

GOVP1199801009

630.274  
L293 8

최 종  
연구보고서

## 해산어류 정자의 생리활성과 장·단기 보존

Physiological Activities and Long- and Short-Term  
Preservation of Sperm in Marine Fishes

연구기관

부 경 대 학 교

농 립 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

이 보고서를 “해산어류 정자의 생리활성과 장·단기 보존” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1997. 11.

주관연구기관명 : 부경대학교  
총괄연구책임자 : 장 영 진  
연 구 원 : 강 용 진  
          김 승 현  
          임 한 규  
          이 정 용  
          강 덕 영  
          고 강 희  
          장 윤 정  
          최 윤 희

여 백

# 요 약 문

## I. 제목

해산어류 정자의 생리활성과 장·단기 보존

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

어류의 정자보존 기술은 양식을 위한 종묘생산용 어미의 현장 어획시 암수간 성비의 불균형에 따른 채란과 채정의 어려움과 산란·방정시기가 서로 일치하지 않을 때 애로를 겪는 인공수정 작업을 손 쉽게 해결해 줄 수 있다. 또 수컷 어미의 사육관리에 필요한 경비 및 노력을 절약할 수 있게 할 뿐만 아니라, 우량종의 선택교배를 가능하게 하고 희귀어종이나 재래어종의 종 보존을 용이하게 해 준다. 이와 같이 양식어류의 정자보존 기술이 많은 장점을 가지고 있음에도 불구하고 국내에서는 아직 이 분야에 관한 기초 연구 조차 되어있지 않다. 한편 외국에서도 장기간 정자를 보존하는 기술의 기반이 되는 정자의 생리활성에 관한 연구는 아직 미흡한 데다, 정자보존에 관한 연구도 연어과 어류와 담수어류에 대한 연구가 대부분으로 해산어류의 정자보존 기술개발에 관한 연구는 미흡한 실정이다. 그러므로 해산어류 정자보존에 있어 기초 자료의 축적이나 보존기술을 개발하여 양식어류의 생산성 향상에 활용하기 위해서는, 이미 의학이나 축산업에서 보편화되어 있는 것처럼 해산어류의 정자보존에 관한 생리활성 요인의 연구와 실제 종묘생산시 효과적으로 활용할 수 있는 기반기술이 우선적으로 확보되어야 한다.

위와 같은 배경에서, 1차 년도에는 중요 양식대상 해산어류로서 산업상 중요종인 복어류(*Takifugu* sp.)와 송어(*Mugil cephalus*) 및 감성돔(*Acanthopagrus schlegeli*)을 재료로 하여, 정액의 특성과 여러 조건에서의 정자활성을 조사하여 정자의 장·단기 보존기술을 개발하기 위한 기반자료를 얻고, 이를 바탕으로 정액을 액상배지에서 단기간 보존할 수 있는 적정기법을 개발하는 데에 연구과제의 목표를 두었다. 2차년도에는 인공종묘생산의 시기조절, 종보존, 우량형질의 정자확보 등을 위한 냉동정자의 장기보존 방법을 찾는 데에 주 안점을 두었다.

### 3. 연구개발 내용 및 범위

#### 1) 정자의 구조 및 크기

정자의 두부, 중편 및 꼬리의 형태를 조사하고, 정자의 크기 및 두부, 꼬리, 미토콘드리아 등 각 부위의 크기를 파악하여 해산어류의 어종별 정자 형태를 비교 분석하였다. 아울러 정소 및 정소와 관련된 부속기관의 형태 및 구조도 함께 파악하였다.

#### 2) 정자의 생리적 특성

**일반적 특성** : 수컷 어미 한 마리당 정액량과 정자의 농도(정자수), spermatocrit 값을 파악하였고, 채정시기(방정 초, 중, 말기)별 정액량과 농도 및 spermatocrit 값을 비교·분석하였다.

**물리적 특성** : 정자의 운동성과 생존에 직접적인 영향을 미치는 요인중 하나인 정장의 pH와 삼투질농도를 파악하였다.

**화학적 특성** : 정자의 운동성과 생존에 영향을 미치는 정자와 정장의 총 단백

질량, 총 지질량, glucose 함량과 정장의 이온조성을 파악하였다.

### 3) 환경조건에 따른 정자의 생리활성

**환경변화에 따른 정자의 물리·화학적 성상의 변화와 활력** : 온도, pH, 삼투질농도 등의 환경변화에 따른 정자와 정장의 물리·화학적인 성상의 변화를 파악하였고, 희석액의 pH와 삼투질농도에 따른 정자의 운동성을 조사하였다.

**희석액에 따른 정자의 운동성** : 희석액의 조성을 각기 달리하여 정자의 운동성을 파악하였고, 정자의 운동성과 생존에 영향을 미치는 이온성분을 분석하였다.

### 4) 최적 희석액의 조성

복어류와 송어 및 감성돔 정자의 냉장보존에 적합한 희석액의 조성 및 농도를 파악하였다.

### 5) 냉장(단기)보존을 위한 적정조건

**보존적온** : 정자의 에너지 소모를 최소화하고, 정상적인 수정률을 유지하여 냉장보존의 목적을 달성할 수 있는 적정 보존온도를 구명하였다.

**냉장보존에서 항생제의 영향** : 정액의 냉장보존중 정액과 대기중에 있는 세균이나 곰팡이류의 번식 때문에 일어나는 피해를 방지하기 위해서 여러 종류의 항생제를 첨가하여 그 효과를 파악하였다.

### 6) 냉동처리가 정액 성상에 미치는 영향

**냉동(장기)보존한 정자의 화학적 조성의 변화와 생존율** : 보존정액을 냉동시

켰을 때 정장 및 정자의 이온조성과 화학조성의 변화를 조사하고 냉동보존 기간에 따른 정자의 운동성과 생존율 및 수정률을 조사하였다.

**정자의 물리적 손상** : 냉동처리에 따른 정자의 형태적 손상정도를 파악하고 정자의 손상을 최소화시킬 수 있는 냉동률과 냉동온도 등을 파악하였다.

#### 7) 동해방지제

**동해방지제** : 복어류와 송어 및 감성돔 정자의 보존에 적합한 동해방지제를 밝혀내고, 평형시간에 따른 동해방지제의 효과 및 동해방지제의 적정농도를 파악하였다.

**해동온도** : 해동온도는 수정률에 많은 영향을 미치므로, 적정 해동온도를 조사하고, 나아가 복어류와 송어 및 감성돔 정자에 가장 적합한 해동온도를 구명하였다.

### 4. 연구개발 결과

#### 1) 정자의 구조 및 크기

자주복 정자는 머리, 중편 및 꼬리로 구성되어 있었다. 머리는 타원형으로 직경이  $0.51 \sim 0.83 \mu\text{m}$ (평균  $0.65 \pm 0.1 \mu\text{m}$ )였고, 머리 전반부에서 후반부까지의 길이는  $1.16 \sim 1.92 \mu\text{m}$ (평균  $1.35 \pm 0.30 \mu\text{m}$ )였다. 치밀한 핵질로 충만한 머리는 그 앞부분에 침체구조를 가지지 않았다. 미토콘드리아는 구형(직경  $0.17 \mu\text{m}$ )으로 정자당 7개씩 관찰되며, 편모의 횡단면은 전형적인 9+2 구조를 나타냈다.

황복 정자도 자주복 정자와 같이 타원형의 머리를 가지고 있었으며, 머리, 중편 및 꼬리로 구성되어 있었다. 머리는 평균 직경이  $0.56 \mu\text{m}$ 였으며, 머리 전단에서

후단까지의 길이는 평균  $1.34 \mu\text{m}$ 였다. 머리는 핵질외에 세포질이 거의 없으며 침체구조도 가지고 있지 않았다. 미토콘드리아는 구형으로 머리의 말단에 고리모양으로 붙어있으며, 편모의 횡단면은 9+2 구조였다.

감성돔 정자의 머리는 거의 구형으로 대부분 핵질로 채워져 있었으며, 직경  $1.49 \pm 0.07 \mu\text{m}$ , 길이  $1.33 \pm 0.07 \mu\text{m}$ 였다. 편모의 횡단면은 9+2 구조를 나타냈다.

## 2) 정자의 생리적 특성

정자보존에 관한 기초 자료로 활용하기 위하여 정액의 물리, 화학적 특성을 파악하는 과정은 보존실험 이전에 선행되어야 할 필수적인 실험이다. 이러한 정액 특성을 바탕으로 정자를 보존하는 데에 기본이 되는 희석액의 조성을 결정할 수 있다.

자주복 정액의 물리적 특성중 정자농도는  $9.8 \pm 0.3 \times 10^{10}/\text{mL}$ 였으며, spermatocrit는  $97.8 \pm 0.8$ 이었다. 정장의 삼투질농도는  $383 \pm 2 \text{ mOsmol/kg}$ 이었고, pH는  $8.2 \pm 0.2$ 였다. 정자와 정장의 단백질 함량은 정자가  $1.4 \text{ g}/100\text{mL}$ 로 정장의  $0.1 \text{ g}/100\text{mL}$  보다 많았고, 지질과 Na 및 K 함량은 반대로 정장이 정자 보다 많았다.

황복 정액 1 mL당 정자농도는  $1.1 \pm 0.3 \times 10^{10}/\text{mL}$ 였으며, spermatocrit는  $64.8 \pm 1.3$ 이었다. 정장의 삼투질농도는  $266 \pm 2 \text{ mOsmol/kg}$ 이었고, 정자와 정장의 총 단백질 함량은 각각  $1.6 \pm 0.2$ ,  $0.1 \pm 0.1 \text{ g}/100\text{mL}$ 였다. 총지질 함량은 정자가  $69.4 \pm 58.4 \text{ mg}/100\text{mL}$ 로 정장의  $28.0 \pm 14.6 \text{ mg}/100\text{mL}$  보다 많았다. 정장에서의 Na와 K 함량은 각각  $130.7 \pm 0.5 \text{ mEq/l}$  와  $12.3 \pm 0.1 \text{ mEq/l}$ 였다.

실험에 사용한 승어의 생식소중량지수는  $19.2 \pm 3.8$ 이었고, 정액 1 mL당 정자농도는  $1.1 \pm 0.4 \times 10^{10}/\text{mL}$ 였으며, spermatocrit는  $96.7 \pm 2.6$ 이었다.

감성돔의 정자농도는  $2.9 \pm 0.9 \times 10^{10}/\text{mL}$ 였고, spermatocrit는  $97.4 \pm 2.1$ 이었다. 정

장의 삼투질농도는  $382 \pm 70$  mOsm/kg이었으며, 감성돔 정자와 정장의 총단백질 함량은 각각 1.2 g/100ml와 0.9 g/100ml이었고, 총지질 함량은 161.9 mg/100ml와 53.9 mg/100ml였다. Glucose 함량은 정자가 4.2 mg/100ml로 정장의 13.7 mg/100 ml 보다 적었다. Na는 정자 보다 정장에서의 함량이 많았고, K는 반대로 정자에서의 함량이 많았다. 채정기간 동안 채취 정자의 총 수는 중반으로 갈수록 증가 하였으나, spermatocrit는 94.8~98.2로 큰 변화가 없었다.

### 3) 환경조건에 따른 정자의 생리활성

희석액의 구성에 따라, 자주복 정액의 냉동과 냉장보존에 이용할 희석액을 결정 하기 위해 각기 구성이 다른 Alsever's solution, Cortland medium, egg-tris, 0.5 M fructose, 0.3 M glucose, Mounib's solution, 1% NaCl, sodium chloride, 3.6% sodium citrate, 150 mM sucrose, 해산어류생리식염수(marine fish ringer solution, MFRS)의 11가지 희석액을 실험에 사용하였다. 냉장보존에 적합한 희석 액을 결정하기 위해 정액을 희석액과 혼합한 후 정자의 활력을 조사한 결과, fructose와 sodium citrate를 제외한 나머지 희석액에서는 정자가 활성화되지 않았다.

냉동보존을 위한 희석액을 결정하기 위해 11가지 희석액에 동해방지제인 dimethyl sulfoxide(DMSO), ethylene glycol, glycerin, glycerol, methanol을 15% 농도가 되게 첨가하여 정액과 혼합한 후 정자의 활성을 조사한 결과, ethylene glycol과 methanol은 희석 후에도 정자를 활성화시키지 않았고, 액상으로 하루동안 보존한 후의 정자활성지수(sperm activity index, SAI)나 생존율이 비교적 높은 것으로 나타났다. 액상으로 하루동안 보존한 경우, Alsever's solution, Cortland medium, Mounib's solution, 1% NaCl, sucrose, MFRS에서 정자의 활력이 높았다.

삼투질농도에 따른 송어 정자의 운동성을 조사한 결과, 해수와 비슷한 822 mOsm/kg와 983 mOsm/kg에서는 희석 직후의 활성이 매우 높았으나 시간경과와 함께 점차 낮아졌다. 그러나 정장의 삼투질농도 보다 약간 높은 482 mOsm/kg에서는 정자의 활성이 높게 유지되었다. 정자의 활성은 희석률이 낮아질수록 초기 활성은 높았으나 시간 경과와 함께 희석률에 관계없이 활성이 낮아졌다.

$\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  및  $\text{Ca}^{2+}$ 결여 인공해수에 정액을 희석시켰을 경우,  $\text{Na}^+$ 결여 인공해수에서만 정자의 운동이 개시되지 않았다.  $\text{Na}^+$ 결여 인공해수에 1 M NaCl을 서서히 첨가하여 삼투질농도를 상승시켰을 때, 삼투질농도 1398~1736 mOsm/kg에서는 정자의 운동성이 낮았으나, 457~1128 mOsm/kg에서는 높은 운동성을 보였다. NaCl 첨가시와 같은 방법으로  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  및  $\text{Ca}^{2+}$ 결여 인공해수에 1 M KCl,  $\text{MgCl}_2$  및  $\text{CaCl}_2$  처리를 한 경우, 각각의 삼투질농도 범위 904~1434, 818~1175 및 956~1343 mOsm/kg에서 정자의 운동성이 높았다.

#### 4) 최적 희석액의 조성

자주복 정자의 냉장보존을 위한 적정조건을 찾기위한 실험결과 희석액으로 MFRS와 1% NaCl을 사용하여 7일간 보존하였을 때, 정자의 생존율이 각각  $59.0 \pm 1.5\%$ ,  $56.7 \pm 6.2\%$ 로 가장 높았다.

황복 정자의 냉장보존 결과, 희석 직후 정자의 SAI는 egg-tris(0.5)를 제외한 다른 희석액에서 0.9로 비교적 높았으나, 보존 8일 후 0.1, 0.3, 0.5 M glucose에 희석하여 보존한 정자의 SAI는 0.2까지 감소하였다. 희석액별 생존율은 0.1 M, 0.3 M glucose에서 가장 높아 보존 8일째까지 각각 79.4와 79.8%의 정자가 살아 있었다. 희석액별로 16일 동안 냉장보존한 정자의 수정률은 신선한 정액을 사용한 대조구에서  $72.4 \pm 3.3\%$ 로 가장 높았으나, egg-tris, 0.1 M, 0.3 M, 0.5 M glucose

및 MFRS를 사용하였을 때는  $0\sim 0.7\pm 0.8\%$ 로 대조구에 비해 매우 낮았다.

송어의 정자는 송어의 혈청을 희석액으로 사용하여  $0^{\circ}\text{C}$ 로 보존하였을 때 가장 효과가 좋았으며, egg-tris, 0.1 M, 0.3 M, 0.5 M glucose 및 MFRS를 사용하였을 때의 SAI는 서로 비슷하였다.

감성돔의 경우 여러 가지 희석액중 혈청을 사용하였을 때, 보존 10일째까지도 정자의 SAI와 생존율이 각각 0.3과  $55.6\pm 4.5\%$ 로 가장 높았다. 희석액별로 7일 동안 냉장보존한 정자의 감성돔 알에 대한 수정률 또한 혈청을 희석액으로 사용하였을 때  $47.7\pm 7.3\%$ 로 가장 높았고, 그 다음이 0.3 M glucose, 0.5 M glucose, egg-tris, 0.1 M glucose 순서였으나 서로간에 유의한 차이는 없었다. 냉장보존한 정자의 수정률은 신선한 정액으로 수정시켰을 때의  $78.3\pm 8.3\%$  보다 낮았다.

#### 5) 냉장(단기)보존을 위한 적정 조건

자주복 정자를 3~5배로 희석하여 보존하였을 때, 가장 높은 SAI와 생존율을 보였으며, 희석정액은 보존 중 agitation하지 않았을 때 SAI와 정자의 생존율이 비교적 높았다. 보존온도로는  $0\sim 5^{\circ}\text{C}$ 가 적절하였고, 보존중 첨가하는 항생제로는 neomycin(800 ppm)이 가장 효과적이었다.

희석액의 pH를 달리하여 보존한 결과 송어 정자는 pH 7~9에서 보존 10일후 까지 0.8 이상으로 높게 나타났으나, pH 6에서는 보존 4일째까지 급속히 감소하였고 pH 5에서는 희석 직후부터 0.4 이하로 SAI가 매우 낮았다.

감성돔 정자의 경우, 희석액의 적정 pH 범위는 7~8이었고, 정자의 생존율과 SAI를 높이기 위한 항생제와 항생제 첨가 농도는 자주복 정자에서와 같이 neomycin 800 ppm이 적합하였다.

## 6) 냉동처리가 정액 성상에 미치는 영향

자주복 정자를 냉동(장기)보존한 후 해동하였을 때 대부분의 정자는 신선한 정자와 비교하여 구조상 차이가 인정되지 않았으며, 일부 동해를 입은 소수의 정자에서는 세포막이 이탈하는 형태변화가 관찰되었다.

