

양서류 정자 동결보존 기술 개발의 중요성 및 적용

이지은 · 박준규 · 도윤호[†]

공주대학교 생명과학과

Importance and Application of Amphibian Sperm Cryopreservation

Ji-Eun Lee · Jun-Kyu Park · Yuno Do[†]

Department of Biological Sciences, Kongju National University, Korea

(Received : 28 July 2023, Revised : 4 October 2023, Accepted 4 October 2023)

요약

전 지구적으로 개체수가 감소하고 있는 양서류는 멸종 위기에 직면하고 있다. 서식지 파괴와 질병, 기후변화 및 환경 오염으로부터 위협에 처한 양서류의 생물다양성과 지속 가능한 관리를 위해, 각 국에서는 생태정보 파악 및 번식 생태학에 대한 활발한 연구를 진행하고 있다. 정자 동결보존은 양서류의 유전자 다양성 유지를 돕는 중요한 보조 생식 기술로 알려져 있으며, 여러 연구를 통해 기술 개발의 상당한 진전이 보고되었다. 그러나, 크기가 큰 양서류 정자 세포의 경우 삼투압 스트레스에 대한 높은 민감도로 인해, 종마다 최적의 동결보호제와 냉각 및 해동 속도가 다르다는 한계가 있다. 또한, 동결보호제의 농도에 따른 독성 유발과 동결보존 후 해동된 정자 세포의 수정 성공률 및 자손의 생존율의 장기적인 영향을 평가하는데 어려움이 있다. 본 문헌 고찰은 양서류 보존에 있어서 동결보존 기술 개발 중요성의 개요를 제공하며, 기존 동결 보존제의 한계점에 대한 최적 보존제의 조합 탐색의 필요성을 강조한다. 해동 후 수정과 번식 성공뿐만 아니라, 자손의 생존 및 생식 성공까지 장기적인 모니터링 평가 도입을 통해 양서류 보존 방법에 대한 기초 연구 자료로 활용될 수 있을 것이다.

핵심용어 : 개구리, 보조 생식 기술, 번식 생태, 양서류, 정자 동결보존

Abstract

Amphibian populations are declining globally, pushing many species to the brink of extinction. To promote biodiversity and sustainable management, countries are actively researching amphibian reproductive ecology. Sperm cryopreservation is a crucial assisted reproductive technology that aids in preserving the genetic diversity of amphibians. However, because amphibian sperm cells are sensitive to osmotic stress, the optimal cryopreservation method therefore differs from species to species. This literature review offers an overview of the significance of developing cryopreservation techniques for amphibian conservation and highlights the need to create optimal cryopreservation methods and the introduction of long-term monitoring (e.g., fertilization success and offspring reproduction) to advance cryopreservation technology development. This review can be used as basic research data for amphibian conservation methods.

Key words : anuran, amphibian, assisted reproductive technology, cryopreservation reproductive ecology

[†]To whom correspondence should be addressed.

Department of Biological Sciences, Kongju National University, Korea
E-mail : doy@kongju.ac.kr

• **Ji-Eun Lee** Department of Biological Sciences, Kongju National University, Korea / Graduate student (jelee00@smail.kongju.ac.kr)
• **Jun-Kyu Park** Department of Biological Sciences, Kongju National University, Korea / Ph.D. candidate (pjk8578@smail.kongju.ac.kr)
• **Yuno Do** Department of Biological Sciences, Kongju National University, Korea / Associate professor (doy@kongju.ac.kr)

1. 서 론

양서류는 그들이 서식하는 생태계에서 필수적인 역할을 하며 생물다양성 유지를 위해 그들의 생존이 중요하다 (Beebee, 1996). 그러나 서식지 파괴, 오염, 기후 변화 및 질병으로 많은 양서류 종들이 현재 개체 수의 감소와 멸종 위협을 받고 있다 (Beebee et al., 2005). 전 지구적인 양서류의 개체 수 감소는 보전 번식 프로그램 (Conservation Breeding Program, CBP)과 보조 생식 기술 (Assisted Reproductive Technology, ART)과 같이, 이들 종을 대상으로 지속가능한 보전 전략과 노력을 증가시켰다. 대표적인 보존 노력 중 하나는 정자 세포를 포함한 유전 물질을 보존하는 보조 생식 기술이다 (Strand et al., 2020). 매우 낮은 온도에서 세포를 보존하는 동결보존 (cryopreservation)은 오랜 기간 동안 유전 물질을 보존하는 데 유용한 도구로 알려져 있다 (Clulow et al., 2019). 특히 동결보존 기술은 유전적 다양성을 유지하고 유전 정보의 손실을 막는 데 도움이 되며, 유전 물질을 저장하고 운반할 수 있다는 장점이 있어, 다양한 종의 보조 생식 기술에 사용되고 있다

그러나 양서류 정자 세포의 동결보존에는 어려움이 있다. 양서류 정자 세포는 다른 종에 비해 민감하며, 성공적인 동결보존 방법을 개발하는 것은 어려운 과제이다 (Poo et al., 2019). 양서류 정자 세포는 크기가 크고 삼투압 스트레스에 민감해 동결보존 방법 개발을 더 어렵게 만든다. 그럼에도 불구하고, 연구자들은 양서류 정자 세포의 동결보존 방법 개발에 상당한 진전을 이루었다 (Kouba et al., 2009). 과정을 최적화하기 위해 동결보호제와 냉각 속도를 시험하고, 일부 연구는 양서류 정자 세포의 성공적인 동결보존을 보고하고 있다. 그러나 선행연구에 따르면, 각 종마다 최적의 동결보호제 종류와 농도 조건이 다른 것으로 나타난다 (Shishova et al., 2011; Pearl et al., 2017). 이러한 종별 특이성을 갖는 동결보존의 한계를 극복하고, 양서류 보존을 위한 잠재적인 응용 분야를 완전히 이해하기 위해 추가 연구가 필요하다 (Strand et al., 2020).

이 문헌고찰에서는 양서류 종 보존을 위한 동결보존의 중요성 개요를 제공하며, 국내외 개구리류 연구 상황, 양서류 정자 세포의 동결보존과 관련된 문제점 및 동결보존이 양서류 보존에 미치는 잠재적인 영향을 다뤘다. 또한 대한민국의 다양한 개구리류 보존을 위한 동결보존 기술의 개선과 완화에 중점을 둔 이 분야의 미래 연구 방향을 논의할 것이다.

