straw 크기에 대한 효과가 아마도 동해방지제, 냉각속도, 해동방법에 따라 달라질 수 있음을 의미한다.

이상의 결과를 종합해 보면, 4배체 참굴 정자동결보존시 적정 동해방지제 및 농도는 10% DMSO이며, 평형시간은 30분, 냉각속도는 분당 5°C, straw 크기는 0.25 mL로 나타났다. 그러나 이때의 해동후 생존율 및 SAI는 각각 18.4% 및 0.46으로 2배체 참굴 정자의 해동후와 비교해 볼 때 4배 정도 낮은 것으로 비교되었다. 이러한 이유는 4배체 참굴 정자가 2배체보다 그 크기가 커므로 4배체 정자에서는 동결보존시 동해방지제 침투가 원활하지 않아 동해를 많이 받았기 때문인 것으로 추정되며, 추후 이에 대한 현미경적 관찰이 필요할 것으로 보인다. 앞으로 4배체 정자의 해동후 생존율 및 운동성을 향상시키기 위해서는 다양한 동해방지제를 대상으로 그 농도, 평형시간, 냉각 및 해동 속도에 대한 연구가 더 많이 이루어져야 할 것으로 사료된다.

## 사 사

본 연구는 국립수산과학원 "해역특화 생태통합양식(IMTA) 기술 개발" 과제(RP-2014-AQ-114)의 연구비 지원에 의해 수행되었다.

## References

- Adams SL, Smith JF, Roberts RD, Janke AR, Kaspar HF, Tervit HR, Pugh PA, Webb SC and King NG. 2004. Cryopreservation of sperm of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): development of a practical method for commercial spat production. *Aquaculture* 242, 271-282.
- Babiak I, Fraser L, Dobosz S, Goryczko K, Kuzminski H and Strzezek J. 1999. Computercontrolled freezing of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) spermatozoa for routine programmes. *Aquacult Res* 30, 707-710.
- Billard R and Zhang T. 2001. Techniques of genetic resource banking in fish. In: *Cryobanking the Genetic Resource: Wildlife Conservation for the Future*. Walson PF and Holt WV, eds. Taylor & Francis, New York, USA, 143-170.
- Cabrita E, Robles V, Alvarez R and Herraes MP. 2001. Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization. *Aquaculture* 201, 301-314.
- Christensen JM and Tiersch TR. 1996. Refrigerated storage of channel catfish sperm. *J World Aquacult Soc* 3, 340-346.
- Christensen JM and Tiersch TR. 1997. Cryopreservation of channel catfish spermatozoa: effect of cryopreservation, straw size, and formulation of extender. *Theriogenology* 47, 639-645.
- Dong Q, Eudeline B, Huang C, Allen Jr SK and Tiersch TR. 2005a. Commercial-scale sperm cryopreservation of diploid and tetraploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Cryobiology* 50, 1-16.
- Dong Q, Huang C, Eudeline B, Allen Jr SK and Tiersch TR. 2006. Systematic factor optimization for sperm cryopreservation of tetraploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Theriogenology* 66, 387-403.
- Dong Q, Huang C, Eudeline B and Tiersch TR. 2005b. Systematic factor optimization for cryopreservation of shipped sperm samples of diploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Cryobiology* 51, 176-197.
- Dong Q, Huang C and Tiersch TR. 2005c. Spermatozoal ultrastructure of diploid and tetraploid Pacific oyster. *Aquaculture* 249, 487-496.
- Eudeline B, Allen Jr SK and Guo X. 2000a. Optimization of tetraploid induction in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, using first polar body as a natural indicator. *Aquaculture* 187, 73-84.
- Eudeline B, Allen Jr SK and Guo X. 2000b. Delayed meiosis and polar body release in eggs of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in relation to tetraploid production. *J Exp Mar Biol Ecol* 248, 151-161.
- Guo X and Allen Jr SK. 1994. Viable tetraploids in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by inhibition of polar body I in eggs from triploids. *Mol Mar Biol and Biotechnol* 3, 42-50.