황복 정자도 자주복 정자와 마찬가지로 냉동보존 후 신선한 정자와 비교하여 구조상 차이를 보이지 않았으나, 소수의 정자에서는 세포막이 이탈하는 형태가 관찰되었다.

냉동후 해동시킨 감성돔의 일부 정자에서는 염색질이 과립상으로 변화하였으며, 세포막의 이탈에 의해 그 용적이 커지는 정자가 관찰되었다.

## 7) 동해방지제

자주복 정자의 냉동(장기)보존에서는 희석액을 Alsever's solution으로 하고 동해방지제로 ethylene glycol의 최종농도가 15%로 되도록 첨가하였을 때, SAI와 정자의 생존율이 각각 2.7과  $72.0 \pm 2.9\%$ 로 가장 좋은 보존효과를 보였다. DMSO, ethylene glycol, glycerol, methanol을 동해방지제로 사용하였을 때, 평형시간을 최소화할수록 SAI와 정자의 생존율이 높았다.

해동온도를 각기 달리하여 해동시킨 결과 해동온도가 높을수록 해동직후의 SAI와 생존률이 증가하여 30℃에서 각각 1.5,  $71.7 \pm 3.5\%$ 로 다른 온도에 비해 유의하게 높았다. 따라서 straw법으로 보존할 경우 30~40℃의 높은 해동온도에서 빨리 해동하는 것이 효과적이었다.

여러가지 희석액을 사용하여 15일 동안 황복 정자를 냉동보존한 결과, 알에 대한 수정률은 MFRS를 사용하였을 때  $24.6 \pm 3.7\%$ 로 가장 높았고, 다음이 Alsever's solution으로  $5.1 \pm 2.2\%$ 였다. 그러나  $61.7 \pm 3.0\%$ 였던 대조구의 수정률

에 비해서는 낮았다. Glucose를 희석액으로 사용하고 동해방지제로 DMSO와 glycerol을 농도별로 첨가하여 냉동보존하였을 때, 수정률은 동해방지제로서 5% DMSO를 사용하였을 때  $28.3 \pm 3.0\%$ 로 대조구의  $61.7 \pm 3.0\%$  보다는 낮았지만 다른 농도에 비해 높았다. 앞의 실험 결과에서 가장 효과가 좋았던 MFRS와 5% DMSO를 이용하였을 때 수정률이  $79.3 \pm 6.5\%$ 로 가장 효과가 좋았다.

송어 정자의 냉동보존 실험에서 SAI는 신선한 정액에서 2.8이었고 MFRS와 0.15 M sodium citrate 및 0.3 M glucose에서는 각각 0.6, 0.4, 0.6이었다. 대조구인 신선한 정액의 수정률은 평균  $65.7 \pm 2.4\%$ 였고, MFRS, 0.15 M sodium citrate 및 0.3 M glucose는 각각  $60.2 \pm 4.3\%$ ,  $49.6 \pm 16.1\%$ ,  $45.1 \pm 8.4\%$ 로 MFRS를 희석액으로 사용하였을 때 가장 효과가 좋았다.

감성돔 정자의 냉동보존 실험결과, 희석액별 냉동보존 실험의 경우, 수정률은 5% glucose를 사용하였을 때  $63.4 \pm 4.4\%$ 로 가장 높았고, 생존율은 3% sodium citrate를 사용하였을 때  $80.6 \pm 1.4\%$ 로 가장 높았다. 동해방지제로 5~15% glycerol을 사용하였을 때 수정률은 50.1~69.4%로 보존효과가 좋았으며, 동해방지제를 DMSO로 할 경우, 해동정자의 수정률은 평형시간 10분에서  $55.0 \pm 8.4\%$ 로 가장 좋았다.

## B. 활용에 대한 건의

지금까지 어류 정자보존의 기술개발은 주로 종묘생산 분야에 치중되어 진행되었다. 이 사업의 연구에서는 자연산란이 어려워 현장에서 어획되는 어미 어류에서 나타나는 암수간 성비의 불균형에 따른 채란과 채정의 어려움을 극복하고, 산란·방정 시기가 서로 일치하지 않을 때 애로를 겪는 인공수정 작업을 가능하게 하는 데에 중점을 두었다. 따라서 이 사업에서 얻어진 연구결과를 활용하면, 국·

공립수산종묘배양장과 사립종묘배양장에서 자연채란이 어려운 복어류, 송어 및 감성돔의 종묘생산시 보다 효과적인 인공수정이 가능해질 것이다. 앞으로 다른 유용 수산동물 정자까지 대량보존 방법이 확립된다면, 우수한 형질을 가진 어미의 정자를 대량 보존하여 필요로 하는 양식가에게 분양해 줄 수 있는 시스템을 구축할 수 있다.

이 연구의 결과를 토대로 현재 자주복과 황복, 송어, 감성돔, 능성어 및 넙치 등 5종 어류의 정액을 확보하여 냉동(장기)보존하고 있다.

냉동보존중인 정액은 액체질소의 보충에 의해 영구보관이 가능하므로 수년간 장기보존하면서 앞으로 종묘생산업에 종사하는 사업자의 요구가 있을 경우, 무상으로 제공할 것이며 장기보존 효과를 검토하는 데에 이용할 계획이다. 이 연구에서 냉동보존 방법이 확립된 어종들은 종묘생산 현장에서 이용할 수 있도록 지속적으로 정액을 채취하여 대량보존할 계획이며, 이 방법을 현재까지 자연산란이나 친어의 구입이 어려운 다른 어종의 정액까지도 확대하여 보존하고자 한다.

앞으로는 송어와 복어류 외에 현재 양식되거나 양식 가능한 넙치, 가자미류, 돔류 및 농어 등에서도 적합한 정자보존 방법을 쉽게 구명할 수 있을 것이다. 특히 최근에는 환경오염으로 인한 국내 담수어의 많은 종이 멸종 위기에 처해있으며, 해산어의 경우 연안역의 오염이나 남획으로 인하여 자연 자원량이 급격히 감소하고 있는 실정이다. 따라서 절멸 위기에 처한 어종의 종 보존 뿐만 아니라 재래종과 우량종의 종 보존이 시급한 실정이다. 이와 같이 열악한 어류자원의 보전을 위하여 이 연구에서 개발된 정자보존 기법을 토대로 한 어류자원의 생산증대와 종 보존을 위한 「어류 정자은행」의 구축에 관한 후속 연구 사업과제가 발굴·시행되도록 별도의 조치를 건의한다.

그리고 장기적인 안목에서 유용 수산생물의 수정란 보존에 관한 기초 연구도

이루어져야할 시점이 되었다. 앞으로는 양식동물의 배우자 보존기술의 개발로  
연중 어느 때나 종묘생산이 가능하도록 하는 연구에 꾸준한 재정과 인력의 뒷  
받침이 있어야 할 것이다.

# SUMMARY

Three experiments were performed to study the biological and physiochemical properties of milt, and the possibility of cold storage (short-term) and cryopreservation (long-term preservation) of sperm in four marine fishes, tiger puffer (*Takifugu rubripes*), river puffer (*Takifugu obscurus*), grey mullet (*Mugil cephalus*) and black seabream (*Acanthopagrus schlegeli*).

## 1. Size and structure and of spermatozoa

Spermatozoa of tiger puffer was consisted of head, middle piece and tail. Head was oval shape and its diameter was  $0.51 \sim 0.74 \mu\text{m}$  (mean  $0.65 \pm 0.10 \mu\text{m}$ ). Head length was  $1.16 \sim 1.92 \mu\text{m}$  (mean  $1.35 \pm 0.30 \mu\text{m}$ ). Head was full of chromatin, but didn't have acrosome. Mitochondria was  $0.17 \mu\text{m}$  in diameter and showed a spherical shape and flagellum structure was  $9+2$ .

River puffer spermatozoa as like tiger puffer had an oval head and consisted of head, middle piece and tail. Head was  $0.56 \mu\text{m}$  in average diameter and its length was  $1.34 \mu\text{m}$  in average. Head contained no cytoplasm and acrosomal structure except chromatin. Mitochondria showed the spherical shape stucked terminal of head and flagellum was typically  $9+2$  structure.

Head of speramtozoa in black seabream was full of chromatin with spherical shape,  $1.49 \pm 0.07 \mu\text{m}$  in diameter and  $1.33 \pm 0.07 \mu\text{m}$  in length. Structure of flagellum was typically  $9+2$ , too.

## 2. Physiological property of spermatozoa

In tiger puffer, concentration of spermatozoa was  $9.81 \pm 0.34 \times 10^{10}/\text{ml}$ , spermatocrit was  $97.8 \pm 0.8$ . Osmolality of seminal fluid was  $382 \pm 2$  mOsm/kg, pH was  $8.2 \pm 0.2$ . Protein concentration of spermatozoa was higher than that of seminal fluid while the concentration of lipid in seminal fluid were higher than that in spermatozoa. Both concentrations of Na and K in seminal fluid and spermatozoa were similar each other.

Concentration of spermatozoa in river puffer was  $1.13 \pm 0.27 \times 10^{10}/\text{ml}$  and spermatocrit was  $64.8 \pm 1.1$ . Osmolality of seminal fluid was  $266 \pm 2$  mOsm/kg. Total protein concentration of spermatozoa was  $69.4 \pm 58.4$  mg/100ml higher than that ( $28.0 \pm 14.6$  mg/100ml) of seminal fluid. Na and K concentration of seminal fluid were  $126.3 \pm 0.5$  mEq/ℓ and  $14.4 \pm 0.1$  mEq/ℓ. In grey mullet gonadosomatic index was  $19.2 \pm 3.8$  and spermatozoa concentration was  $11.1 \pm 0.36 \times 10^{10}/\text{ml}$  and spermatocrit was  $96.7 \pm 2.6$ .

Spermatozoa concentration and spermatocrit of black seabream were  $2.87 \pm 0.98 \times 10^{10}/\text{ml}$  and  $97.4 \pm 2.1$ , respectively. Osmolality of seminal fluid was  $387 \pm 70$  mOsm/kg and total concentration of protein in black seabream spermatozoa and seminal fluid were 1.24 g/100ml and 0.89 g/ml and total lipid concentration were 161.9 mg/100ml and 53.9 mg/100ml, respectively. Glucose concentration of spermatozoa was 4.2 mg/100ml lower than that (13.7 mg/100ml) of seminal fluid. Na concentration in seminal fluid was higher than in spermatozoa, on the contrary K in spermatozoa as higher than in seminal

fluid. During milt collection, total number of collected spermatozoa were increase to middle phase and spermatocrit was not especial change as 94.8~98.2.

### 3. Physical activity of spermatozoa following environmental condition

To decide suitable diluent in cold storage of spermatozoa in tiger puffer, diluent of various composition [Alsever's solution, Cortland medium, egg-tris, 0.5 M fructose, 0.3 M glucose, marine fish ringer solution(MFRS), Mounib's solution, 1% NaCl, sodium chloride medium, 3.6% sodium citrate and 2.8% sucrose] were used. Spermatozoa didn't move in the most diluents except for fructose and sodium citrate.

To estimate effect diluents and cryoprotectants on spermatozoa activity in tiger puffer, spermatozoa were preserved with medium in the mixture of in the same diluents with those used in the experiments of cold storage and four cryoprotectants[dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol, glycerol, methanol of 15%] during 1 day. Spermatozoa in the ethylene glycol and methanol were not active after dilution and sperm activity index (SAI) and survival rate of spermatozoa were comparatively high after preservation during 1 day. Activity of spermatozoa was high in Alsever's solution, Cortland medium, MFRS, Mounib's solution, 1% NaCl and sucrose after preservation during 1 day.

When the motility of spermatozoa by different osmolality in grey mullet was examined, it was very high in 822 mOsm/kg and 983 mOsm/kg which is

similar to osmolality of seawater, but it decreased with time. While activity of spermatozoa was maintained highly in 482 mOsm/kg which was a little higher than osmolality of seminal fluid. In the activity of spermatozoa, the more dilution rate decreased, the more initial activity increased. While activity of spermatozoa decreased with time regardless of dilution rate. When the milt was diluted with  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$ -free artificial seawater, motility of spermatozoa was not begun in only  $\text{Na}^+$ -free artificial seawater. When we increased osmolality in the  $\text{Na}^+$ -free artificial seawater adding 1 M NaCl, motility of spermatozoa was low in 1398~1736 mOsm/kg, whereas it was high in 457~1128 mOsm/kg. As 1 M KCl, 1 M  $\text{MgCl}_2$  and 1 M  $\text{CaCl}_2$  were added in the  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$ -free artificial seawater with the same way of NaCl addition, motility of spermatozoa was high in the following range, respectively ; 904~1434 mOsm/kg, 818~1175 mOsm/kg and 956~1343 mOsm/kg.

#### 4. Composition of optimum diluent

In the experiments to find a suitable condition in cold storage of spermatozoa in tiger puffer, when spermatozoa were preserved with MFRS and 1% NaCl as diluents during 7 days, SAI and survival rate were very high with  $59.0 \pm 1.5\%$  and  $56.7 \pm 6.2\%$ , respectively.

In the results of cold storage in river puffer, SAI of spermatozoa diluted immediately was high with 0.9 in the all of the diluents except egg-tris (0.5). After 8 days of preservation, SAI of spermatozoa preserved in the 0.1, 0.3 and

0.5 M glucose was reduced to 0.2. Survival rate of spermatozoa preserved with 0.1 M and 0.3 M glucose during 8 days were the highest with 79.4% and 79.8%, respectively.

Fertilization rate of spermatozoa preserved with medium during 15 days by diluents was the highest with  $72.4 \pm 3.3\%$  in the control, but it was very lower with  $0 \sim 0.7 \pm 0.8\%$  in egg-tris, 0.1 M, 0.3 M, 0.5 M glucose and MFRS than control.

Preservation of grey mullet spermatozoa was the most effective when it was stored with serum of the same species at  $0^{\circ}\text{C}$  and SAI was similar in egg-tris, 0.1 M, 0.3 M, 0.5 M glucose and MFRS.

In black seabream, as its serum of various diluents was used for cold storage, SAI and survival rate were the highest with 0.3 and  $55.6 \pm 4.5\%$  after 10 days storage. When spermatozoa of black seabream was preserved with medium in various diluents during 7 days, fertilization rate was the highest with  $47.7 \pm 7.3\%$  in the serum of same species and the next is in order of 0.3 M glucose, 0.5 M glucose, egg-tris, 0.1 M glucose. But there were no significant differences among the diluents. Fertilization rate of spermatozoa preserved with medium was lower than fresh milt with  $78.3 \pm 8.3\%$ .

##### 5. Suitable condition for cold (short-term) storage

The dilution rate for cold storage of spermatozoa in tiger puffer was suitable between 3 and 5 times with the 1% NaCl diluent. Repeated slight agitation process of semen showed to be harmful. The appropriate range of

temperature for the cold storage showed between 0 and 5°C. In order to keep high SAI and survival rate of spermatozoa antibiotic addition (800 ppm neomycin) could be suggested.

When spermatozoa of grey mullet was preserved with medium in the diluents of the various pH, SAI was high in pH 7~9 until 8 days of storage, but it decreased rapidly until 4 days of storage in pH 6 and was very low on less than 0.4 immediately after dilution in the pH 5.

In black seabream, suitable range of pH in diluent was pH 7~8. A kind of antibiotic and its concentration for increasing SAI and survival rate of spermatozoa showed that 800 ppm neomycin was adequate like cold storage of tiger puffer spermatozoa.

#### 6. Effect of cryopreservation (long-term preservation) on property of milt

When spermatozoa of tiger puffer was cryopreserved and thawed, it didn't show structural difference in comparison with fresh spermatozoa. A few spermatozoa was found that cell membrane was separated from nucleus. The structural changes in river puffer spermatozoa cryopreserved equaled those of tiger puffer.

Compared with fresh spermatozoa, the fine structure of some cryopreserved spermatozoa changed to granular chromatin and plasma membranes swollen and ruptured. Size of head enlarged by freezing and thawing in some spermatozoa.

## 7. Cryoprotectant (long-term preservation)

When Alsever's solution as diluent and 15% ethylene glycol as cryoprotectant was used for cryopreservation of tiger puffer spermatozoa, SAI and survival rate of spermatozoa were the best with 2.7 and  $72.0 \pm 2.9\%$ , respectively. In the case of applying DMSO, ethylene glycol, glycerol, methanol as cryoprotectant, the more equilibration time decreased, the more SAI and survival rate of spermatozoa increased. Thawing temperature was adequate at  $30^{\circ}\text{C}$  and synergistic effect of bovine serum albumin and egg yolk on cryopreservation differed from diluents.

In the result of cryopreserving river puffer spermatozoa with various diluents during 15 days, fertilization rate on egg was the highest with  $24.6 \pm 3.7\%$  in the MFRS and the next was Alsever's solution with  $5.1 \pm 2.2\%$ . But it was lower than value of control with  $61.7 \pm 3.0\%$ . When glucose as diluent and various concentration of DMSO and glycerol as cryoprotectant was used for cryopreservation of river puffer spermatozoa, fertilization rate of 5% DMSO group was the highest ( $28.3 \pm 3.0\%$ ), but it was lower than control. As the most effective marine fish ringer solution and 5% DMSO in the previous experiment was used, fertilization rate was with  $79.3 \pm 6.5\%$ .

In cryopreservation experiment of grey mullet spermatozoa, SAI in fresh milt, MFRS, 0.15 M sodium citrate and 0.3 M glucose was 2.8, 0.6, 0.4 and 0.6, and fertilization rate of those was  $65.1 \pm 3.8\%$ ,  $62.9 \pm 5.8\%$ ,  $49.6 \pm 16.1\%$  and  $45.1 \pm 8.4\%$ , respectively. So MFRS was very effective among diluents.