2. 연구 결과

2.1. 국내 양서류 연구

국내 양서류는 2021 국가생물종목록 기준 남북한 총합 2목 7과 27종이 서식하고 있다 (Table 1). 국내에서 양서류 연구는 분류학, 생태학, 행동, 보존, 인간활동이 그들의 개체군에 미치는 영향 등 다양한 분야에서 진행되었다.

첫 번째로, 국내에 서식하는 양서류 종의 분포와 신종발굴 등 여러 연구가 진행되고 있다. 대표적인 사례는, 수원청개구리 (*Dryophytes suweonensis*)와 양산꼬리치레도롱뇽 (*Onychodactylus silanus*)을 발견하고 이에 대한 분류 및 생태 정보를 확보한 것이다 (Borzée et al., 2015; Borzée et al., 2022). 양서류의 생태학적 요구사항과 행동을 이해하는 것은 그들의 보존에 필수적이다. 국내 서식하는 양서류의 번식 습성, 먹이원, 서식지 선호도, 울음소리 등에 대한 연구가 진행되었고, 이러한 연구를 통해 양서류를 보호하고 보존하기 위한 전략을 개발하고 있다 (Shannon, 1956; Borzée et al., 2020). 대표적으로, 금개구리 (*Pelophylax chosonicus*)의 번식 생태학에 대한 연구는 멸종위기야생동물의 번식 성공과 개체군 동태에 대한 중요한 통찰력을 제공하였다 (Borzée et al., 2018, Oh et al., 2021).

두 번째로는 다양한 오염물질에 노출되는 양서류를 관리하기 위한 연구가 진행되었다. 양서류는 환경 오염물질과 오염에 민감해 생태계 건강의 중요한 생물학적 지표가 된

Table 1. The list of anuran species in South Korea

Scientific name	Common name	Legal protection status
<i>Bombina orientalis</i>	Oriental fire-bellied toad	-
<i>Bufo gargarizans</i>	Asiatic toad	Prohibited from capture
<i>Bufo raddei</i>	Mongolian toad	-
<i>Bufo stejnegeri</i>	Water toad	Prohibited from capture
<i>Dryophytes flaviventris</i>	Yellow-bellied treefrog	-
<i>Dryophytes japonica</i>	Japanese treefrog	-
<i>Dryophytes suweonensis</i>	Suwon treefrog	Endangered Wild Fauna and Flora Class I
<i>Kaloula borealis</i>	Boreal digging frog	Endangered Wild Fauna and Plants Class II
<i>Glandirana rugosa</i>	Japanese wrinkled frog	-
<i>Lithobates catesbeianus</i>	American bullfrog	-
<i>Pelophylax chosonicus</i>	Gold-spotted pond frog	Endangered Wild Fauna and Flora Class II
<i>Pelophylax nigromaculatus</i>	Black-spotted pond frog	-
<i>Rana amurensis</i>	Amur brown frog	-
<i>Rana coreana</i>	Korean brown frog	Prohibited from capture
<i>Rana dybowskii</i>	Dybowskii's brown frog	Prohibited from capture
<i>Rana huanrenensis</i>	Huanren brown frog	Prohibited from capture
<i>Rana uenoi</i>	Korean large brown frog	-

다. 국내에서는 증금속, 살충제, 내분비계교란물질 등 다양한 오염물질이 양서류 개체군에 미치는 영향을 조사했다 (Oh et al., 2002; Park et al., 2014). 이러한 연구는 양서류 개체군에 대한 잠재적인 위협을 파악하고, 오염 영향을 완화하기 위한 관리 전략을 수립에 기여할 수 있을 것이다 (Do et al., 2022).

세 번째로, 기후변화로부터 지속가능한 양서류의 보존을 위한 연구가 진행되었다. 기후변화는 양서류 개체군에게 중요한 큰 영향을 끼칠 수 있다. 기후변화로 인해 양서류의 서식지, 번식양상, 분포가 변할 수 있다. 국내에서 양서류에 대한 기후 변화 영향에 대한 연구는 취약한 종을 식별하고 기후변화로 인한 위협으로부터 그들을 보호하기 위한 보존 조치를 수립하는 데 이용되고 있다 (Kim et al., 2021).

네 번째로, 도시화 및 농업 활동에 의한 양서류의 서식지 보전에 관한 연구가 진행되었다. 인간 활동으로 인한 서식지 손실과 파편화는 대한민국 양서류 개체군에게 중요한 위협요인이다. 서식지 손실과 파편화가 양서류 중에 미치는 영향에 대한 연구는 보전이 필요한 핵심 지역을 식별하고 서식지 복원 노력을 수립하는데 활용되고 있다 (Roh et al., 2014; Kim et al., 2021). 국내 양서류의 보전 및 관리에 대한 연구는 이들 양서파충류와 그들의 서식지를 보호하기 위한 효과적인 전략을 개발하는 것을 목표로 한다. 이는 보호구역의 효과성, 환경규제의 역할, 포획 번식 및 재보급 프로그램과 같은 보전 노력의 성공을 연구하는 것이 포함되어 있다 (Lee et al., 2014).

2.2. 개구리 정자의 동결보존 국외 연구동향

1999년부터 2022년까지 개구리 동결보존에 대한 연구를 Web of Sciences에서 검색한 결과 총 45개의 문헌자료를 확인할 수 있었다 (Fig. 1a). 문헌 정보를 기반으로 텍스트 마이닝 기법을 이용해 문헌자료에서 빈번히 사용된 단어를 추출한 결과 동결보존 (cryopreservation)과 관련된 용어들과 생식기술 (reproductive technologies)에 대한 용어가 자주 사용되었다 (Fig. 1b). 동결보존 (cryopreservation)과 관련된 용어로는 cryopreservation, cryoprotectant synthesis (동결보호제 합성), cryoprotectants, freeze tolerance (동결내성), intracellular ice formation (세포 내 얼음 결정 형성) 등이 있으며, 생식기술 (reproductive technologies)과 관련된 용어로는 artificial fertilization (인공수정), assisted reproductive technologies (보조 생식 기술), hormone-releasing hormone (방출호르몬), hormonally induced sperm (호르몬 유도 정자), in-vitro fertilization (시험관 아기), oocytes (난모 세포), spermatozoa (정자) 등이 있다. 개구리 정자의 동결보존 관련 연구에 참여한 저자들의 국가를 분석한 결과 가장 많은 저자들이 미국 (USA, 74명) 국적의 연구자이다. 이어 호주 (AUSTRALIA)가 44명으로 두번째로 많으며, 러시아 (RUSSIA)는 20명, 캐나다 (CANADA)는 15명, 영국 (UK)은 11명으로 그 뒤를 잇는다 (Fig. 1c).