- Guo X, Debrosse G and Allen Jr SK. 1996. All-triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by mating tetraploids and diploids. *Aquaculture* 142, 149-161.
- Huang C, Dong Q, Walter RB and Tiersch TR. 2004. Sperm cryopreservation of green swordtail *Xiphophorus helleri*, a fish with internal fertilization. *Cryobiology* 48, 295-308.
- Hughes JB. 1973. An examination of eggs challenged with cryopreserved spermatozoa of the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Cryobiology* 10, 342-344.
- Hwang SW and Chen HP. 1973. Fertility of male oyster gametes after freeze-thawing. Chinese-American Joint Commission on Rural Reconstruction Fisheries Series 15, 1-5.
- Jamieson BGM. 1991. Fish evolution and systematics: Evidence from spermatozoa. With a survey of lophophorate, echinoderm and photochordate sperm and an account of gamete cryopreservation. Cambridge University Press, Cambridge, xiv 319.
- Kho KH. 2007. Effects of cryoprotectants and diluents on cryopreservation of the red seabream, *Pagrus major* sperm. *Korean J Ichthyol* 19, 173-177.
- Kuwano K and Saga N. 2000. Cryopreservation of marine algae: Cryopreservation of marine algae: Applications in biotechnology. In: Recent advances in marine biotechnology. Figerman M and Nagabhushanam R, eds. Volume 4: Aquaculture. Part A, Seaweeds and invertebrates. Science Publishers Inc., New Hampshire, 23-40.
- McFadzen IRB. 1995. Cryopreservation of sperm of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. In: Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Day JG and McLellan MR, eds. Humana Press, Totowa, New Jersey, U.S.A., 145-149.
- Meryman HT. 1971. Cryoprotective agents. *Cryobiology* 8, 173-183.
- Park MS, Lim HJ and Lee TS. 1999. Biological and chemical characterization of triploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in the waters of Tongyoung, Korea. *Bull Fish Res Dev Agency* 55, 31-40.
- Park MS, Min BH, Park JJ, Lim HJ, Myeong JI and Jeong MH. 2013. Cryopreservation of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* sperm. *Korean J Malacol* 29, 251-258.
- Pickett BW and Berndton WE. 1974. Preservation of bovine spermatozoa by freezing in straws: A review. *J Dairy Sci* 57, 1287-1301.
- Piironen J. 1993. Cryopreservation of sperm from brown trout (*Salmon trutta m. lacustris* L.) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Aquaculture* 116, 275-285.
- Richardson GF, Miller TL and McNiven MA. 2000. Cryopreservation of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), semen in various extenders and in three sizes of straw. *Aquacult Res* 31, 307-315.
- Richardson GF, Wilson CE, Crim LW and Yao Z. 1999. Cryopreservation of yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*) semen in large straws. *Aquaculture* 174, 89-94.
- Sansone G, Fabbrocini A, Ieropoli S, Langellotti A, Occidente M and Matassino D. 2002. Effects of extender composition, cooling rate, and freezing on the motility of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) spermatozoa after thawing. *Cryobiology* 44, 229-239.
- Stanley JG, Hidu H and Allen Jr SK. 1984. Growth of American oysters increased by polyploidy induced by blocking meiosis I but not meiosis II. *Aquaculture* 37, 147-155.
- Strüssmann CA, Renard P, Ling H and Takashima F. 1994. Motility of pejerrey *Odontesthes bonariensis* spermatozoa. *Fish Sci* 60, 9-13.
- Tiersch TR. 2000. Introduction. In: Cryopreservation in Aquatic Species. Tiersch TR and Mazik PM, eds. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. 19-26.
- Wang Z, Guo X, Allen Jr SK and Wang R. 1999. Aneuploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) as incidentals from triploid production. *Aquaculture* 173, 347-357.