Among the various diluents, 5% glucose diluent obtained the maximum value of fertilization rate in the cryopreservation of black seabream spermatozoa. Survival rate showed the maximum value ( $80.6 \pm 1.4\%$ ) with the 3% sodium citrate diluent. Glycerol as a cryoprotectant was better than DMSO in cryopreservation method. Fertilization rate was in a range from 50.1% to 69.4%, when glycerol concentration from 5% to 15% was applied. Fertilization rate gradually decreased according to increase of glycerol concentration. Fertilization rate showed the maximum value of  $55.0 \pm 8.4\%$  within 10 minutes of equilibration time.

# CONTENTS

|   |    |
|---|----|
| Chapter I . Introduction .....                                | 35 |
| Section 1. Purpose .....                                      | 35 |
| Section 2. Plan and range of study .....                      | 37 |
| Chapter II . Property of spermatozoa .....                    | 39 |
| Section 1. Introduction .....                                 | 39 |
| Section 2. Materials and methods .....                        | 40 |
| 1. Fishes and milt collection .....                           | 40 |
| A. Tiger puffer .....   | 40 |
| B. River puffer .....   | 40 |
| C. Grey mullet .....  | 41 |
| D. Black seabream .....                                       | 41 |
| 2. Structure and size of spermatozoa .....                    | 42 |
| 3. Physiological property of spermatozoa .....                | 43 |
| A. Common property .....                                      | 43 |
| B. Physical property .....                                    | 43 |
| C. Chemical property .....                                    | 43 |
| 4. Sperm activation by environmental condition .....          | 44 |
| A. Changes of sperm activity by environmental condition ..... | 44 |

|   |    |
|---|----|
| B. Sperm motility by ion constituent in diluent ..... | 44 |
| 5. Evaluation of sperm motility .....                 | 45 |
| 6. Evaluation of sperm survival .....                 | 45 |
| <br>  |    |
| Section 3. Results .....                              | 46 |
| 1. Structure and size of spermatozoa .....            | 46 |
| A. Tiger puffer .....                                 | 46 |
| B. River puffer .....                                 | 46 |
| C. Grey mullet .....                                  | 48 |
| D. Black seabream .....                               | 48 |
| 2. Physiological property of spermatozoa .....        | 52 |
| A. Tiger puffer .....                                 | 52 |
| B. River puffer .....                                 | 53 |
| C. Grey mullet .....                                  | 54 |
| D. Black seabream .....                               | 55 |
| 3. Sperm activation by environmental condition .....  | 62 |
| <br>  |    |
| Section 4. Discussion .....                           | 76 |
| <br>  |    |
| Chapter III. Cold (short-term) storage .....          | 81 |
| <br>  |    |
| Section 1. Introduction .....                         | 81 |
| <br>  |    |
| Section 2. Materials and methods .....                | 82 |
| 1. Constituent of optimum diluent .....               | 82 |
| A. Tiger puffer .....                                 | 82 |

|  |        |
|--|--------|
| B. River puffer .....  | 82     |
| C. Grey mullet .....   | 85     |
| D. Black seabream .....  | 85     |
| 2. Optimum condition for cold storage .....                      | 85     |
| A. Tiger puffer .....  | 85     |
| 1) Storage temperature .....                                     | 85     |
| 2) Effect of antibiotic in cold storage .....                    | 86     |
| 3) Effect of cold storage by dilution rate .....                 | 86     |
| 4) Effect of cold storage by depth of medium and agitation ..... | 86     |
| B. Grey mullet .....   | 86     |
| 1) Effect of cold storage by pH of diluent .....                 | 86     |
| C. Black seabream .....  | 87     |
| 1) Effect of cold storage by pH of diluent .....                 | 87     |
| 2) Effect of antibiotic in cold storage .....                    | 87     |
| 3. Statistical analysis .....                                    | 87     |
| <br>Section 3. Results .....                                     | <br>88 |
| 1. Constituent of optimum diluent .....                          | 88     |
| A. Tiger puffer .....  | 88     |
| B. River puffer .....  | 88     |
| C. Grey mullet .....   | 94     |
| D. Black seabream .....  | 94     |
| 2. Optimum condition for cold storage .....                      | 99     |
| A. Tiger puffer .....  | 99     |
| B. Grey mullet .....   | 113    |
| C. Black seabream .....  | 113    |

|   |     |
|---|-----|
| Section 4. Discussion .....   | 119 |
| Chapter IV. Cryopreservation (long-term preservation) .....                         | 127 |
| Section 1. Introduction .....   | 127 |
| Section 2. Materials and methods .....  | 128 |
| 1. Freezing and thawing of spermatozoa .....  | 128 |
| 2. Effect of freezing process on milt property .....                                | 128 |
| A. Change of chemical property and survival rate in cryopreserved spermatozoa ..... | 128 |
| B. Physical damage of spermatozoa .....   | 128 |
| 3. Cryoprotectant .....   | 129 |
| A. Tiger puffer .....   | 129 |
| 1) Evaluation of diluent and cryoprotectant .....                                   | 129 |
| 2) Kind and concentration of cryoprotectant .....                                   | 129 |
| 3) Effect of cryopreservation by equilibrium time .....                             | 130 |
| 4) Effect of addition of bovine serum albumin (BSA) and egg albumin .....           | 130 |
| B. River puffer .....   | 130 |
| 1) Optimum diluent .....  | 130 |
| 2) Kind and concentration of cryoprotectant .....                                   | 131 |
| C. Grey mullet .....  | 131 |
| 1) Optimum diluent .....  | 131 |
| C. Black seabream .....   | 131 |

|   |         |
|---|---------|
| 1) Optimum diluent .....                                | 131     |
| 2) Kind and concentration of cryoprotectant .....       | 131     |
| 3) Effect of cryopreservation by equilibrium time ..... | 132     |
| 4. Thawing temperature .....                            | 132     |
| 5. Statistical analysis .....                           | 132     |
| <br>Section 3. Results .....                            | <br>132 |
| 1. Effect of freezing process on milt property .....    | 132     |
| A. Tiger puffer .....                                   | 133     |
| B. River puffer .....                                   | 133     |
| C. Grey mullet .....                                    | 133     |
| D. Black seabream .....                                 | 133     |
| 2. Cryoprotectant .....                                 | 137     |
| A. Tiger puffer .....                                   | 137     |
| B. River puffer .....                                   | 146     |
| C. Grey mullet .....                                    | 148     |
| D. Black seabream .....                                 | 151     |
| 3. Thawing temperature .....                            | 155     |
| <br>Section 4. Discussion .....                         | <br>155 |
| <br>Chapter V. Conclusion .....                         | <br>163 |
| <br>Chapter VI. References .....                        | <br>169 |
| <br>News materials .....                                | <br>176 |

여 백

# 목 차

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| 제1장 서론 .....                    | 35 |
| 제1절 연구개발의 목적 .....              | 35 |
| 제2절 연구개발의 추진체계 및 범위 .....       | 37 |
| 제2장 정자의 특성 .....                | 39 |
| 제1절 서설 .....                    | 39 |
| 제2절 재료 및 방법 .....               | 40 |
| 1. 실험어와 정액의 채취 .....            | 40 |
| 가. 자주복 .....                    | 40 |
| 나. 황복 .....                     | 40 |
| 다. 승어 .....                     | 41 |
| 라. 감성돔 .....                    | 41 |
| 2. 정자의 구조 및 크기 .....            | 42 |
| 3. 정자의 생리적 특성 .....             | 43 |
| 가. 일반적 특성 .....                 | 43 |
| 나. 물리적 특성 .....                 | 43 |
| 다. 화학적 특성 .....                 | 43 |
| 4. 환경조건에 따른 정자의 생리활성 .....      | 44 |
| 가. 환경변화에 따른 정자의 활력 변화 .....     | 44 |
| 나. 희석액의 이온 조성에 따른 정자의 운동성 ..... | 44 |
| 5. 정자의 운동성 평가 .....             | 45 |

|                            |    |
|----------------------------|----|
| 6. 정자의 생존을 평가 .....        | 45 |
| 제3절 결 과 .....              | 46 |
| 1. 정자의 구조 및 크기 .....       | 46 |
| 가. 자주복 .....               | 46 |
| 나. 황복 .....                | 46 |
| 다. 송어 .....                | 48 |
| 라. 감성돔 .....               | 48 |
| 2. 정자의 생리적 특성 .....        | 52 |
| 가. 자주복 .....               | 52 |
| 나. 황복 .....                | 53 |
| 다. 송어 .....                | 54 |
| 라. 감성돔 .....               | 55 |
| 3. 환경조건에 따른 정자의 생리활성 ..... | 62 |
| 제4절 고 찰 .....              | 76 |
| 제3장 냉장(단기)보존 .....         | 81 |
| 제1절 서 설 .....              | 81 |
| 제2절 재료 및 방법 .....          | 82 |
| 1. 최적 희석액의 조성 .....        | 82 |
| 가. 자주복 .....               | 82 |
| 나. 황복 .....                | 82 |
| 다. 송어 .....                | 85 |

|                                       |     |
|---------------------------------------|-----|
| 라. 감성돔 .....                          | 85  |
| 2. 냉장보존을 위한 최적조건 .....                | 85  |
| 가. 자주복 .....                          | 85  |
| 1) 보존적온 .....                         | 85  |
| 2) 냉장보존에서 항생제의 영향 .....               | 86  |
| 3) 희석비율에 따른 보존효과 .....                | 86  |
| 4) 보존액층의 두께와 보존 중 agitation의 효과 ..... | 86  |
| 나. 송어 .....                           | 86  |
| 1) 희석액의 pH에 따른 냉장보존 효과 .....          | 86  |
| 다. 감성돔 .....                          | 87  |
| 1) 희석액의 pH에 따른 냉장보존 효과 .....          | 87  |
| 2) 냉장보존에서 항생제의 영향 .....               | 87  |
| 3. 통계처리 .....                         | 87  |
| <br>                                  |     |
| 제3절 결 과 .....                         | 88  |
| 1. 최적 희석액의 조성 .....                   | 88  |
| 가. 자주복 .....                          | 88  |
| 나. 황복 .....                           | 88  |
| 다. 송어 .....                           | 94  |
| 라. 감성돔 .....                          | 94  |
| 2. 냉장보존을 위한 최적조건 .....                | 99  |
| 가. 자주복 .....                          | 99  |
| 나. 송어 .....                           | 113 |
| 다. 감성돔 .....                          | 113 |
| <br>                                  |     |
| 제4절 고 찰 .....                         | 119 |

|   |     |
|---|-----|
| 제4장 냉동(장기)보존 .....                              | 127 |
| 제1절 서 설 .....                                   | 127 |
| 제2절 재료 및 방법 .....                               | 128 |
| 1. 정자의 냉동과 해동방법 .....                           | 128 |
| 2. 냉동처리가 정액성상에 미치는 영향 .....                     | 128 |
| 가. 냉동보존한 정자의 화학적 조성변화와 생존율 .....                | 128 |
| 나. 정자의 물리적 손상 .....                             | 128 |
| 3. 동해방지제 .....                                  | 129 |
| 가. 자주복 .....                                    | 129 |
| 1) 적정 희석액과 동해방지제의 평가 .....                      | 129 |
| 2) 적정 동해방지제의 종류와 농도 .....                       | 129 |
| 3) 평형시간에 따른 보존효과 .....                          | 130 |
| 4) Bovine serum albumin (BSA)과 계란난황의 첨가효과 ..... | 130 |
| 나. 황복 .....                                     | 130 |
| 1) 적정 희석액 .....                                 | 130 |
| 2) 적정 동해방지제의 종류와 농도 .....                       | 131 |
| 다. 승어 .....                                     | 131 |
| 1) 적정 희석액 .....                                 | 131 |
| 라. 감성돔 .....                                    | 131 |
| 1) 적정 희석액 .....                                 | 131 |
| 2) 적정 동해방지제의 종류와 농도 .....                       | 131 |
| 3) 평형시간에 따른 보존효과 .....                          | 132 |
| 4. 해동온도 .....                                   | 132 |

|                             |     |
|-----------------------------|-----|
| 5. 통계처리 .....               | 132 |
| 제3절 결 과 .....               | 132 |
| 1. 냉동처리가 정액성상에 미치는 영향 ..... | 132 |
| 가. 자주복 .....                | 133 |
| 나. 황복 .....                 | 133 |
| 다. 승어 .....                 | 133 |
| 라. 감성돔 .....                | 133 |
| 2. 동해방지제 .....              | 137 |
| 가. 자주복 .....                | 137 |
| 나. 황복 .....                 | 146 |
| 다. 승어 .....                 | 148 |
| 라. 감성돔 .....                | 151 |
| 3. 해동온도 .....               | 155 |
| 제4절 고 찰 .....               | 155 |
| 제5장 결 론 .....               | 163 |
| 제6장 참고문헌 .....              | 169 |
| 보도자료 .....                  | 176 |

여 백

# 제1장 서론

## 제1절 연구개발의 목적

어류양식은 크게 종묘생산과 양성으로 나뉘어진다. 이중 양성에서는 질 좋은 상품어를 생산하기 위하여 건강한 종묘의 확보가 우선적으로 요구된다. 그러므로 유전형질이 우수하고 건강도가 좋은 암수 친어로부터 동시에 알과 정자를 채취하여 효과적으로 수정시켜 우량종묘로 키워내는 일은 매우 중요하다.

우리나라에서 양식종묘의 대량생산이 가능해진 어종은 넙치, 조피볼락 및 참돔 등이며, 개발중인 어종으로는 자주복, 농어 및 능성어 등을 들 수 있다. 이중 넙치의 종묘생산 기술은 1980년대 초부터 개발되기 시작하였으며, 현재는 수조내에서 사육된 친어의 자연산란을 통해 얻어진 수정란을 이용한 종묘의 대량생산이 가능하게 되었다. 그러나 종묘의 대량생산 기술이 개발중에 있는 어종 특히, 자주복, 황복 및 송어의 경우에 있어서는 아직까지 인위적인 친어사육에 의한 질 좋은 수정란의 확보가 어려운 실정이다. 그러므로 자연산 친어로부터 구득한 수정란을 사용하여 종묘를 생산할 수 밖에 없다. 이러한 자연산 친어 유래의 수정란 구득은 자연자원의 급격한 감소로 인하여 많은 어려움이 따르고 있으며, 더욱이 어획현장에서는 한쪽 성의 친어만 구해지거나 생식소의 미숙 또는 과숙에 의해 양질의 알과 정자를 동시에 얻기 힘든 경우가 많다.

이러한 어려움을 해결하기 위해서 배우자의 관리 및 보존기술이 요구되는데, 이중 정자보존은 친어의 방란·방정시기 및 성비의 불균형에 의해 초래되는 채란 및 채정의 어려움을 극복할 수 있게 하며, 수컷 친어의 사육관리에 필요한 노력

과 경비를 절감할 수 있게 한다. 또한 우량형질을 가진 어류의 선택교배를 가능하게 하고 멸종 위기에 처한 종이나 재래종의 유전형질을 보존함으로써 gene pool의 관리를 손쉽게 한다. 이와 같이 여러가지 장점을 가진 어류정자의 보존기술은 크게 액체배지에 의한 단기보존과 냉동생물학을 바탕으로 한 장기보존의 두 방향으로 발전해 왔다.

어류정자의 냉장보존에 관해서는 Barrett(1950)가 연어류의 정자를 0°C에서 보존하였을 때 며칠동안 생존했다는 결과를 얻은 이후, 최근까지 꾸준히 연구되고 있다. 특히 희석액에 따른 보존효과(Chao et al. 1975; Hara et al. 1982; McNiven et al. 1993), 산소의 공급에 따른 정자의 수정능력 향상(Stoss and Holtz 1983a) 및 항생제 사용에 따른 보존기간 연장(Chao et al. 1992; Saad et al. 1988; Stoss et al. 1978) 등에 대한 연구가 주류를 이루고 있다. 그러나 정자보존에 필요한 이러한 여러 조건들은 어종에 따라 큰 차이를 보이고 있어, 각 어종의 정자보존에 필요한 방법들을 획일적으로 적용할 수 없으므로, 보존하고자 하는 어류 정자의 각 보존조건에 대해 보존효과를 세밀하게 분석하고 이를 바탕으로 종합된 보존방법을 구축해야 한다.

어류정자의 냉동보존에 있어서는 1949년 Blaxter가 반년간 보존했던 청어 정액으로 인공수정에 성공한 이후, 많은 연구자들에 의해 여러 어종에 대한 정자보존 기술개발이 이루어져 오고 있다. 특히 1970년대 후반부터는 보존이 어렵다고 생각되었던 연어, 송어류에서도 냉동보존 정액을 이용하여 80% 전후의 수정률을 얻는(黒倉 1983) 등 기술적 진보가 있었고, 최근에는 그 기술의 유효성을 산업현장에 적용시키는 방향으로 진행되고 있다.