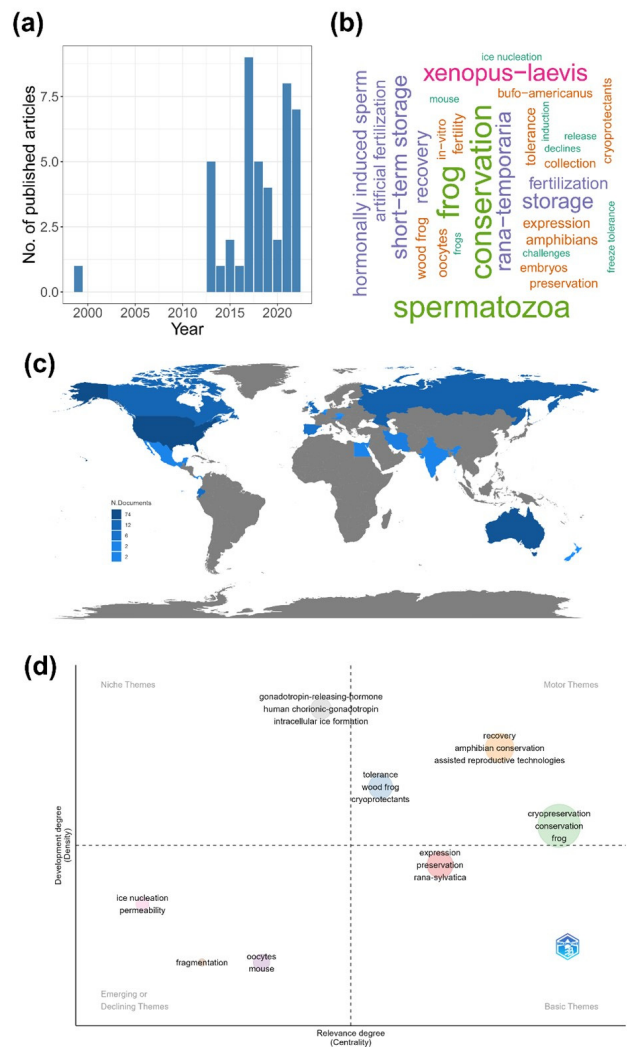


Fig. 1. The results of a text mining analysis of 45 research papers related to frog cryopreservation. The analysis included the following: (a) Number of Annual Publications: This indicates the number of research papers published each year on the topic of frog cryopreservation. (b) Wordcloud: This is a visual representation of the most frequently used words in the analyzed papers. The larger the word, the more frequently it appeared in the papers. (c) Authors' Countries: This shows the countries of the authors who published the papers related to frog cryopreservation. (d) Thematic Analysis: This is an analysis of the main themes and topics covered in the analyzed papers. The thematic analysis helps to identify the key research areas and trends in the field of frog cryopreservation.

문헌 정보를 이용해 주제분석 (Thematic analysis)를 실시한 결과 특화주제 (niche themes)는 호르몬주입과 관련된 연구이고, 등장/감소 주제 (emerging or declining themes)는 ice nucleation (얼음 핵), fragmentation (단편화), oocytes (난모 세포) 등이 포함된다. 주도적 주제 (motor themes)는 양서류 보존 기술과 동결보호제와 관련된 연구이다. 기본 주제 (basic themes)는 동결보존과 관련된 기초적인 방법을 다루는 연구이다 (Fig. 1d).

Table 2. Researched species in amphibian cryopreservation

Scientific name	Common name	Reference
<i>Anaxyrus boreas boreas</i>	Western toad	Clulow et al., 2019
<i>Atelopus spumarius</i>	Pebas stubfoot toad	Naranjo et al., 2022
<i>Bufo viridis</i>	European green toad	Derakhshan et al., 2017
<i>Epidalea calamita</i>	Natterjack toad	Arregui et al., 2020
<i>Limnodynastes peronii</i>	Striped marsh frog	Lawson et al., 2013
<i>Lithobates sylvaticus</i>	Wood frog	Al-attar et al., 2022
<i>Litoria aurea</i>	Green and golden bell frog	Gertrudes et al., 2017; Upton et al., 2021
<i>Litoria fallax</i>	Eastern dwarf tree frog	Upton et al., 2018
<i>Pelophylax lessonae</i>	Pool frog	Uteshev et al., 2013
<i>Rana temporaria</i>	European common frog	Uteshev et al., 2018; Kaurova et al., 2021b
<i>Rhinella marina</i>	Marine toad	Proano et al., 2017
<i>Rhaebo guttatus</i>	Smooth-sided toad	Hinkson et al., 2019
<i>Xenopus laevis</i>	African clawed frog	Pearl et al., 2017

Table 3. Frog sperm collection methods

Method	Invasiveness	Applicability	Steps involved	References
Massaging the Cloaca	Non-invasive	Common	Place frog in a container with water, massage cloaca gently until sperm are expelled.	Rhodes et al., 2022
Electro-ejaculation	Invasive	Rare	Stimulate the frog's reproductive tract with a small electrical current to induce ejaculation. This method is typically used when other methods have failed, or when a large number of sperm are needed quickly.	Willson et al., 1998
Hormonal Stimulation	Non-invasive	Rare	Inject the frog with hormones to stimulate the production of sperm. Place the frog in a container with water, collect sperm as they are released.	Della-Togna et al., 2018
Gentle Pressure	Non-invasive	Common	Place frog in a container with water, apply gentle pressure to the abdomen using a sterile instrument until sperm are released.	Kouba et al., 2009
Sperm Extraction	Invasive	Rare	Surgically extract sperm from the testes of a frog under anesthesia. Make a small incision in the body of frog to access the testes, which are then gently squeezed to extract the sperm.	Upton et al., 2021
Urine Collection	Non-invasive	Rare	Place frog in a container with water, massage abdomen gently until urine is released. Collect urine and examine for sperm.	Uteshev et al., 2013

Table 4. The Semen extender solution for frog cryopreservation

Semen extender solution	Representative composition	Characteristics	References
Modified Tyrode's solution	80 mM NaCl 13.5 mM NaHCO ₃ 11 mM Glucose 2.4 mM 1.8 mM 1.05 mM 20 mM Tris-HCl (pH 7.2)	This is a commonly used semen extender in cryopreservation studies. It typically contains salts, such as NaCl and , as well as buffering agents such as Tris and HEPES, and usually also includes bovine serum albumin (BSA) as a protein source.	Millar and Watson., 2001
DMSO (dimethyl sulfoxide)	150 mM NaCl 3 mM KCl 1 mM 1 mM 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 10% (v/v) DMSO	DMSO is not an extender per se, but rather a cryoprotectant that is added to extenders to prevent damage to sperm cells during freezing and thawing. DMSO is commonly used in amphibian cryopreservation studies, often in combination with other cryoprotectants.	Mansour et al., 2009
Sucrose solutions	300 mM sucrose 150 mM NaCl 3 mM KCl 1 mM 1 mM	These solutions are sometimes used as extenders for amphibian sperm. They typically contain a combination of sucrose and salts, and may also include BSA or other protein sources.	Mansour et al., 2010

Table 5. Cryoprotectants for frog cryopreservation

Types	Examples	Molecular Weight (g/mol)	Penetration Ability	References
Penetrating cryoprotectants	Dimethyl sulfoxide (DMSO)	78.13	High	Upton et al., 2021
	Glycerol	92.09	High	Mansour et al., 2010
	Ethylene glycol	62.07	High	Beesley et al., 1998
Non-penetrating cryoprotectants ⁽¹⁾	Polyethylene glycol (PEG)	>1000	Low	Amokrane et al., 2020
	Hydroxyethyl starch (HES)	>6000	Low	Najafi et al., 2021
Antifreeze proteins ⁽²⁾	Type I AFP	~2,800	-	Tri et al., 2019
	Type II AFP	~6,500	-	
	Type III AFP	~34,000	-	

(1) Non-invasive cryoprotectants listed in the table above are more commonly used in other species than in amphibians.

(2) Anti-freeze proteins listed in the table above are mainly used for other species than amphibians in cryopreservation technology.

2.3. 개구리 정자의 동결보존 방법론

다양한 개구리 종의 정자를 동결보존하기 위해 시간이 지남에 따라 방법론이 개발되고 개선되어 왔다. 이러한 방법론들은 종마다 고유한 동결보호제의 농도, 냉각 속도 및 해동 속도에 대한 서로 다른 민감도를 가질 수 있기 때문에 각 종에 따라 다르게 적용될 수밖에 없다. 여기에서는 개구리 정자 동결보존 방법론의 핵심 구성 요소 중 일부를 설명했다 (Clulow et al., 2019).

2.4. 시료 준비 (Semen sample preparation)

동결보존 전에 개구리 정자 시료를 수집하고 냉동을 위해 준비한다. 이는 동결보호제, 항산화제 및 에너지원이 포함된 버퍼 (buffer)나 정액 증량제 (semen extender)로 정자를 희석하는 것이 포함된다 (Table 4). 정액 증량제는 냉동 및 해동 과정에서 정자 세포의 무결성 (sperm cell integrity)과 운동성 (motility)을 유지하는 데 도움이 된다 (Moradi et al., 2020).

이전까지, 정자 시료를 채취하기 위해 성숙한 수컷 양서류의 고환을 분쇄하여 정자 현탁액을 얻는 침습적인 방법을 사용해왔다 (Upton et al., 2018). 반면, 최근 가장 많이 사용되는 방법은 비침습적이며, 개구리의 복부에 부드러운 압력을 가하여 방출된 소변으로부터 정자를 얻는 방법 (Urine Collection)이 실험실에서 일반적으로 사용된다 (Uteshev et al., 2015; Rhodes et al., 2022). 그러나 다른

방법이 실패하거나 특정 유전 변종이 필요한 경우 외과적 적출 또는 체외 수정과 같은 보다 침습적인 방법을 사용할 수 있다 (Browne et al., 1998; Guy et al., 2020). 이러한 모든 방법은 신중한 취급이 필요하며 개구리의 안전과 복지를 보장하기 위해 훈련된 전문가만 수행해야 한다 (Table 3).

개구리의 정자 생산을 자극하기 위해 황체형성자극호르몬 (Luteinizing hormone-releasing hormone, LHRH) 및 인간융모성생식선자극호르몬 (Human chorionic gonadotropin, hCG)과 같은 호르몬을 수컷 개구리에 주입할 수도 있다 (Goncharov et al., 1989; Kouba et al., 2009). LHRH는 뇌하수체를 자극하여 황체 형성 호르몬 (Luteinizing hormone, LH)을 방출하고, 이는 차례로 고환을 자극하여 정자를 생산하고 방출하는 반면, hCG는 LH처럼 작용하며 고환을 자극하여 정자를 생성한다. 대상 개체의 무게를 고려해 호르몬의 양을 결정하여 복강 또는 피하조직에 주입한다.

2.5. 동결보호제 (Cryoprotectants)

동결보호제는 냉동 과정에서 얼음 결정 형성 (crystal formation)으로 인한 손상을 최소화하기 위해 필수적이다. 세포 막을 안정화시키고 삼투압 스트레스를 감소시키며 세포 내부 얼음 형성을 방지함으로써 작용한다 (Storey, 1990).