그러나 냉동보존에 관한 최근까지의 연구는 주로 담수어류(黒倉 1984; Kurokura et al. 1984; Tiersch et al. 1994)와 연어류(Baynes and Scott 1987; Ott

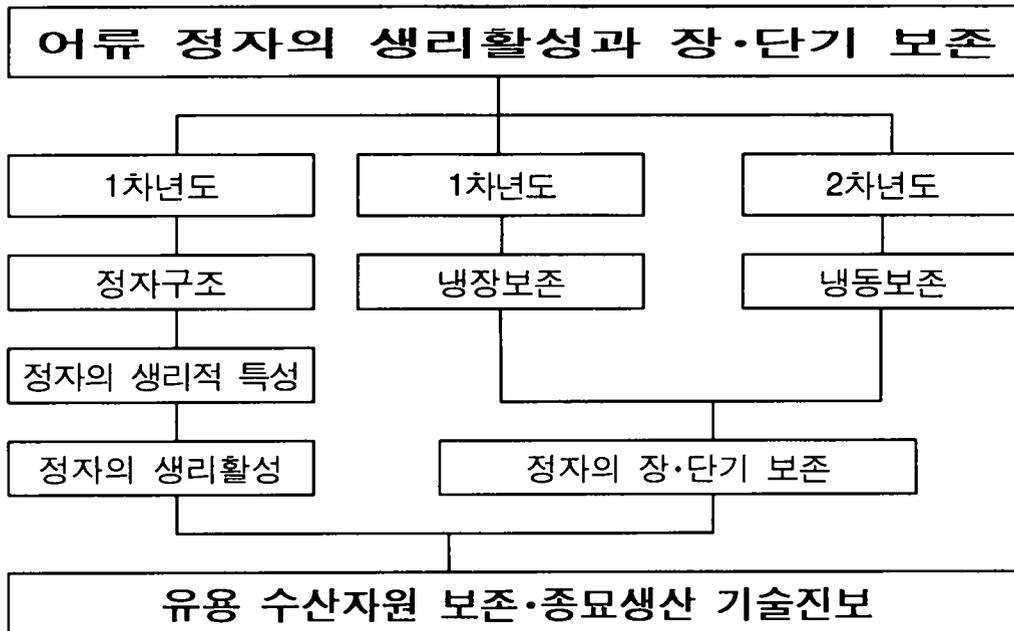
and Horton 1971; Piironen 1993; Stoss and Holtz 1983b; Yamamoto 1976)를 중심으로 진행되어져 왔으며, 그 연구내용은 희석액, 동해방지제, 냉동률, 해동용액 및 해동속도에 관한 것이었다. 이중 희석액에 관한 연구는 희석과정에서 정자가 활성화하는 것을 방지하기 위해 정장과 혈장의 조성을 모방한 희석액의 개발(Erdahl and Graham 1987)과 포유동물 정자에서 냉동시 세포막을 보호하는 것으로 알려진 단당류와 당중합체가 어류정자의 세포막 보호에 미치는 영향(Wilmut and Polge 1977) 및 어종별, 희석액별 bovine serum albumin(BSA)과 계란난황의 상승효과(Babiak et al. 1995; Piironen 1993) 등에 집중되어져 왔다. 그러나 이와 같은 여러 희석액에 대한 어종별 정자의 종특이성을 세밀하게 조사하여 적정 희석액을 결정하기 위한 연구결과는 거의 찾아볼 수 없다.

따라서, 본 연구개발사업의 목적은 1차년도에 해산어류 정자의 생리활성을 파악하기 위하여 유용 해산어류인 복어류(*Takifugu* sp.), 송어(*Mugil cephalus*) 및 감성돔(*Acanthopagrus schlegeli*) 정자의 물리·화학적 특성과 정자의 활성 및 냉장(단기)보존 방법을 조사하였다. 2차년도에는 해산어류 정자의 냉동(장기)보존을 위해 필요한 조건, 특히 다양한 희석액이 냉동보존시 정자의 운동성과 생존율에 미치는 영향을 파악하고, 이를 바탕으로 하여 송어와 복어류 및 감성돔 정자의 냉동보존에 있어 비교적 간단하고도 적합한 방법을 구명하는 데에 목적을 두었다.

## 제2절 연구개발의 추진체계 및 범위

다음과 같은 추진 체계에 따라 유용 해산 어류인 복어류와 송어 및 감성돔을 실험 재료로 사용하여, 각 연구항목에 따라 연구한다. 송어는 산란기인 4~6월에 목포와 강화도 근해에서 어획된 자연산 친어, 자주복은 산란기 이전에 양식중인 성어, 황복은 산란기인 5~6월에 임진강 상류에서 어획된 친어를 구입하여 사용

하였다. 감성돔의 수컷 친어는 부경대학교 양식생리학연구실의 순환여과식 사육 시설에서 사육중인 것을 사용하였고, 암컷은 완도 근해에서 어획된 친어를 사용 하였다.



## 제2장 정자의 특성

### 제1절 서설

산란시기에 배우자 질의 좋고 나쁨을 판정하는 일은 인공 종묘생산 결과를 향상시킬 수 있는 중요한 과정이다. 수정률이나 부화율을 높이기 위하여 채란한 알에 대한 평가 방법은 다수의 연구자들에 의해 보고되어 왔었다(Craik 1985; Kashiwagi et al. 1987; 清野 1974). 그러나 채취된 정액 평가에 관한 자료는 아직 빈약한 실정이다. 따라서 효과적인 인공 종묘생산 방법을 확립하기 위해서는 산란기간중 알 뿐만 아니라 정액의 질적인 평가도 선행되어야 할 것이다.

현재까지 보고된 정액의 특성에 관한 연구(Aas et al. 1991; Kruger et al. 1984; Lahnsteiner et al. 1994; Suquet et al. 1992)에서는 정액의 경시적 변화를 고려하지 않은 상태에서 단순한 물리·화학적 특성만 평가하였을 뿐으로, 산란기간 동안 경시적으로 정액의 특성변화를 조사한 보고는 연어과 어류에 국한되어 있다 (Buyukhatipoglu and Holtz 1984; Munkittrick and Moccia 1987; Piironen 1985). 또한 인공 수정시 이용 가능한 해산 어류의 정자활성에 관한 자료는 매우 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 산업적으로 유용한 해산 어류인 복어류와 송어 및 감성돔을 대상으로 배정 기간중 정액의 물리·화학적 특성변화를 조사하고, 환경조건에 따른 정자의 생리활성을 파악하여 어류의 인공종묘 생산을 위한 수정 작업시 효과적인 채정시기의 판정과 높은 수정률을 얻기 위하여 기반 지식이 되는 정자활성에 관한 기초자료를 얻고자 하였다.

## 제2절 재료 및 방법

### 1. 실험어와 정액의 채취

#### 가. 자주복

실험어는 2~3년생 자주복 수컷으로, 재료구입 후 국립수산진흥원 남제주수산종묘배양장에서 사육하면서 채정 및 정자보존 실험에 사용하였다. 실험어의 전장은 43.5~45.1 cm, 체중은 1700~2000 g이었다. 사육수조의 용량은 약 120톤이었으며, 실험기간 중에는 우수식으로 관리하면서 매일 moist pellet을 어체가 반복될 때까지 공급하였다.

사육중인 자주복 정액의 채취가능 기간을 알기 위하여, 자주복의 번식 개시시기인 4월 중순부터 7일 간격으로 수컷 친어의 복부를 가볍게 압박하여 정액의 유출 여부를 조사하였다.

어체로부터 정액을 채취하기 위하여 실험어를 200 ppm 3-aminobenzoic acid ethyl ester(MS-222)에 마취시킨 후, 비노생식공 주위를 가볍게 눌러 오줌과 배설물을 미리 제거하였다. 이후 가아제로 비노생식공을 깨끗이 닦은 다음, 복부를 부드럽게 여러번 압박하여 채정하였다. 채취된 정액은 시험관에 넣어 밀봉한 후 얼음을 채운 ice box에서 보관하였으며, 채정후 1시간 이내에 사용하였다.

#### 나. 황복

실험어로는 임진강 상류에서 산란·방정을 위해 소상한 황복의 수컷 어미를 사용하였으며, 실험에 이용한 정액과 알은 수컷 8마리(전장 30.5~33.5 cm, 체중 510~615 g)와 암컷 10마리(전장 33.0~35.0 cm, 체중 710~865 g)에서 얻었다.

어체로부터 정액을 채취하기 위하여 비뇨생식공 주위를 가볍게 눌러 오줌과 배설물을 미리 제거한 후 마른 가아제로 비뇨생식공 주위를 깨끗이 닦은 다음, 복부를 여러번 가볍게 문질러 채정하였다. 채취된 정액은 시험관에 넣어 밀봉한 후 실험에 사용될 때까지 얼음을 채운 ice box에서 보관하였으며, 채정후 1시간 이내에 실험에 이용하였다.

#### 다. 송어

실험어는 전라남도 목포와 진도 근해 및 강화도에서 어획된 성숙한 송어를 사용하였다. 실험어의 전장은  $47.4 \pm 55$  cm, 체중은  $1182 \pm 332$  g이었다. 정액의 채취는 비뇨생식공 주위를 가볍게 눌러 오줌과 배설물을 미리 제거한 후 마른 가아제로 비뇨생식공 주위를 깨끗이 닦은 다음, 복부를 여러번 가볍게 문질러 채정하였다. 채취된 정액은 시험관에 넣어 밀봉한 후, 얼음을 채운 ice box에 넣어 수정시킬 장소까지 운반하여 실험에 사용하였다.

#### 라. 감성돔

채정을 위한 실험어로는 부경대학교 양식생리학연구실의 순환여과 사육시스템에서 사육한 3년생 감성돔을 사용하였다(Table 1). 실험기간중 사육수의 수온은  $17.5 \sim 23.0^\circ\text{C}$  (평균  $20.7 \pm 1.2^\circ\text{C}$ ), 비중은  $1.0227 \sim 1.0263$  (평균  $1.0246 \pm 0.0011$ ) 범위였다. 사료는 시판용 넙치 부상사료였으며, 1일 공급량은 어체중의 1% 내외로 하였다.

사육한 감성돔의 채정 가능한 기간을 알아내기 위하여 어체의 복부가 외형적으로 부풀어 오르는 시기인 3월 말부터 7일 간격으로 수컷 어미의 복부를 가볍게 압박하여 정액의 유출 여부를 조사하였다.

어체로 부터 정액을 채취하기 위하여 실험어를 200 ppm의 MS-222에 마취시킨 다음 개체별로 표지하고, 비뇨생식공 주위를 가볍게 눌러 오줌과 배설물을 미리 제거하였다.

Table 1. Measurements of the adult black seabream used for the experiment

|        | Number of fish | Total length (cm) | Body weight (g) |
|--------|----------------|-------------------|-----------------|
| Male   | 60             | 19.9±19           | 146.3±43.5      |
| Female | 3              | 27.1±2.5          | 650.1±86.2      |

이후 마른 가아제로 비뇨생식공 주위를 깨끗이 닦은 뒤, 복부를 여러번 가볍게 문질러 채정하였다. 채취된 정액은 시험관에 넣어 밀봉한 후 실험에 사용될 때까지 얼음을 채운 ice box에서 보관하였으며, 채정후 1시간 이내에 실험에 사용하였다.

## 2. 정자의 구조 및 크기

친어로부터 채취직후의 신선한 정자에 대한 미세구조를 관찰하기 위하여 투과형 전자현미경 시료를 작성하였다. 신선한 정액과 냉동보존한 정액을 0.1 M phosphate buffer solution(PBS, pH 7.2)으로 완충시킨 2.5% glutaraldehyde 용액으로 4°C에서 2시간 동안 전고정하였다. 이후 PBS로 10분간 세척한 후, 1% osmium tetroxide(OSO<sub>4</sub>)로 4°C에서 2시간 동안 후고정하였다. 고정이 끝난 재료는 PBS로 세척하고 50~100%의 단계별 ethanol 농도에서 15분씩 탈수하였다. 탈수가 끝난 시료는 propylene oxide와 epon(A+B)의 혼합물에 넣어 37, 45 및 60°C

에서 각각 12, 12 및 48시간씩 중합시킨 다음, epon 812에 포매하였다. 포매된 정자의 시료는 ultramicrotome(LKB, Nova, Sweden)에 의해 두께 0.5  $\mu\text{m}$ 로 semithin section한 다음, toluidine blue로 염색하여 관찰할 부위를 결정하였다. 관찰부위가 정해진 포매시료는 다시 70 nm 두께로 박절하였다. Ultrathin section한 절편은 uranylacetate와 lead citrate 용액으로 이중염색하여 투과형 전자현미경(JEM 1200 E-XII, 60~80 Kv, JEOL, Japan)으로 관찰하였다. 관찰된 정자에 대하여는 정자의 머리크기, 미토콘드리아의 크기와 갯수 및 편모 구조 등을 조사하였다.

### 3. 정자의 생리적 특성

#### 가. 일반적 특성

채취된 정액의 양은 0.1 ml까지 눈금이 표시된 시험관을 사용하여 측정하였다. 정자의 농도는 2% eosin 용액으로 정자를 염색한 다음, 광학현미경 아래에서 혈구계산판에 의해 계수하였으며, spermatocrit는 일반적인 혈액분석 방법인 microhematocrit법을 변형하여 측정하였다(Bouck and Jacobson 1976).

#### 나. 물리적 특성

정액을 원심분리(15,000 rpm, 10분)하여 얻은 정장의 삼투질농도와 pH는 각각 삼투압 측정기(The Advanced™ Osmometer)와 pH측정기(pH/Ion Meter EP-880)를 사용하여 분석하였다.

#### 다. 화학적 특성

정액을 원심분리하여 얻은 정자와 정장의 총 단백질, 총 지질 및 glucose 함량

은 각각 biuret 반응법, 비색정량법, 효소법으로, Na 및 K 농도는 불꽃 분광광도법으로 분석하였다(由岐 1984).

#### 4. 환경조건에 따른 정자의 생리활성

##### 가. 환경변화에 따른 정자의 활력 변화

희석비율에 따른 정자의 활력을 평가하기 위하여 정액과 인공해수를 각각 1:10, 1:20, 1:50 및 1:100의 비율로 희석하여 경과시간에 따라 송어 정자의 운동성을 조사하였다.

난생형 어류의 수정 매질인 해수의 삼투질농도에 따른 정자의 활성을 조사하기 위하여 Table 2와 같은 조성의 인공해수에 증류수를 첨가하여 삼투질농도를 변화시킨 후, 여기에 정자를 혼합하여 정자의 활성을 평가하였다.

해산어류 정자의 활성 매질인 인공해수의 pH를 NaOH와 HCl을 이용하여 조절한 후 정액과 혼합하여 정자의 활성을 평가하였다.

##### 나. 희석액의 이온 조성에 따른 정자의 운동성

희석액의 이온조성에 따른 운동성을 평가하기 위하여 원정액을 희석액과 1:50의 비율로 섞어 광학현미경 아래에서 정자의 운동성을 평가하였다.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  및  $\text{Ca}^{2+}$  등 양이온 농도별 삼투질농도에 따른 정자의 운동성을 평가하기 위하여 인공해수에 각 이온이 결여된 상태에서 1M의 NaCl, KCl,  $\text{MgCl}_2$  및  $\text{CaCl}_2$  용액을 첨가하여 이온농도와 삼투질농도를 단계적으로 변화시킨 희석액을 사용하였다. 정자의 운동성은 각기 다른 개체를 사용하여 5회 반복측정에 의해 조사하였다.

Table 2. Mineral composition of artificial seawater

| Constituent        | Concentration |
|--------------------|---------------|
| NaCl               | 27.0 g        |
| KCl                | 0.4 g         |
| MgCl <sub>2</sub>  | 4.6 g         |
| CaCl <sub>2</sub>  | 1.2 g         |
| NaHCO <sub>3</sub> | 0.5 g         |
| Distilled water    | 1000 ml       |

#### 5. 정자의 운동성 평가

냉장보존과 냉동보존의 실험별 정액의 처리조건에 따른 운동성을 평가하기 위하여, 전술한 각 실험을 실시한 후의 정액을 자연해수와 1:3의 비율로 섞은 다음, 광학현미경으로 관찰된 운동지수에 따라 점수를 부여하였다(Table 3). 그리고, Table 3의 각 운동점수와 운동정자의 비율에 따라 Strussmann et al.(1994)의 방법을 변형하여 정자활성지수(sperm activity index, SAI)를 계산하였다. 각 실험에 대한 정자활성 지수는 2~5회 측정하여 평균을 구하였다.

#### 6. 정자의 생존율 평가

액상 및 냉동보존 실험에서의 실험 후 정자의 생사 여부는 정자를 5% eosin-10% nigrosin(Blom 1950; Fribourgh 1966)에 염색한 다음, 정자의 염색 정도에 따라 판별하였으며, 광학현미경( $\times 1,000$ ) 아래에서 3회 측정하여, 전체 정자수에 대한 살아 있는 정자수의 비율로 생존율을 산정하였다.

Table 3. Numerical index for the evaluation of sperm motility

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

$$SAI = \text{score} \times \text{percentage of motile spermatozoa}(\%)/100$$

### 제3절 결과

#### 1. 정자의 구조 및 크기

##### 가. 자주복

자주복 정자는 머리, 중편 및 꼬리로 구성되어 있었다. 머리는 긴 타원형으로 장경은 1.16~1.92(평균  $1.35 \pm 0.30$ )  $\mu\text{m}$ 였고, 단경은 0.51~0.74(평균  $0.65 \pm 0.10$ )  $\mu\text{m}$ 였다. 치밀한 핵질로 충만한 머리는 그 선단에 침체구조를 가지지 않았다(Fig. 1A). 두 개의 중심소체는 머리 뒤쪽의 함입한 곳에 위치하며, 서로 직각으로 배치되어 있었고, 원단중심소체(distal centriole)는 편모와 연결되어 있었다. 미토콘드리아는 머리의 아래쪽에 달려 있으며(Fig. 1B), 직경은 0.2  $\mu\text{m}$  전후이고, 그 갯수는 7개였다. 편모는 전형적인 9+2 구조를 나타내는 1쌍의 중심소관과 9쌍의 미소관으로 구성되어 있었다(Fig. 1B).