동결보호제는 침투성 동결보호제 (Permeating cryoprotectants),

Table 6. Representative composition of cryoprotectants

Cryoprotectants	Representative composition	References
DMSO (dimethyl sulfoxide)	1.4 M DMSO, 80 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.8 mM , 0.8 mM , 25 mM, 0.5 mM , 20 mM Tris-HCl (pH 7.2), 0.1% BSA	Upton et al., 2021
Glycerol	1.4 M glycerol, 178 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.2 mM , 1.2 mM , 22 mM glucose, 50 mM Tris, 20 mM citric acid, 0.5% BSA	Mansour et al., 2010
Ethylene glycol	1.4 M ethylene glycol, 80 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.8 mM ,0.8 mM , 25 mM , 0.5 mM , 20 mM Tris-HCl (pH 7.2), 0.1% BSA	Beesley et al., 1998

Table 7. Sperm motility parameters

Motility parameter	Definition	Normal values ⁽¹⁾	References
Progressive motility	Sperm are swimming forward in a straight line, or in large circles	>30%	Janick and MacLeod, 1970
Non-progressive motility	Sperm are moving, but not in a straight line or in large circles	0-40%	
Immotile	Sperm are not moving at all	<20%	
Total motility	The percentage of sperm that are either progressively or non-progressively motile	>40%	

(1) It cannot be considered an absolute reference range because it varies between species and shows differences for each species.

비침투성 동결보호제 (Non-permeating cryoprotectants), 결빙방지단백질 (Antifreeze proteins)로 구분되고 다양한 동결보호제가 개구리 정자 보존에 사용되어 왔다 (Table 5). 가장 빈번히 사용되는 동결보호제는 디메틸설폭사이드, 글리세롤, 에틸렌글리콜, 메탄올이 있다 (Table 6).

디메틸설폭사이드 (Dimethyl sulfoxide, DMSO)는 세포막을 효과적으로 관통하고 세포 내부 얼음 형성을 방지하는 효과 때문에 개구리 정자의 동결보호제로 널리 사용된다 (Kaurova et al., 2021a). 일반적으로 농도는 종에 따라 5-15% (부피/부피)로 사용된다. 농도가 높을수록 세포에 유독할 수 있으며 정자 움직임과 생존력을 감소시킬 수 있다. 따라서, DMSO 농도의 최적화는 동결보존 효과를 유지하면서 독성을 최소화하기 위해 중요하다.

글리세롤 (Glycerol)은 개구리 정자 보존에 사용되는 일반적인 동결보호제다. 일반적으로 농도는 5-10% (부피/부피)로 사용된다 (Tessier et al., 2022). 글리세롤은 투과성 동결보호제로서, 세포막을 관통해 세포 냉동에 대한 안정성을 유지시킨다. 정자 세포를 냉각에 의한 손상으로부터 보호하는 데 효과적이지만, 고농도에서 독성을 가질 수 있어 해동 후 움직임과 생존력을 감소시킬 수 있다. DMSO와 마찬가지로 각 종마다 적절한 농도를 최적화하는 것이 중요하다.

에틸렌글리콜 (Ethylene glycol)은 개구리 정자 동결보존을 위해 10-20% (부피/부피) 농도로 사용되는 동결보호제다 (Beesley et al., 1998). 세포막을 통해 침투하여 얼음 결정 형성으로 인한 세포 손상을 방지할 수 있다. 에틸렌 글리콜은 일부 개구리 종에서 효과적이라는 것이 밝혀졌지만, 고농도에서의 잠재적 독성이 발생할 수 있다. 각 종마다 최적 농도를 결정하는 것이 중요하다.

2.6. 양서류 정자 동결보존에서 냉각 및 해동 속도

냉각 및 해동 속도는 개구리 정자 동결보존에서 정자 세포 생존과 운동성에 직접적인 영향을 미치므로, 매우 중요한 역할을 한다. 개구리 동결보존에서 시도된 다양한 냉각 및 해동 속도에 대해 논의하고, 정자 세포 결과에 미치는 영향을 살펴보면 다음과 같다.

서냉 (Slow cooling)은 개구리 정자 동결보존에서 일반적으로 사용되는 방법이다 (Lawson et al., 2013). 일반적으로

로 프로그램으로 온도를 자동 조절할 수 있는 냉각기 또는 수동 냉각 장치를 사용하여 정자 샘플을 -0.5 에서 -1°C /분의 속도로 냉각한다. 서냉은 세포가 평형을 유지할 수 있도록 하며, 세포의 무결성을 보존하고 냉동과정에서의 손상을 최소화한다. 서냉은 여러 개구리 종에서 해동 후 정자의 운동성과 생존성을 유지하는 데 성공했지만, 최적의 냉각 속도는 종 및 사용된 동결보호제에 따라 다를 수 있다.

급속냉각 (Rapid cooling) 또는 유리화 (vitrification)은 개구리 정자 동결보존에 대해 시험된 또 다른 방법이다 (Fahy et al., 1984; Arav, 2014). 이 방법은 정자 샘플을 직접 액체 질소 (-196°C)에 담그거나, 샘플을 매우 낮은 온도로 빠르게 냉각하는 전용 장치를 사용하는 것을 말한다. 빠른 냉각은 세포 손상을 유발할 수 있는 얼음 결정 형성을 방지하는 이점이 있다. 일부 개구리 종에서 해동 후 운동성과 생존성을 유지하는 데 효과적으로 사용되었다. 그러나, 모든 종에 적합하지 않을 수 있으며, 최적의 냉각 속도는 각각의 경우에 따라 결정되어야 한다.

2.7. 양서류 정자 동결보존 후 평가 (Evaluation after cryopreservation of amphibian sperm)

개구리 정자 동결보존의 성공은 결국 해동된 정자 세포가 수정 및 생존 가능한 자손을 생산할 수 있는 능력으로 결정된다. 해동된 정자 세포가 수정에 성공한 비율과 DNA 손상 또는 기타 이상 징후에 대한 증거를 논의하면 다음과 같다.

수정 성공률 (Fertilization success rates)은 해동된 정자의 수정 성공률은 개구리 종에 따라 다르며, 동결보존 방법, 정자 시료의 품질 및 저장 조건 등 여러 가지 요소에 따라 결정된다 (Upton et al., 2018). 일부 경우 수정 성공률이 70% 이상으로 보고된 반면, 다른 경우에는 상당히 낮을 수 있다. 동결보존 방법을 최적화하고, 동결보호제, 냉각 및 해동 속도 및 저장 조건 등을 선택하는 것이 수정 성공률을 극대화하기 위해서 필수적이다.

정자 운동성은 동결 보존 후 양서류 정자의 품질과 생존 능력을 평가하기 위해 일반적으로 사용되는 방법이다 (Browne et al., 2019) (Table 7). 냉동-해동된 정자의 운동성은 컴퓨터 보조 정자 분석 (computer-assisted sperm analysis, CASA) 또는 광학 현미경과 같은 수동 방법을 사

Table 8. Techniques for assessing cell viability and DNA integrity in cryopreservation

Technique	Description	Application in Cryopreservation	References
Comet assay	A single-cell gel electrophoresis technique	Used to measure DNA damage in cryopreserved cells, evaluating the efficacy of cryopreservation protocols.	Pollock et al., 2015
Acridine orange staining	A fluorescent dye that intercalates DNA and RNA	Used to assess the integrity of the chromatin structure and nuclear morphology in cryopreserved cells.	Morrow et al., 2017
Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling	A method to detect DNA fragmentation	Used to detect DNA strand breaks in cryopreserved cells, which can indicate damage from cryopreservation protocols.	Sharma et al., 2016

용하여 평가할 수 있다.

동결보존은 얼음 결정 형성, 삼투압 스트레스 및 활성 산소 종의 생성과 같은 다양한 요인으로 인해 정자 세포의 DNA 손상을 유발할 수 있다. DNA 손상은 수정 성공률 감소, 울챙이 발달 이상 징후 또는 생존력 저하 등을 유발할 수 있다. 해동된 정자 세포에서 DNA 손상 및 이상 징후를 평가하기 위해 여러 가지 방법이 사용될 수 있습니다 (Table 8). 유전자 해성 분석법 (comet assay)은 개별 정자 세포의 DNA 염기단절을 감지하는 민감한 방법이다 (Pollock et al., 2015). 해동된 정자 세포에서 증가한 DNA 조각화는 동결보존 유발 손상을 나타낼 수 있다. 아크리딘 오렌지 염색법 (Acridine orange staining)은 정자 세포의 염색체 무결성을 평가하는 데 사용될 수 있다 (Morrow et al., 2017). 염색체 구조의 변화는 DNA 손상을 나타낼 수 있으며 수정 성공률과 자손의 생존력에 영향을 미칠 수 있다. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL)은 정자 세포에서 DNA 조각화를 감지하는 데 사용되는 방법이다 (Sharma et al., 2016). 해동된 시료에서 TUNEL 양성 정자 세포의 비율이 신선한 시료보다 높은 경우 동결보존 유발 DNA 손상을 나타낼 수 있다. 또한 특정 프로브 (probes)를 사용한 형광 현미경은 손상된 첨체 (acrosome) 또는 파괴된 세포막과 같은 정자 세포 형태의 이상을 시각화 하는 데 도움을 줄 수 있다 (Hopkins et al., 2008).

3. 고찰 및 결론

개구리 정자 동결보존 분야에서 상당한 진전이 이루어졌지만, 여전히 극복해야 할 한계와 해결해야 할 사안이 많다. 첫번째로, 종마다 다른 정자 세포의 크기와 동결보호제에 대한 민감도의 차이로 인해, 각 개구리 종마다 최적의 동결보존 방법이 크게 다를 수 있다 (Sargent et al., 2005). 이는 모든 종에 적용 가능한 표준화된 방법 개발을 어렵게 만든다. 두번째로는, 동결 과정에서 정자 세포를 보존하는데 필수적인 동결보호제는 농도가 높아질수록 독성이 발생하여 해동 후 운동성 및 생존율 감소를 유발할 수 있다. 세번째 사안은 동결보존의 성공이 주로 정자 시료의 품질 및 특정 동결보존 방법에 따라 결정되며, 수정 후 결과의 변동성 (예: 수정 성공률 및 자손의 생존력)을 유발할 수 있다

는 것이다 (Kouba et al., 2009). 마지막으로, 동결보존 기술이 자손의 건강과 생식 성공에 미치는 장기적인 영향에 대한 지식이 부족하여, 동결보존의 진정한 성공을 평가하는 것이 어렵다 (Strand et al., 2020). 개구리의 지속가능한 관리를 위해 동결보존기술을 확대하기 위해서는 다양한 개구리 종에 대한 표준화된 방법을 개발하는 것이 중요하다. 이를 위해서는 종마다 최적의 동결보호제 유형과 농도, 냉각 및 해동 속도, 그리고 보관 조건 등을 조사할 필요가 있다. 또한 연구자들은 독성을 최소화하면서 효과적인 보존을 유지하는 신규 동결보호제 또는 동결보호제 조합의 사용을 탐색해야 한다. 또한, 개구리 정자 보존을 위한 새로운 동결보존 방법, 예를 들어 유리화 (vitrification)을 더욱 최적화해야 한다 (Silla et al., 2022).

앞으로의 연구는 해동 이후 정자 매개 변수 (예: 운동성, 생존율, DNA 무결성 등)와 수정 성공률, 그리고 산란 및 번식 성공률, 그리고 자손의 건강과 생식 성공률 사이의 관계를 이해하는 데 중점을 두어야 한다 (Sterrett et al., 2019). 자손의 생식 성공률을 모니터링하면 정밀한 동결보존 방법의 최적화와 장기적인 결과 개선에 도움이 되며, 동결보존 노력의 효과를 평가할 수 있는 중요한 정보를 제공할 수 있다. 따라서, 개구리 정자 보존에 대한 장기적인 효과와 해동 정자를 통해 생산된 자손의 건강에 대한 연구가 수행되어야 한다. 자동화 및 고처리 기술을 개발하고 과정을 간소화한다면 결과의 일관성을 향상시킬 수 있어, 보전 및 연구 노력에 이바지하여 비용과 시간을 절감할 수 있다.

사 사

본 문헌 고찰은 한국연구재단 (NRF)의 지원을 받아 수행되었습니다 (No. 2022R1A2C1004240).

References

Arav, A (2014). Cryopreservation of oocytes and embryos, *Theriogenology*, 81(1), pp. 96-102. [DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.011>]

Beebe, TJC (1996). Ecology and conservation of amphibians. Chapman & Hall: London. UK.