##### 나. 황복

황복 정자도 머리, 중편 및 꼬리의 3부분으로 구성되어 있었다. 머리는 긴 타원

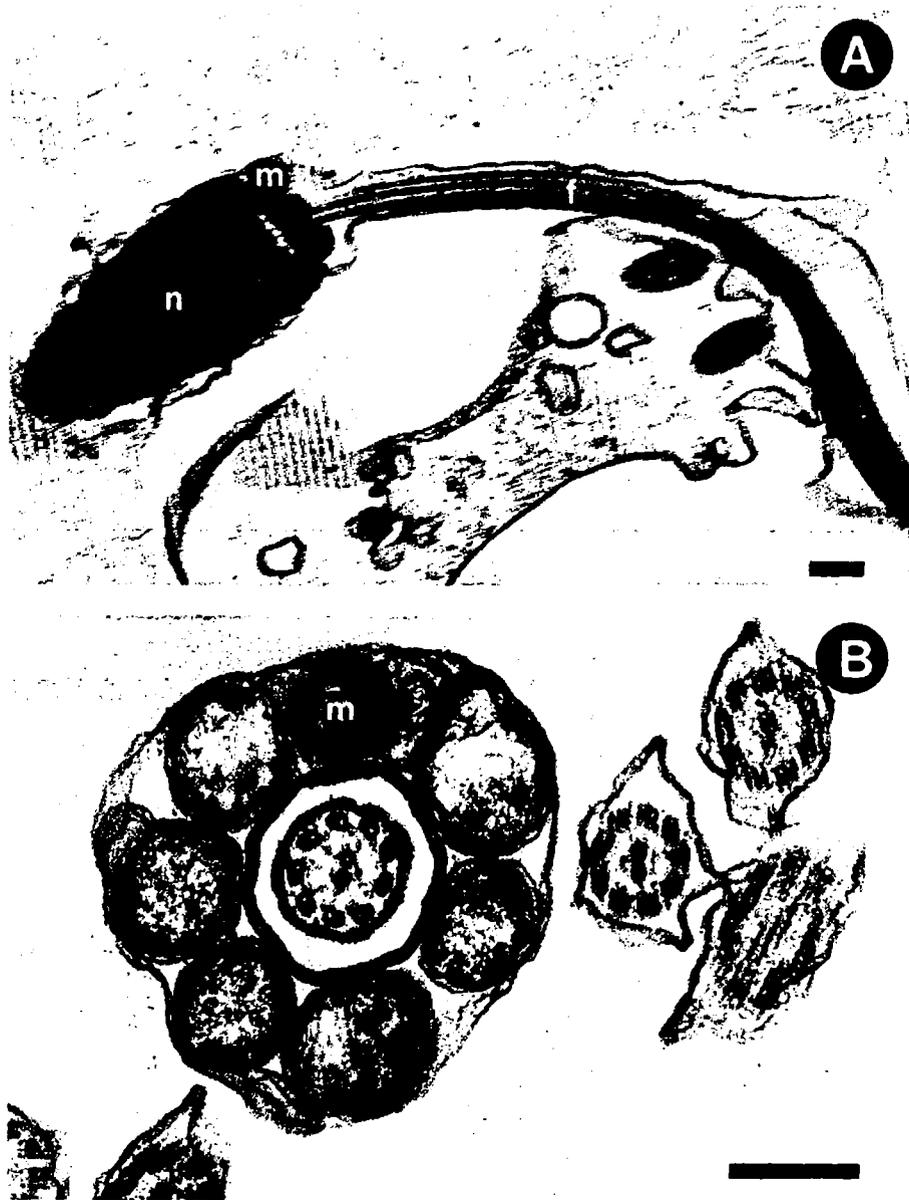


Fig. 1. Electron micrographs of fresh spermatozoa in tiger puffer. A: Sagittal section of spermatozoon showing head with compact chromatin, mitochondria and flagellum. B: Cross section of middle piece showing a flagellum surrounded by seven mitochondria. Note the 9+2 pattern of flagellum. f: flagellum, m: mitochondrion, n: nucleus. Bar=0.2  $\mu$ m.

형으로 장경은  $1.81 \pm 0.28 \mu\text{m}$ 였고, 단경은  $0.62 \pm 0.03 \mu\text{m}$ 였다. 치밀한 핵질로 충만한 머리는 그 선단에 침체구조를 가지지 않았다(Fig. 2A). 두 개의 중심소체는 머리 뒤쪽의 함입한 곳에 위치하며, 서로 직각으로 배치되어 있었고, 원단중심소체는 편모와 연결되어 있었다. 미토콘드리아는 머리의 아래쪽에 달려 있으며, 편모는 9+2 구조를 보였다(Fig. 2B).

#### 다. 송어

송어 정자는 구형의 머리를 가지고 있었으며 머리의 직경은  $1.26 \pm 0.08 \mu\text{m}$ 였고, 머리 전단에서 후단까지의 길이는  $1.06 \pm 0.07 \mu\text{m}$ 였다. 머리에는 침체상의 구조가 관찰되지 않았으며, 염색질은 과립상이었다(Fig. 3A). 미토콘드리아는 구형으로 머리의 후반부에 위치하며 편모는 9+2 구조를 나타내는 1쌍의 중심소관과 9쌍의 미소관으로 구성되어 있었다(Fig. 3B).

#### 라. 감성돔

감성돔 정자는 머리, 중편부 및 꼬리로 구성되어 있으며, 머리는 구형으로 직경이  $1.41 \sim 1.58 \mu\text{m}$ (평균  $1.49 \pm 0.07 \mu\text{m}$ )였고, 머리 전반부에서 후반부까지의 길이는  $1.22 \sim 1.42 \mu\text{m}$ (평균  $1.33 \pm 0.07 \mu\text{m}$ )였다. 치밀한 핵질로 충만한 머리는 그 선단에 침체구조를 가지지 않았다(Fig. 4A). 두개의 중심소체는 머리 뒤쪽의 함입한 곳에 위치하며, 서로 직각으로 배치되어 있었고, 후부 중심소체는 편모와 연결되어 있었다(Fig. 4A). 미토콘드리아는 직경  $0.47 \mu\text{m}$  전후의 구형으로 2개가 관찰되며, 편모의 구조는 전형적인 9+2 구조였다(Fig. 4B).

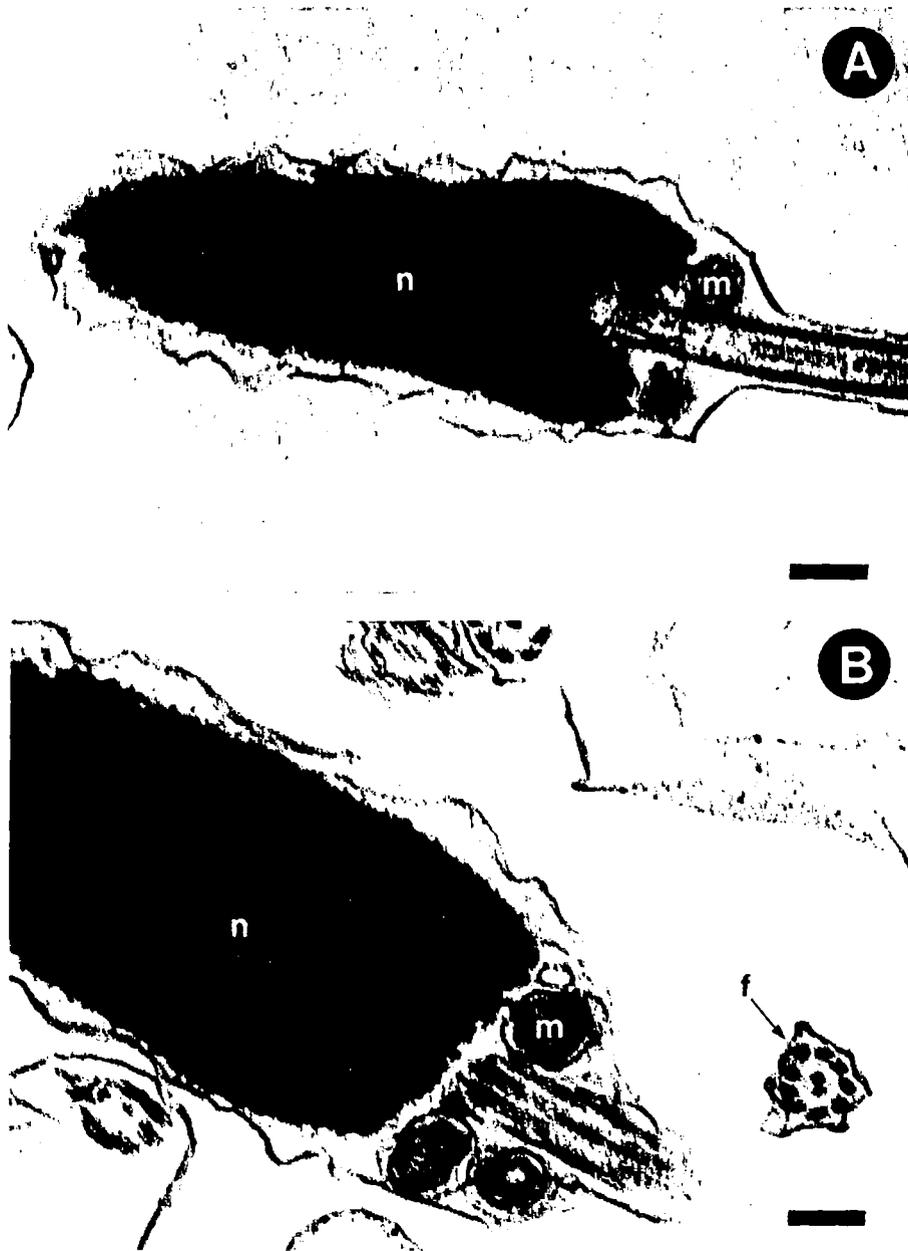


Fig. 2. Electron micrographs of fresh spermatozoa in river puffer. A: Sagittal section of spermatozoon showing head with compact chromatin, mitochondria and flagellum. B: Sagittal section of flagellum with 9+2 pattern. f: flagellum, m: mitochondrion, n: nucleus. Bar=0.2  $\mu$ m.

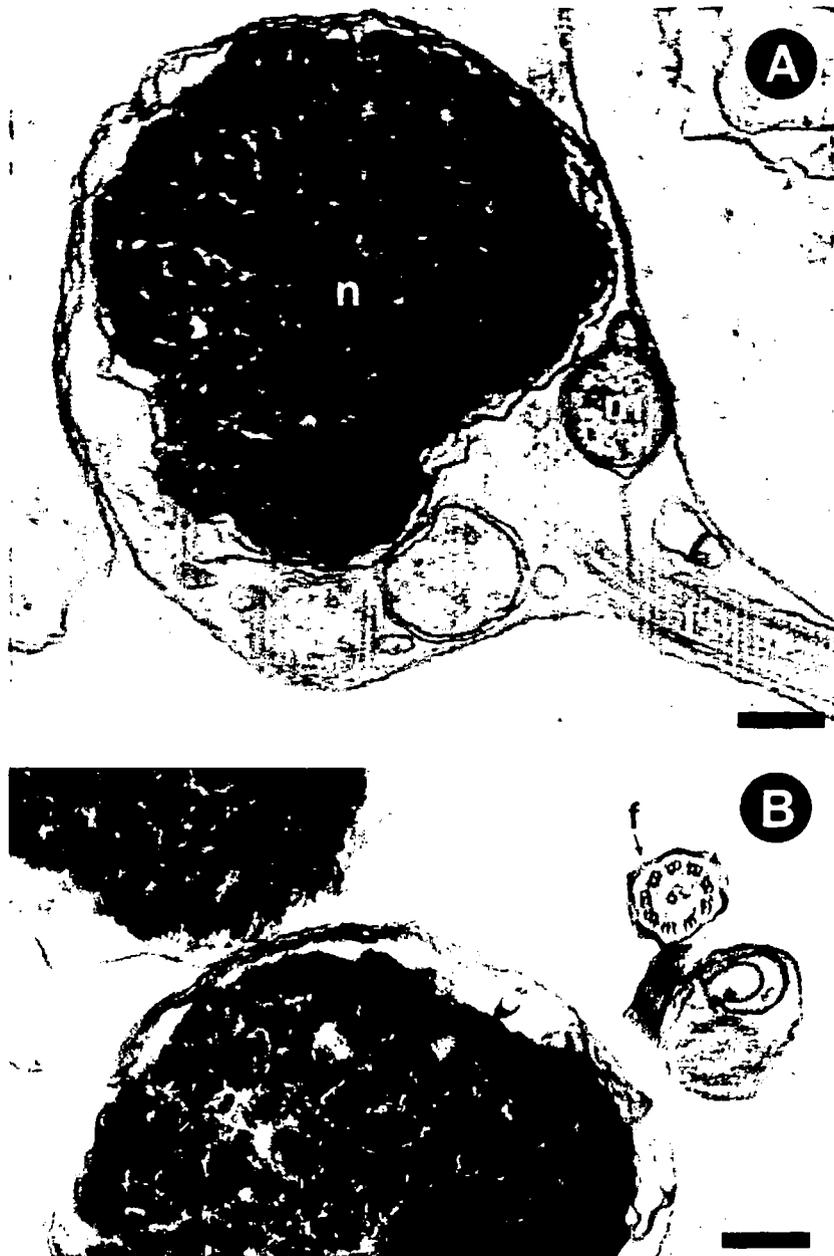


Fig. 3. Electron micrographs of fresh spermatozoa in grey mullet. A: Sagittal section of spermatozoon showing head with granular chromatin, mitochondria and flagellum. B: Cross section of flagellum with 9+2 pattern. f: flagellum, m: mitochondrion, n: nucleus. Bar=0.2  $\mu$ m.

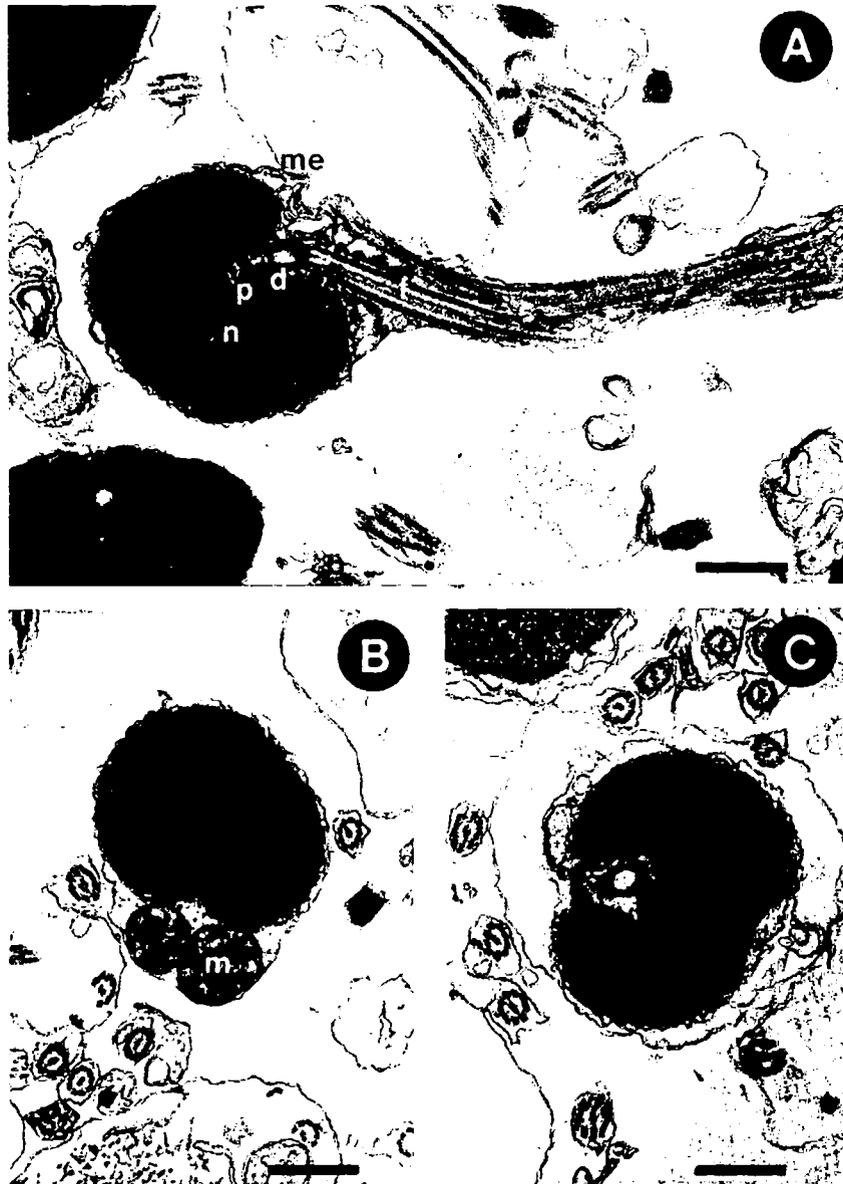


Fig. 4. Electron micrographs of fresh spermatozoa in black seabream. A: Sagittal section of head showing compact chromatin, the centriole and flagellum. B: Sagittal section of head showing mitochondria. Note the 9 + 2 pattern of flagellum (arrow). C: Cross section of head showing proximal centriole. d: distal centriole, f: flagellum, m: mitochondrion, me: plasma membrane, p: proximal centriole. Bar=0.5  $\mu$ m.

## 2. 정자의 생리적 특성

### 가. 자주복

신선한 자주복 정액의 일반적 특성은 Table 4와 같다. 채정기간 동안  $\text{mL}$ 당 정자 수는  $8.5 \times 10^{10} \sim 10.1 \times 10^{10}$  (평균  $9.81 \pm 0.34 \times 10^{10}$ )이었으며, 채정기간의 후반으로 갈수록 정자수가 점차적으로 감소하는 경향을 보였다. Spermatocrit 값은 채정기간 동안 높은 값(평균  $97.8 \pm 0.8$ )을 보였다. 자주복 정액을 원심분리하여 얻은 정장의 물리적 성상중 정장의 pH와 삼투질농도는 각각  $8.2 \pm 0.2$ ,  $383 \pm 2$  mOsm/kg이었다.