Beebe, TJC and Griffiths, RA (2005). The amphibian

- decline crisis: a watershed for conservation biology?, *Biological Conservation*, 125(3), pp. 271–285. [DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.04.009>]
- Beesley, SG, Costanzo, JP and Lee Jr, RE (1998). Cryopreservation of spermatozoa from freeze-tolerant and-intolerant anurans, *Cryobiology*, 37(2), pp. 155–162. [DOI: <https://doi.org/10.1006/cryo.1998.2119>]
- Borzée, A and Jang, Y (2015). Description of a seminatural habitat of the endangered Suweon treefrog *Hyla suweonensis*, *Animal Cells and Systems*, 19(3), pp. 216–220. [DOI: <https://doi.org/10.1080/19768354.2015.1028442>]
- Borzée, A, Shin, Y, Poyarkov, NA, Jeon, JY, Baek, HJ, Lee, CH, An, JH, Hong, YJ and Min, MS (2022). Dwindling in the mountains: Description of a critically endangered and microendemic *Onychodactylus* species (Amphibia, Hynobiidae) from the Korean Peninsula, *Zoological Research*, 43(5), pp. 750. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2022.048>
- Borzée, A, Kwon, S, Koo, KS and Jang, Y (2020). Policy recommendation on the restriction on amphibian trade toward the Republic of Korea, *Frontiers in Environmental Science*, 8, pp. 129. [DOI: <https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.00129>]
- Borzée, A, Kyong, CN, Kil, HK and Jang, Y (2018). Impact of water quality on the occurrence of two endangered Korean anurans: *Dryophytes suweonensis* and *Pelophylax chosonicus*, *Herpetologica*, 74(1), pp. 1–7. [DOI: <https://doi.org/10.1655/Herpetologica-D-17-00011>]
- Browne, RK, Clulow, J, Mahony, M and Clark, A (1998). Successful recovery of motility and fertility of cryopreserved cane toad (*Bufo marinus*) sperm, *Cryobiology*, 37(4), pp. 339–345. [DOI: <https://doi.org/10.1006/cryo.1998.2129>]
- Browne, RK, Mahony, M and Clulow, J (2002). A comparison of sucrose, saline, and saline with egg-yolk diluents on the cryopreservation of cane toad (*Bufo marinus*) sperm, *Cryobiology*, 44(3), pp. 251–257. [DOI: [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(02\)00031-7](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(02)00031-7)]
- Browne, RK, Silla, AJ, Upton, R, Della-Togna, G, Marcec-Greaves, R, Shishova, NV, Uteshev, VK, Proano, B, Perez, OD, MAnsour, N, Kaurova, SA, Gakhova, EN, Cosson, J, Dyzuba, B, Kramarova, LI, McGinnity, D, Gonzalez, M, Clulow, J and Clulow, S (2019). Sperm collection and storage for the sustainable management of amphibian biodiversity, *Theriogenology*, 133, pp. 187–200. [DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.03.035>]
- Clulow, J, Upton, R, Trudeau, VL and Clulow, S (2019). Amphibian assisted reproductive technologies: moving from technology to application, *Reproductive Sciences in Animal Conservation*, Comizzoli P, Brown J and Holt W (eds.), Springer, Cham, Switzerland, pp. 413–463. [DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-23633-5_14]
- Do, MS, Son, S-J, Choi, G, Yoo, N, Kim, D-I, Koo K-S and Nam H-K (2022). The establishment of ecological conservation for herpetofauna species in hotspot areas of South Korea, *Scientific Reports*, 12(1), pp. 14839. [DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19129-0>]
- Fahy, GM, Macfarlane, DR, Angell, CA and Meryman, HT (1984). Vitrification as an approach to cryopreservation, *Cryobiology*, 21(4), pp. 407–426. [DOI: [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(84\)90079-8](https://doi.org/10.1016/0011-2240(84)90079-8)]
- Goncharov, BF, Shubray, OI, Serbinova, IA and Uteshev, VK (1989). The USSR programme for breeding amphibians, including rare and endangered species, *International Zoo Yearbook*, 28(1), pp. 10–21. [DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1748-1090.1989.tb03248.x>]
- Guy, EL, Gillis, AB, Kouba, AJ, Barber, D, Poole, V, Marcec-Greaves, RM and Kouba, CK (2020). Sperm collection and cryopreservation for threatened newt species, *Cryobiology*, 94, pp. 80–88. [DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.04.005>]
- Hopkins, B and Herr, C (2008). 78 cryopreservation of frog (*Rana pipiens*) sperm cells collected by non-lethal methods, *Reproduction, Fertility and Development*, 20(1), pp. 120–120. [DOI: <https://doi.org/10.1071/RDv20n1Ab78>]
- Kaurova, SA, Shvirst, NE, Shishova, NV, Uteshev, VK and Fesenko Jr, EE (2021a). Influence of Xenon on Survival of Sperm of Common Frog *Rana temporaria* during Slow Freezing, *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 171(5), pp. 596–600. [DOI: <https://doi.org/10.1007/s10517-021-05276-3>]
- Kim, HW, Adhikari, P, Chang, MH and Seo, C (2021). Potential distribution of amphibians with different habitat characteristics in response to

- climate change in South Korea, *Animals*, 11(8), pp. 2185. [DOI: <https://doi.org/10.3390/ani11082185>]
- Kouba, A, Vance, C and Willis, E (2009). Artificial fertilization for amphibian conservation: current knowledge and future considerations, *Theriogenology*, 71(1), pp. 214–227. [DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.055>]
- Lawson, B, Clulow, S, Mahony, MJ and Clulow, J (2013). Towards gene banking amphibian maternal germ lines: short-term incubation, cryoprotectant tolerance and cryopreservation of embryonic cells of the frog, *Limnodynastes peronii*, *PLoS One*, 8(4), pp. e60760. [DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060760>]
- Lee, S-D and Miller-Rushing, AJ (2014). Degradation, urbanization, and restoration: A review of the challenges and future of conservation on the Korean Peninsula, *Biological Conservation*, 176, pp. 262–276. [DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.05.010>]
- Moradi, M, Karimi, I, Ahmadi, S and Mohammed, LJ (2020). The necessity of antioxidant inclusion in caprine and ovine semen extenders: a systematic review complemented with computational insight, *Reproduction in Domestic Animals*, 55(9), pp. 1027–1043. [DOI: <https://doi.org/10.1111/rda.13754>]
- Morrow, S, Gosálvez, J, Lopez-Fernandez, C, Arroyo, F, Holt, W and Guille, MJ (2017). Effects of freezing and activation on membrane quality and DNA damage in *Xenopus tropicalis* and *Xenopus laevis* spermatozoa, *Reproduction, Fertility and Development*, 29(8), pp. 1556–1566. [DOI: <https://doi.org/10.1071/RD16190>]
- Oh, D-J, Kim, Y-B, Lee, J-Y, Moon, J-Y and Jeong, G-H (2002). Accumulation of organonitrogen pesticides in fishes and amphibians from the Basin of major rivers of S. Korea, *Analytical Science and Technology*, 15(6), pp. 489–495. [Korean Literature] [DOI: <https://koreascience.kr/article/JAKO200219148804065.page>]
- Oh, H-J, Chang, K-H, Jin, M-Y, Suh, J-M, Yoon, J-D, Shin, K-H, Park, S-G and Chang, M-H (2021). Trophic ecology of endangered gold-spotted pond frog in ecological wetland park and rice paddy habitats, *Animals*, 11(4), pp. 967. [DOI: <https://doi.org/10.3390/ani11040967>]
- Park, CJ, Ahn, HM, Cho, SC, Kim, T-H, Oh, J-M, Ahn, HK, Chun, S-H and Gye, MC (2014). Developmental toxicity of treated municipal wastewater effluent on *Bombina orientalis* (Amphibia: Anura) embryos, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(4), pp. 954–961. [DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.2519>]
- Pearl, E, Morrow, S, Noble A, Lerebours, A, Horb, M and Guille, M (2017). An optimized method for cryogenic storage of *Xenopus* sperm to maximise the effectiveness of research using genetically altered frogs, *Theriogenology*, 92(1), pp. 149–155. [DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.01.007>]
- Pollock, K, Gosálvez, J, Arroyo F, Lopez-Fernandez, C, Guille, M, Noble, A and Johnston, SD (2015). Validation of the sperm chromatin dispersion (SCD) test in the Amphibian *Xenopus laevis* using in situ nick translation and comet assay, *Reproduction, Fertility and Development*, 27(8), pp. 1168–1174. [DOI: <https://doi.org/10.1071/RD14070>]
- Poo, S and Hinkson, KM (2019). Applying cryopreservation to anuran conservation biology, *Conservation Science and Practice*, 1(9), pp. e91. [DOI: <https://doi.org/10.1111/csp2.91>]
- Rhodes, HJ and Amo, M (2022). Electrophysiological responses to conspecific odorants in *Xenopus laevis* show potential for chemical signaling, *PLoS One*, 17(9), pp. e0273035. [DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0273035>]
- Roh, G, Borzée, A and Jang, Y (2014). Spatiotemporal distributions and habitat characteristics of the endangered treefrog, *Hyla suweonensis*, in relation to sympatric *H. japonica*, *Ecological Informatics*, 24, pp. 78–84. [DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoinf.2014.07.009>]
- Sargent, MG and Mohun, TJ (2005). Cryopreservation of sperm of *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*, *Genesis*, 41(1), pp. 41–46. [DOI: <https://doi.org/10.1002/gene.20092>]
- Shannon, FA (1956). The reptiles and amphibians of Korea, *Herpetologica*, 12(1), pp. 22–49. [DOI: <https://www.jstor.org/stable/3889565>]
- Sharma, R, Ahmad, G, Esteves, SC and Agarwal, A (2016). Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay using bench top flow cytometer for evaluation of sperm DNA fragmentation in fertility laboratories: protocol, reference values, and quality control, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 33, pp. 291–300. <https://doi.org/10.1007/s10815-015-0635-7>

- Shishova, NR, Uteshev, V K, Kaurova, SA, Browne, RK and Gakhova, EN (2011). Cryopreservation of hormonally induced sperm for the conservation of threatened amphibians with *Rana temporaria* as a model research species. *Theriogenology*, 75(2), pp. 220–232. [DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.08.008>]
- Silla, AJ, Kouba, AJ and Heatwole, H (2022). Reproductive Technologies and Biobanking for the Conservation of Amphibians, CSIRO Publishing, Melbourne
- Sterrett, SC, Katz, RA, Brand, AB, Fields, WR, Dietrich, AE, Hocking, DJ, Foreman, TM, Wiewel, ANM and Campbell Grant, EH (2019). Proactive management of amphibians: Challenges and opportunities, *Biological Conservation*, 236, pp. 404–410. [DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.05.057>]
- Storey, KB (1990). Life in a frozen state: adaptive strategies for natural freeze tolerance in amphibians and reptiles, *American Journal of Physiology—Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 258(3), pp. R559–R568. [DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1990.258.3.R559>]
- Strand, J, Thomsen, H, Jensen, JB, Marcussen, C, Nicolajsen, TB, Skriver, MB, Søgaaard, IM, Ezaz, T, Purup, S, Callesen, H and Pertoldi, C (2020). Biobanking in amphibian and reptilian conservation and management: opportunities and challenges, *Conservation Genetics Resources*, 12, pp. 709–725. [DOI: <https://doi.org/10.1007/s12686-020-01142-y>]
- Tessier, SN, De Vries, RJ, Pendexter, CA, Cronin, SEJ, Ozer, S, Hafiz, EOA, Raigani, S, Oliveira-Costa, JP, Wilks, BT, Higuira, ML, Gulik, TM, Usta, OB, Stott, SL, Yeh, H, Yarmush, ML, Uygun, K and Toner, M (2022). Partial freezing of rat livers extends preservation time by 5-fold, *Nature communications*, 13(1), pp. 4008. [DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31490-2>]
- Upton, R, Clulow, S, Mahony, MJ and Clulow, J (2018). Generation of a sexually mature individual of the Eastern dwarf tree frog, *Litoria fallax*, from cryopreserved testicular macerates: proof of capacity of cryopreserved sperm derived offspring to complete development, *Conservation Physiology*, 6(1), pp. coy043 [DOI: <https://doi.org/10.1093/conphys/coy043>]
- Uteshev, VK, Kaurova, SA, Shishova, NV, Stolyarov SD, Browne RK and Gakhova EN (2015). *In vitro* fertilization with hormonally induced sperm and eggs from sharp-ribbed newts *Pleurodeles waltl*, *Russian Journal of Herpetology*, 22(1). [DOI: <https://doi.org/10.30906/1026-2296-2015-22-1-35-40>]