Table 4. Properties of milt and seminal fluid in tiger puffer

| Properties   | Milt            |
|--|-----------------|
| Spermatocrit   | $97.8 \pm 0.8$  |
| Spermatozoa concentration ( $\times 10^{10}/\text{mL}$ ) | $9.81 \pm 0.34$ |
| pH   | $8.2 \pm 0.2$   |
| Osmolality (mOsm/kg)                                     | $383 \pm 2^*$   |

\* seminal fluid

자주복 정액을 원심분리하여 얻은 정자 및 정장의 화학적 성상은 Table 5와 같다. 총 지질 함량은 정자에 비해 정장에서 높은 값을 보였고, 총 단백질 함량은 정장에 비해 정자에서 높은 값을 보였다. 그러나 glucose는 검출되지 않았다. Na와 K 함량은 정장과 정자 모두에서 각각  $48 \sim 51$  mEq/ℓ,  $47 \sim 51$  mEq/ℓ로 서로 비슷한 수준이었다.

Table 5. Chemical properties of spermatozoa and seminal fluid in tiger puffer

| Properties              | Spermatozoa     | Seminal fluid    |
|-------------------------|-----------------|------------------|
| Total protein (g/100ml) | 1.4<br>(1.4)    | 0.1~0.2<br>(0.1) |
| Total lipid (mg/100ml)  | 27~33<br>(30.0) | 82~89<br>(85.5)  |
| Glucose (mg/100ml)      | ND              | ND               |
| Na (mEq/ ℓ)             | 48~49<br>(48.3) | 49~51<br>(50.0)  |
| K (mEq/ ℓ)              | 47~48<br>(47.3) | 50~51<br>(50.3)  |

( ) : average, ND : not detectable.

#### 나. 황복

채정기간 동안 황복 정액의 일반적 특성은 Table 6과 같다. 정액 1 ml당 정자 농도는  $1.13 \pm 0.27 \times 10^{10}$  마리였으며, spermatocrit는  $64.8 \pm 1.3$ 이었다. 정장의 화학적 조성은 총 단백질 함량이  $0.07 \pm 0.05$  g/100ml였으나, glucose는 자주복 정장에서와 같이 검출되지 않았다(Table 7).

Table 6. Properties of milt and seminal fluid in river puffer

| Properties   | Milt            |
|--|-----------------|
| Spermatocrit   | $64.8 \pm 1.3$  |
| Spermatozoa concentration ( $\times 10^{10}/\text{ml}$ ) | $1.13 \pm 0.27$ |
| Osmolality (mOsm/kg)                                     | $266 \pm 2$     |

\* seminal fluid

Table 7. Seminal fluid chemical properties of river puffer

| Properties              | Spermatozoa         | Seminal fluid      |
|-------------------------|---------------------|--------------------|
| Total protein (g/100ml) | 1.3~1.9<br>(1.6)    | 0~0.1<br>(0.1)     |
| Total lipid (mg/100ml)  | 23~180<br>(69.4)    | 3~40<br>(28.0)     |
| Glucose (mg/100ml)      | ND*                 | ND*                |
| Na (mEq/ ℓ)             | 41~42<br>(42.0)     | 124~146<br>(130.7) |
| K (mEq/ ℓ)              | 44.1~45.5<br>(44.6) | 9.9~14.5<br>(12.3) |

\* Not detected

다. 숭어

평균 전중이  $718 \pm 166$  g인 숭어 친어 한 마리의 정액량은 2.3~0.2 ml로 평균  $0.85 \pm 0.80$  ml였으며, 정액의 ml당 정자농도와 spermatocrit는 각각  $1.11 \pm 0.36 \times 10^{10}$  마리와  $6.7 \pm 0.4$ 였다(Table 8). 정자와 정장의 총 단백질 함량은 정자가  $1.7 \pm 0$  g/100ml, 정장이  $0.9 \pm 0.4$  g/100ml였고, 총 지질 함량은 정자의  $38 \pm 3$  mg/100ml에 비해 정장이  $226 \pm 95$  mg/100ml로 높았다(Table 9).

Table 8. Properties of milt and seminal fluid in grey mullet

| Properties   | Milt            |
|--|-----------------|
| Spermatocrit   | $96.7 \pm 2.6$  |
| Spermatozoa concentration ( $\times 10^{10}/\text{ml}$ ) | $1.11 \pm 0.36$ |
| Osmolality (mOsm/kg)                                     | $370 \pm 6^*$   |

\* seminal fluid

Table 9. Chemical properties of spermatozoa and seminal fluid in grey mullet

| Properties              | Spermatozoa         | Seminal fluid         |
|-------------------------|---------------------|-----------------------|
| Total protein (g/100ml) | 1.7<br>(1.7)        | 0.5~1.5<br>(0.9)      |
| Total lipid (mg/100ml)  | 35~41<br>(38.0)     | 123~352<br>(225.7)    |
| Glucose (mg/100ml)      | 1<br>(1.0)          | 0~5<br>(2)            |
| Na (mEq/ l)             | 71.4~90.4<br>(82.8) | 93.5~114.6<br>(103.3) |
| K (mEq/ l)              | -                   | 38.5~76.7<br>(58.3)   |
| Ca (mEq/ l)             | 4.1<br>(4.1)        | 2.2~3.1<br>(2.7)      |
| Mg (mEq/ l)             | 12.4~22.0<br>(17.2) | 8.5~16.5<br>(13.5)    |

( ) : average, ND : not detectable.

#### 라. 감성돔

사육한 감성돔의 채정 가능한 기간은 7주간이었다. 채정기간 동안 어체중 100g당 평균 채정량은  $0.70 \pm 0.33$  ml였으며, 채정기의 중반인 5월 2일부터 6월 4일까지는 비교적 많은 양의 정액이 채취되었다. 채정기간 동안 날짜별 채취 정자의 총 수는 채정기의 초기인 4월 11일에  $15.14 \times 10^{10}$  마리였으나, 중반으로 갈수록 증가하여 5월 9일에  $97.25 \times 10^{10}$  마리로 가장 많았다가 채정 말기인 6월 4일에  $27.18 \times 10^{10}$  마리로 급격히 감소하였다(Fig. 5).

채정기간 동안 정액을 원심분리하여 얻은 감성돔 정장과 혈장의 물리적 특성은 Table 10과 같다. 정액과 혈장의 pH는 각각  $8.3 \pm 0.1$ 과  $7.3 \pm 0.1$ 이었고, 정장과

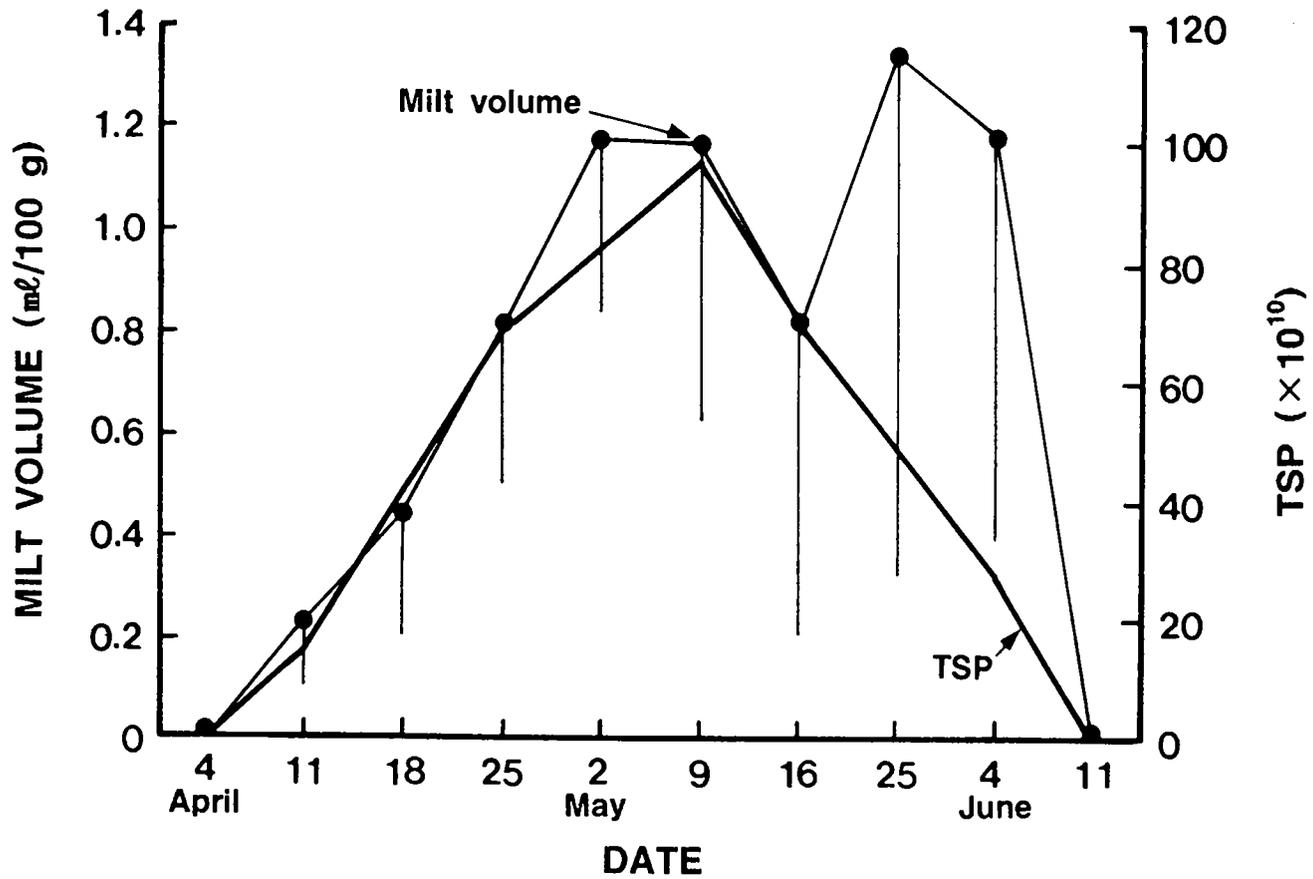


Fig. 5. Variations of milt volume per 100 g body weight and total spermatozoa production (TSP) of black seabream during milt stripping period. Vertical bars indicate standard deviations.

혈장의 삼투질농도는  $382 \pm 70$  mOsm/kg과  $342 \pm 77$  mOsm/kg으로 정장이 혈장에 비해 pH와 삼투질농도 모두 다소 높은 값을 보였다.

채정기간 동안의 감성돔 정액 1 ml당 정자농도는 평균  $2.866 \pm 0.918 \times 10^{10}$ 마리였다(Table 10). 채정기 초반인 4월 18일에  $3.060 \pm 1.104 \times 10^{10}$  마리로 가장 많았다가 급격히 감소하여 5월 2일에  $2.426 \pm 0.243 \times 10^{10}$  마리로 줄어든 후 다시 증가하였다. 그러나 spermatocrit는 채정기간 동안 94.8~98.2로 큰 변화가 없었으며(Fig. 6), 평균  $97.4 \pm 2.1$ 이었다(Table 10).

Table 10. Physical properties of milt, seminal fluid and plasma of the black seabream

| Properties   | Milt            | Plasma        |
|--|-----------------|---------------|
| Spermatozoa concentration ( $\times 10^{10}/\text{ml}$ ) | $2.87 \pm 0.92$ | —             |
| Spermatocrit   | $97.4 \pm 2.1$  | —             |
| pH   | $8.3 \pm 0.1$   | $7.3 \pm 0.1$ |
| Osmolality (mOsm/kg)                                     | $382 \pm 70$    | $342 \pm 77$  |

seminal fluid

감성돔 정액을 원심분리하여 얻은 정자 및 정장과 혈장의 화학적 특성은 Table 11과 같다. 총 단백질, 총 지질, glucose 및 Na 함량은 정자나 정장에 비해 혈장에서 모두 높은 값을 보였으나, K 함량은 혈장에 비해 정자나 정장에서 높은 값을 보였다. 정자와 정장에서의 총 단백질, 총 지질 및 K 함량은 정장에 비해 정자에서 높았으나, glucose 및 Na 함량은 반대로 정장에서 더 많았다.

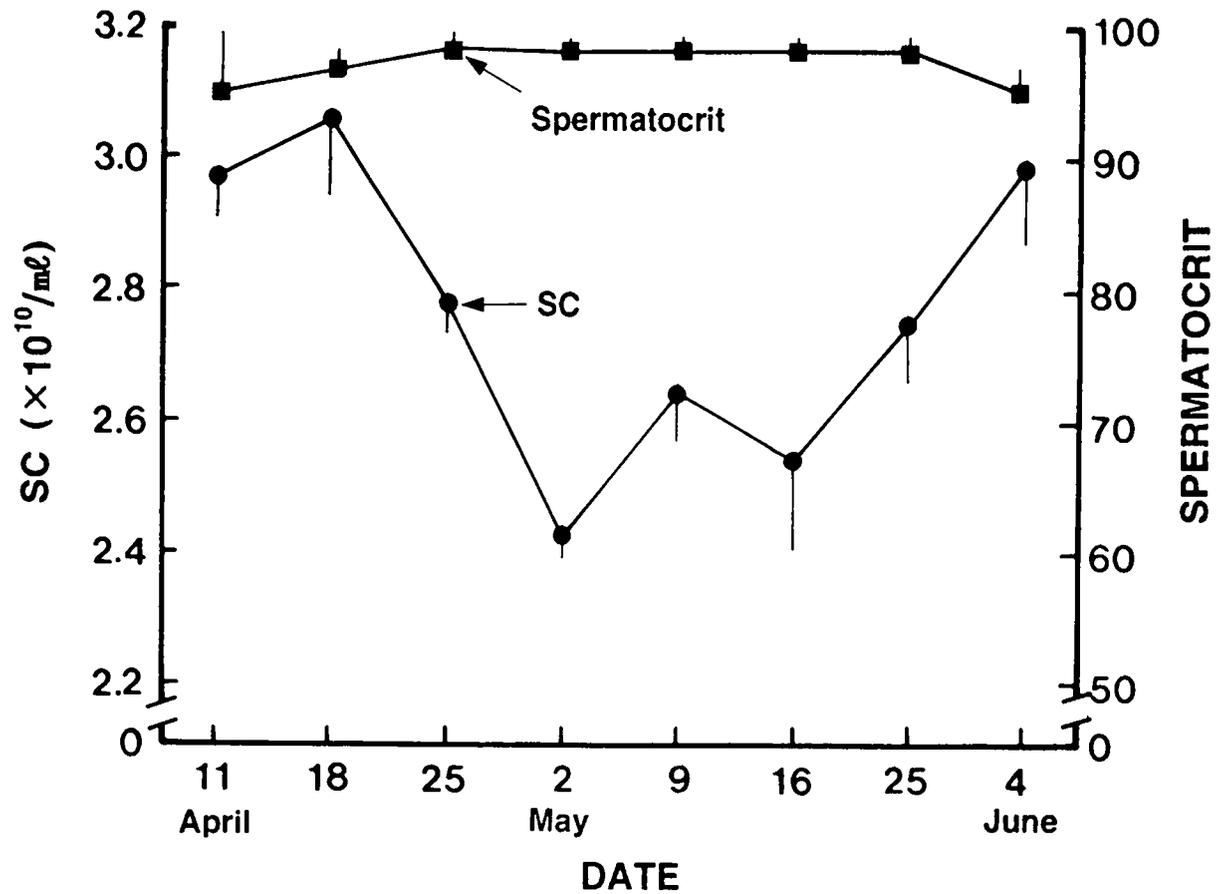


Fig. 6. Variations of spermatozoa concentration (SC) and spermatocrit of black seabream during milt stripping period. Vertical bars indicate standard deviations.

Table 11. Chemical properties of spermatozoa, seminal fluid and plasma of the black seabream

| Properties              | Spermatozoa         | Seminal fluid       | Plasma             |
|-------------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| Total protein (g/100ml) | 0.6~1.2<br>(1.24)   | 0.3~1.2<br>(0.89)   | 3.4~3.8<br>(3.67)  |
| Total lipid (mg/100ml)  | 110~214<br>(161.9)  | 37~67<br>(53.9)     | 489~493<br>(491.0) |
| Glucose (mg/100ml)      | 1~10<br>(4.2)       | 1~30<br>(13.7)      | 99~102<br>(101.0)  |
| Na (mEq/ ℓ)             | 33~42<br>(37.6)     | 43~73<br>(56.9)     | 219~221<br>(219.7) |
| K (mEq/ ℓ)              | 48.1~53.1<br>(49.6) | 33.7~49.8<br>(45.3) | 4.9~5.1<br>(5.0)   |

\* average values in parentheses

채정기간인 4월부터 6월까지 정자 100 g과 정장 100 ml당 총 단백질, 총 지질 및 glucose 함량의 월별 변화는 Fig. 7과 같다. 정자의 단백질 함량은 4월(1.1±0.4 g)에 비해 5월(1.3±0.2 g)과 6월(1.3±0.2 g)에 다소 높은 값을 보였으나 변화의 폭이 크지 않았고, 정장에서는 채정 말기로 갈수록 점차 증가하는 경향을 보였다. 정자와 정장의 총 지질함량은 월별 변화를 보이지 않았으나, 정장에 비해 정자에서 월등히 많았다. 그러나 정자와 정장의 glucose 함량은 채취 정자의 총 수가 가장 많았던 5월에 각각 4.2±2.7 mg와 13.7±8.5 mg으로 가장 많이 나타났다.

정자와 정장의 Na 및 K 함량은 Fig. 8과 같다. 정자에서의 Na와 K 함량은 각각 33.0~39.8 mEq/ ℓ 와 48.3~51.7 mEq/ ℓ 범위로 채정기간 동안 큰 변화가 없었다. 정장에서도 Na가 55.8~58.0 mEq/ ℓ 였고, K는 42.8~49.0 mEq/ ℓ 범위로 유의한 차이를 보이지 않았다. 6월에 정장의 Na 및 K 함량은 채정량이 적어 측정할 수 없었다.

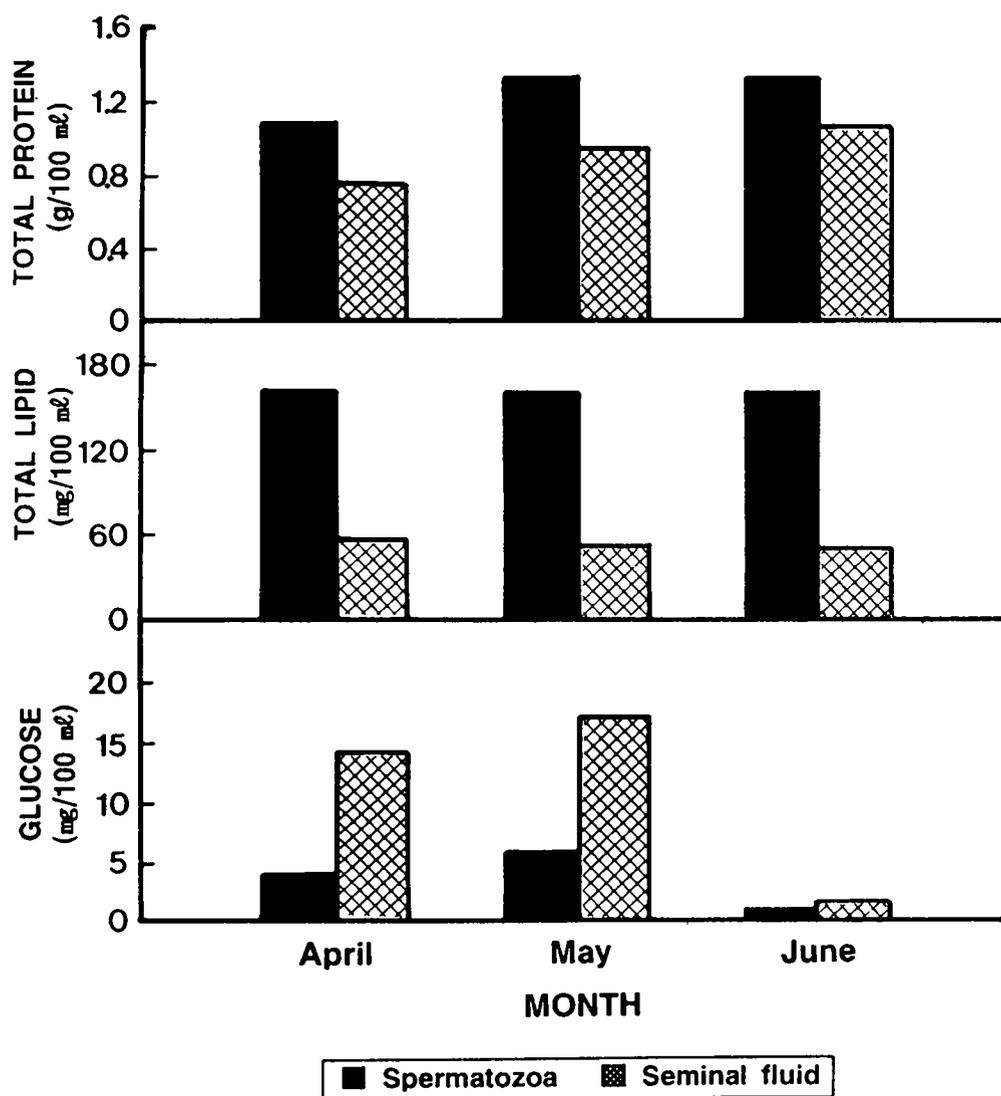


Fig. 7. Variations of total protein, total lipid and glucose concentration of spermatozoa and seminal fluid in black seabream during milt stripping period.

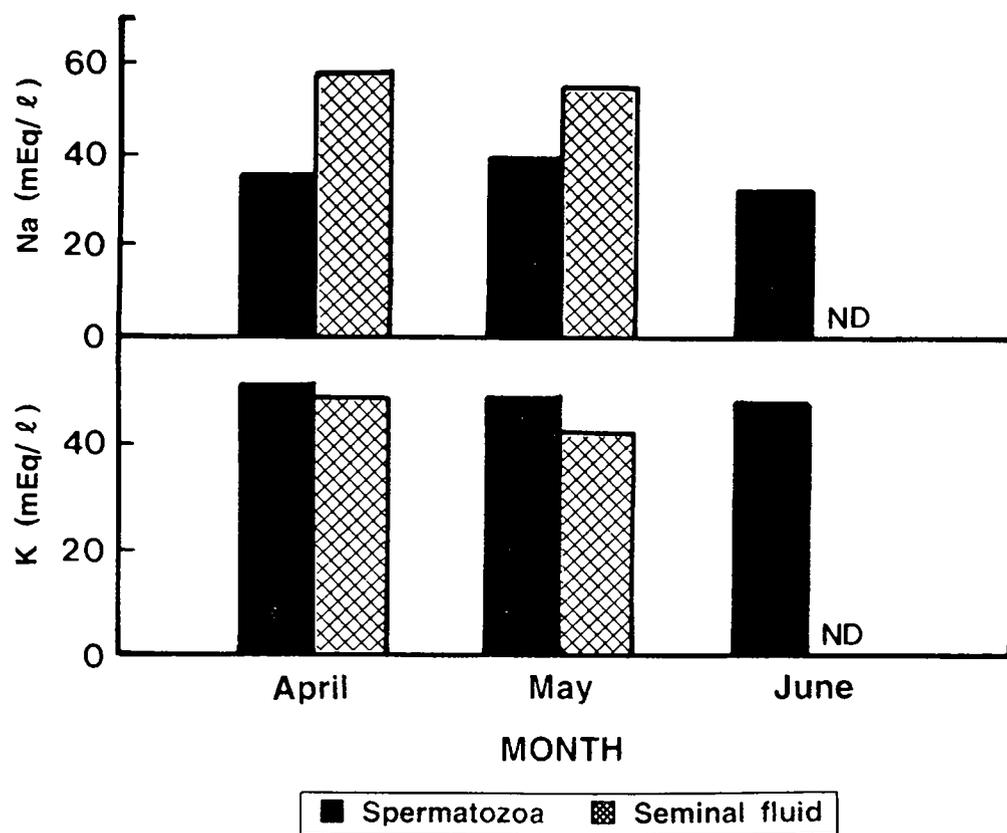


Fig. 8. Variations of Na and K concentration of spermatozoa and seminal fluid in black seabream during milt stripping period. ND: not detectable.

배정기간 동안 정액의 채취간격을 7일, 14일, 21일로 각기 달리하여 총 정액 생산량과 spermatocrit 및 정장의 조성을 조사한 결과, 배정기의 말기를 제외하고는 마리당 정액 채취량에는 큰 차이가 없었다. 배정기의 말인 5월말과 6월초 사이에 7일 간격으로 정액을 채취한 실험구들에서는 정액 채취량이 감소하였으나, 14일과 21일 간격으로 정액을 채취한 실험구에서는 배정기의 중반과 같은 많은 양의 정액을 채취할 수 있었다(Fig. 9).

배정기간동안 총 정액 채취량은 7일, 14일 및 21일 간격으로 채취한 실험구에서 각각 301.3 ml, 183.5 ml, 134.9 ml로 채취 간격이 좁을수록 정액 채취량이 많았다(Fig. 10).

배정기간동안 정액 채취간격에 따른 spermatocrit의 변화는 정액 채취빈도에 따라서는 서로 차이가 없었으며, 실험구 모두에서 정액 채취량이 많아지는 배정기의 중반에 다소 감소하는 경향을 보였다(Fig. 11). 채취간격에 따른 정장의 Na, K, Cl 및 총단백질 함량은 Fig. 12~15에 나타냈다. Na와 Cl 함량은 서로 같은 경향으로 채취간격에 따라서 거의 변화가 없었으며, 전체 배정기간동안도 거의 일정한 수준을 유지하였다(Figs. 12, 14). 그러나 K 함량은 정액 채취량이 가장 많았던 배정기의 중반에 감소하였다가, 정액 채취량이 점차 감소하는 배정기의 말에 다시 상승하였다(Fig. 13). 정장의 총 단백질 함량은 채취간격에 따라서는 차이가 없었지만 배정말기로 갈수록 점차 감소하는 경향을 보였다(Fig. 15).

### 3. 환경조건에 따른 정자의 생리활성

승어 정자와 인공해수의 희석비율에 따른 정자의 활성은 희석비율이 낮을수록 정자의 운동성이 높았으며, 희석후 정자의 운동 지속시간도 희석비율이 낮을수록

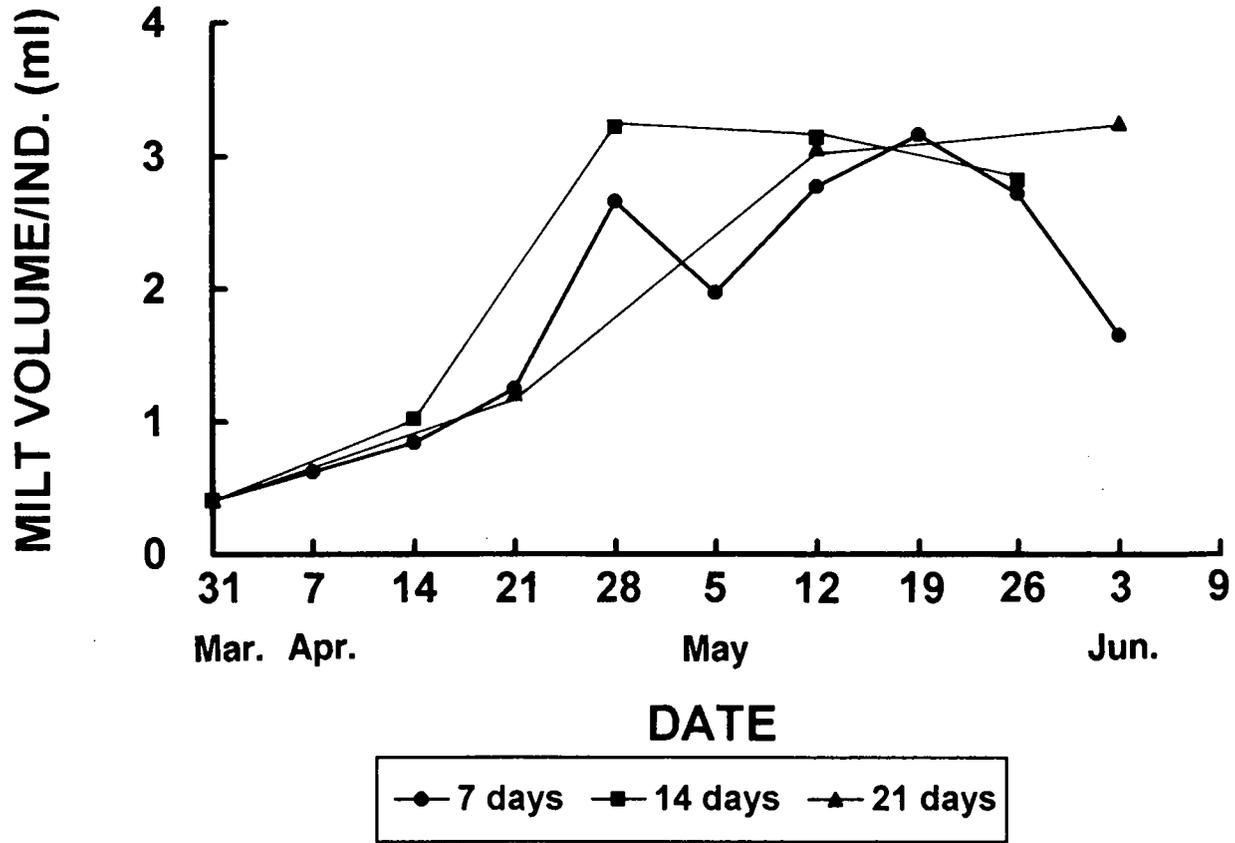


Fig. 9. Variations of milt product by stripping interval during spermiation period.

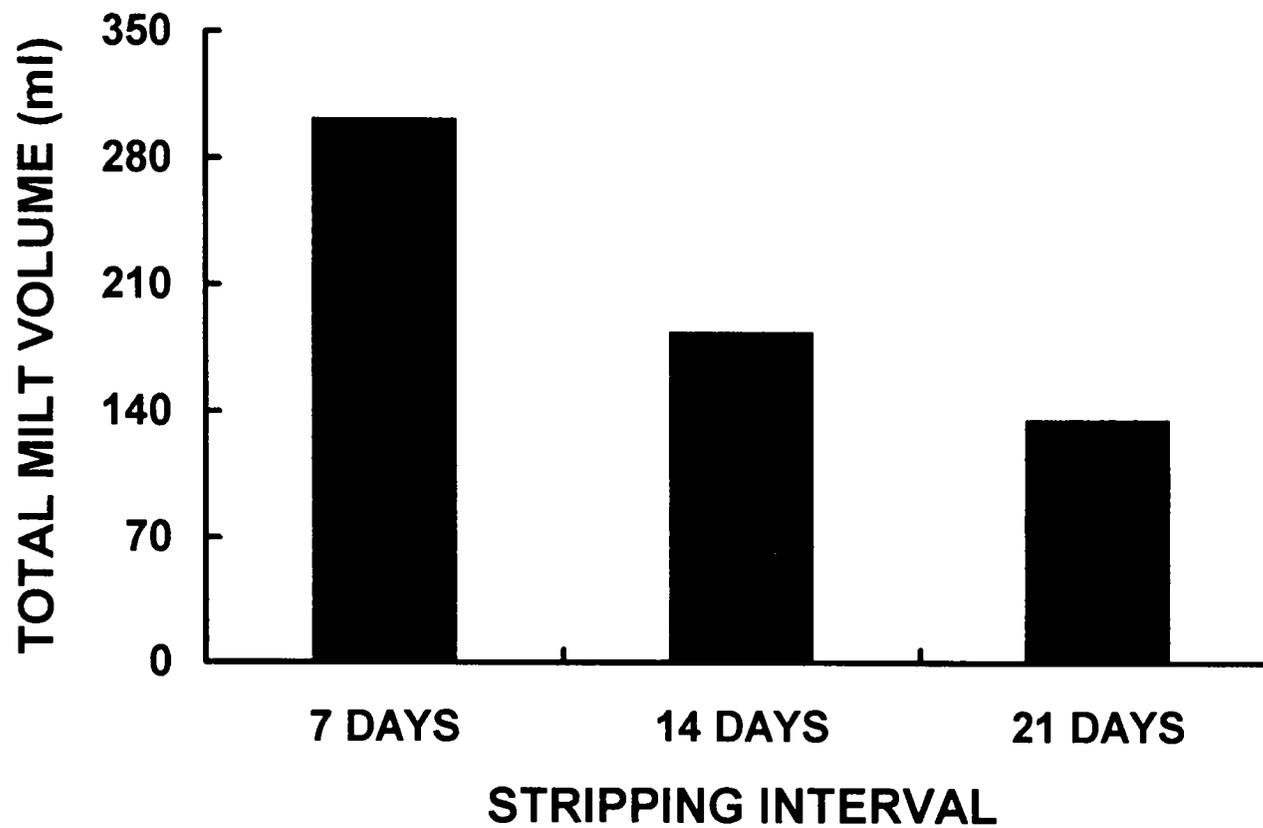


Fig. 10. Total milt product by stripping interval during spermiation period.

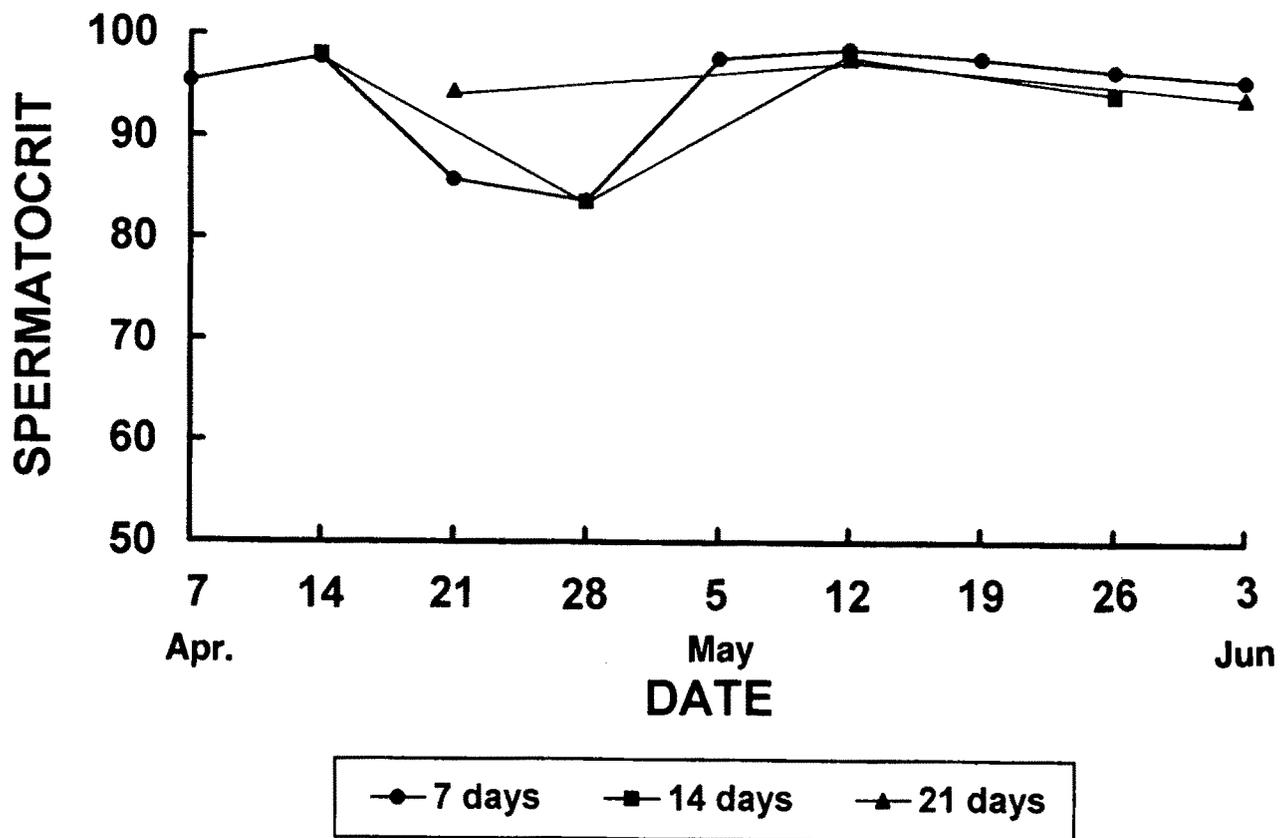


Fig. 11. Variations of spermatocrit by stripping interval during spermiation period.

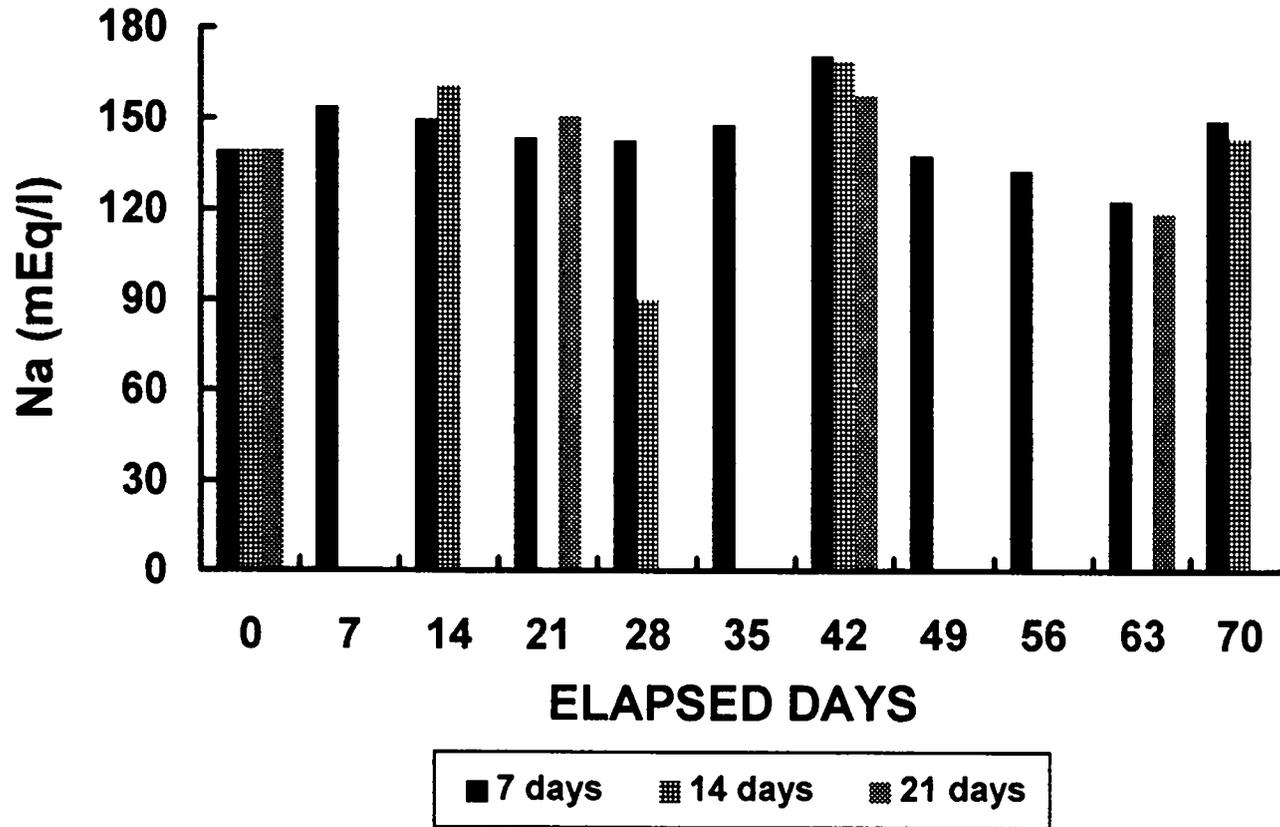


Fig. 12. Variations of Na concentration in seminal fluid by stripping interval during spermiation period.

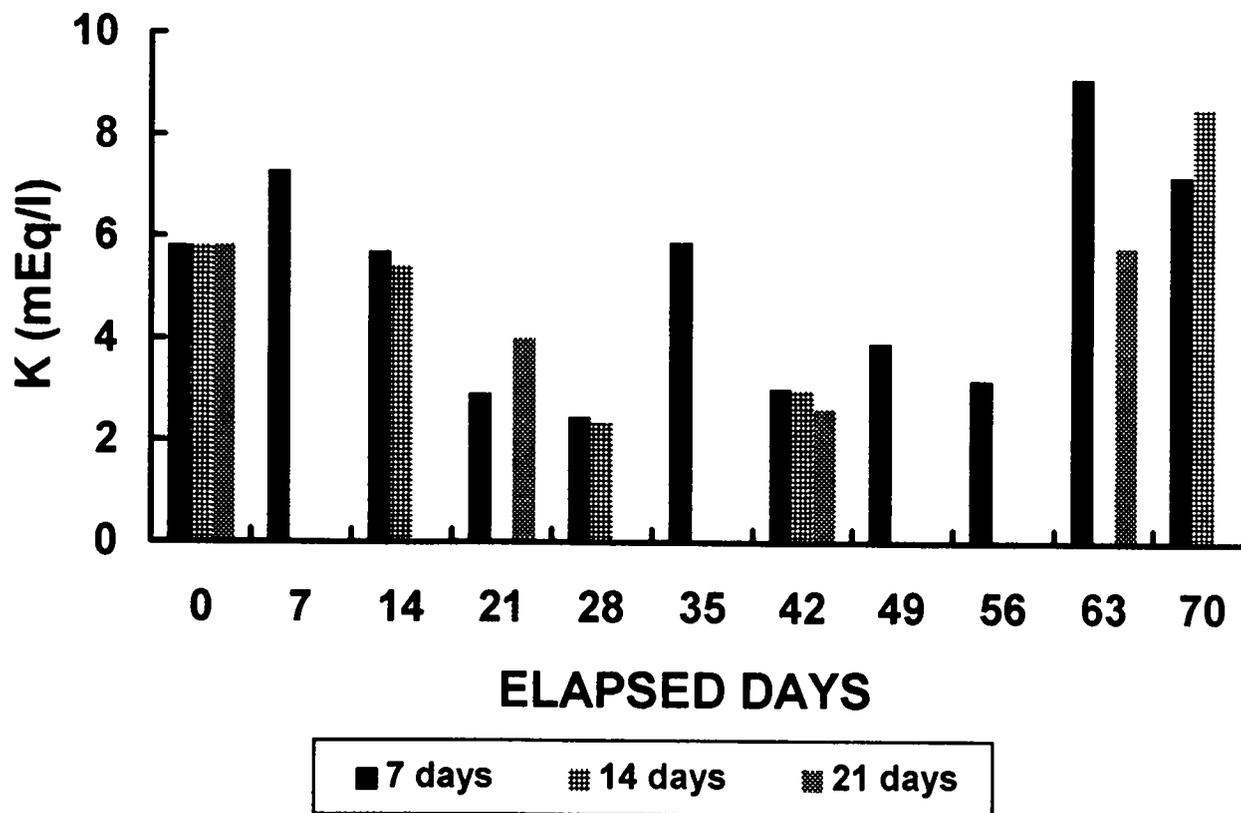


Fig. 13. Variations of K concentration in seminal fluid by stripping interval during spermiation period.

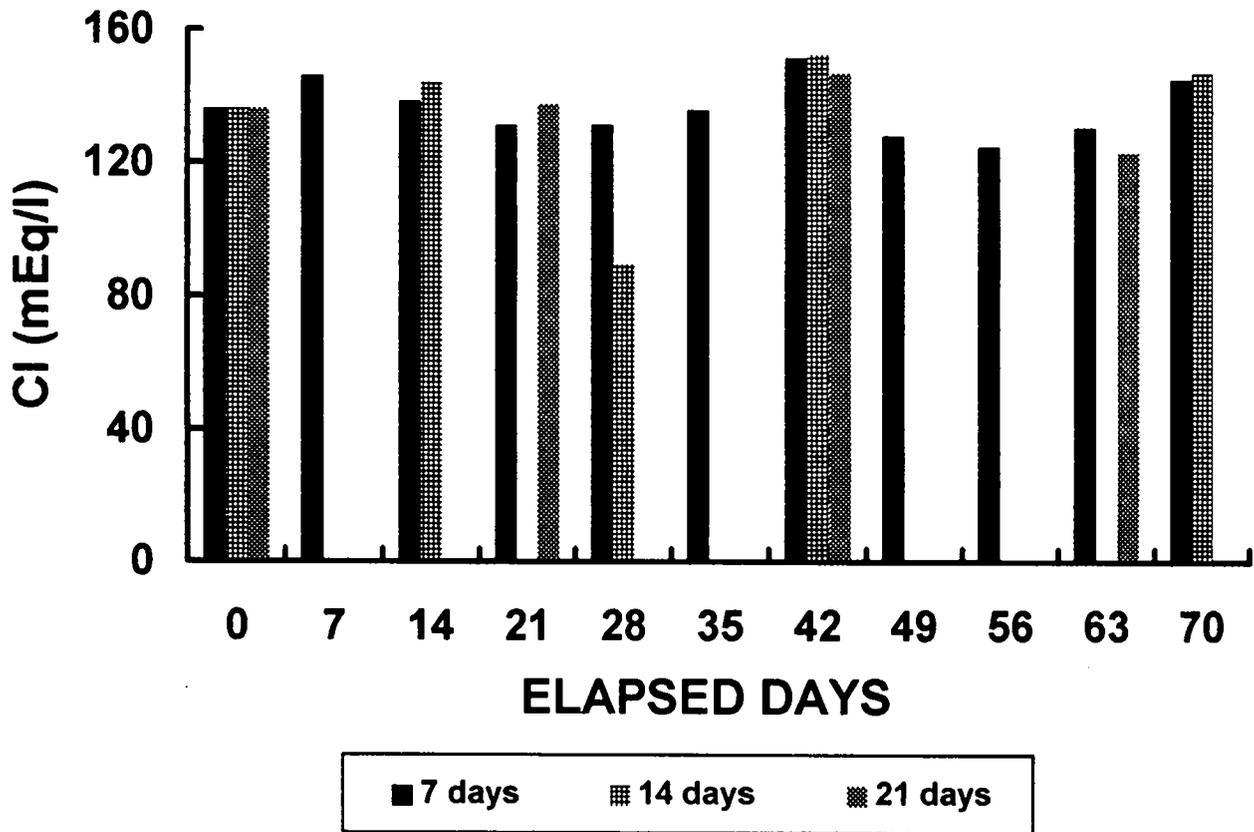


Fig. 14. Variations of Cl concentration in seminal fluid by stripping interval during spermiation period.

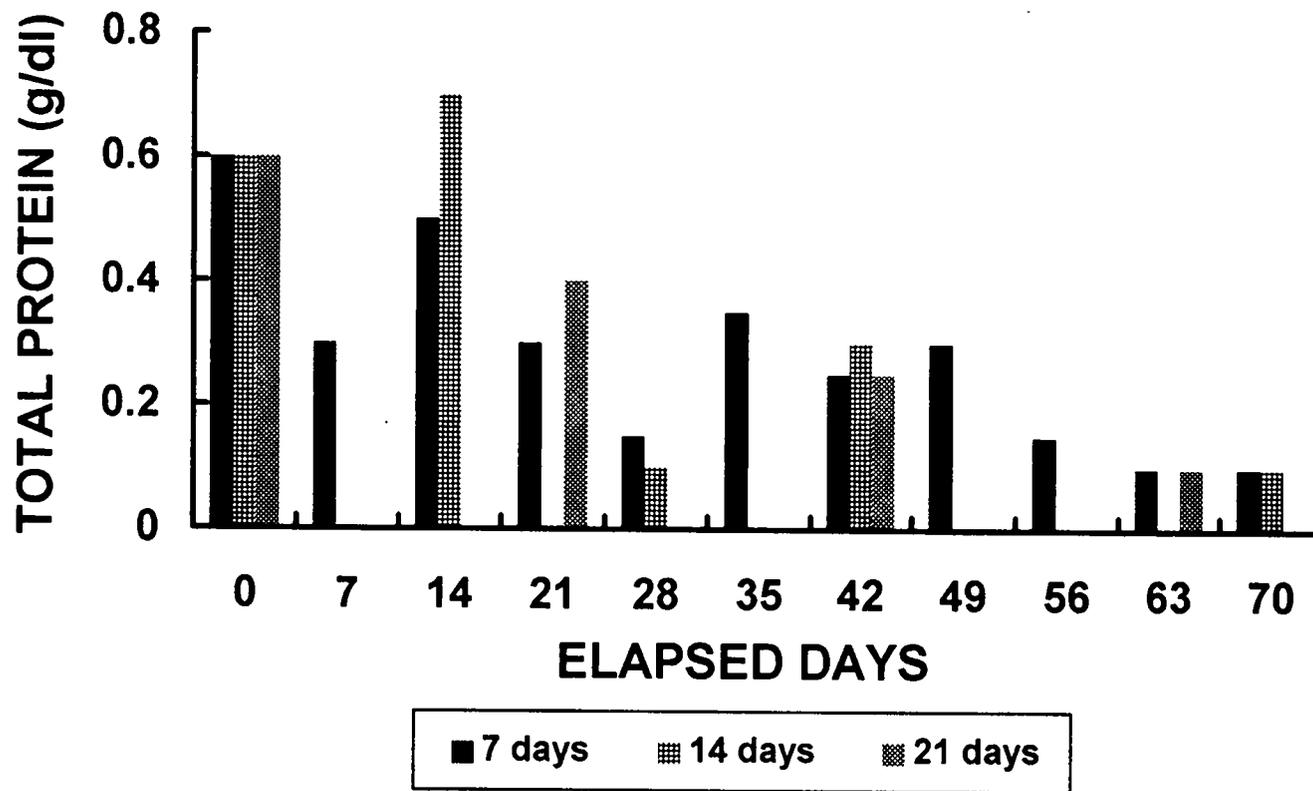


Fig. 15. Variations of total protein concentration in seminal fluid by stripping interval during spermiation period.

길었다(Fig. 16). 인공해수에 증류수를 첨가하여 삼투질농도를 달리하였을 때, 정자의 운동성은 인공해수 보다 삼투질농도가 약간 낮은 882 mOsm/kg에서부터 482 mOsm/kg까지 높게 지속되었다. 삼투질농도가 높은 희석액에서는 초기에 정자활성이 높은 반면 운동지속 시간이 짧았고, 반면에 삼투질농도가 낮은 희석액에서는 초기에 정자활성이 낮은 반면 운동지속 시간이 길었다(Fig. 17).

인공해수의 pH를 각기 달리하여 정자의 운동성과 운동 지속시간을 조사한 결과, pH 6과 9에서는 정자의 초기 운동성이 매우 높았으나, 운동 지속시간은 짧았다. 그러나 초기 운동성이 낮았던 pH 7과 8에서는 정자의 운동 지속시간이 다른 실험구에 비해 다소 길었다(Fig. 18)

감성돔 정자를 인공해수와  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , 및  $\text{Mg}^{2+}$ 가 결여된 인공해수에 희석하였을 때의 운동성은 Fig. 19와 같이 각 이온의 농도에 따른 삼투질농도에 따라 좌우되었다.  $\text{Na}^+$  결여 인공해수(158 mOsm/kg)에 정액을 희석한 직후 정자의 운동성은 전혀 관찰되지 않았다. 한편 그외의 이온결여 인공해수에서는 운동성이 인정되었으며  $\text{K}^+$  결여 인공해수(904 mOsm/kg)에서 SAI는 1.19,  $\text{Mg}^{2+}$  결여 인공해수(818 mOsm/kg)에서 1.08,  $\text{Ca}^{2+}$  결여인공해수(956 mOsm/kg)에서 1.03의 순으로 활발한 운동이 관찰되었다. 그러나 모든 이온의 조성이 완전한 인공해수(1055 mOsm/kg)에서 희석 직후의 SAI는 0.74로 낮았다.

한편,  $\text{Na}^+$  결여 인공해수에 1 M NaCl을 첨가하여 삼투질농도를 증가시켰을 때의 SAI는 Fig. 20A와 같이 삼투질농도 457~1128 mOsm/kg 범위에서는 1.13~1.25로 정자의 운동성이 높았으나, 삼투질농도가 1398 mOsm/kg로 높아졌을 때 운동성이 급격하게 떨어졌으며, 삼투질농도 1736 mOsm/kg에서는 0.12로 매우 낮아졌다. 운동지속 시간도 SAI가 급격히 감소한 삼투질농도 1398 mOsm/kg 이상에서는 50분 이하로 짧았으나,  $\text{Na}^+$  결여 인공해수(158 mOsm/kg)를 제외한 삼투질농도 1128 mOsm/kg 이하에서는 80~140분으로 길었다.

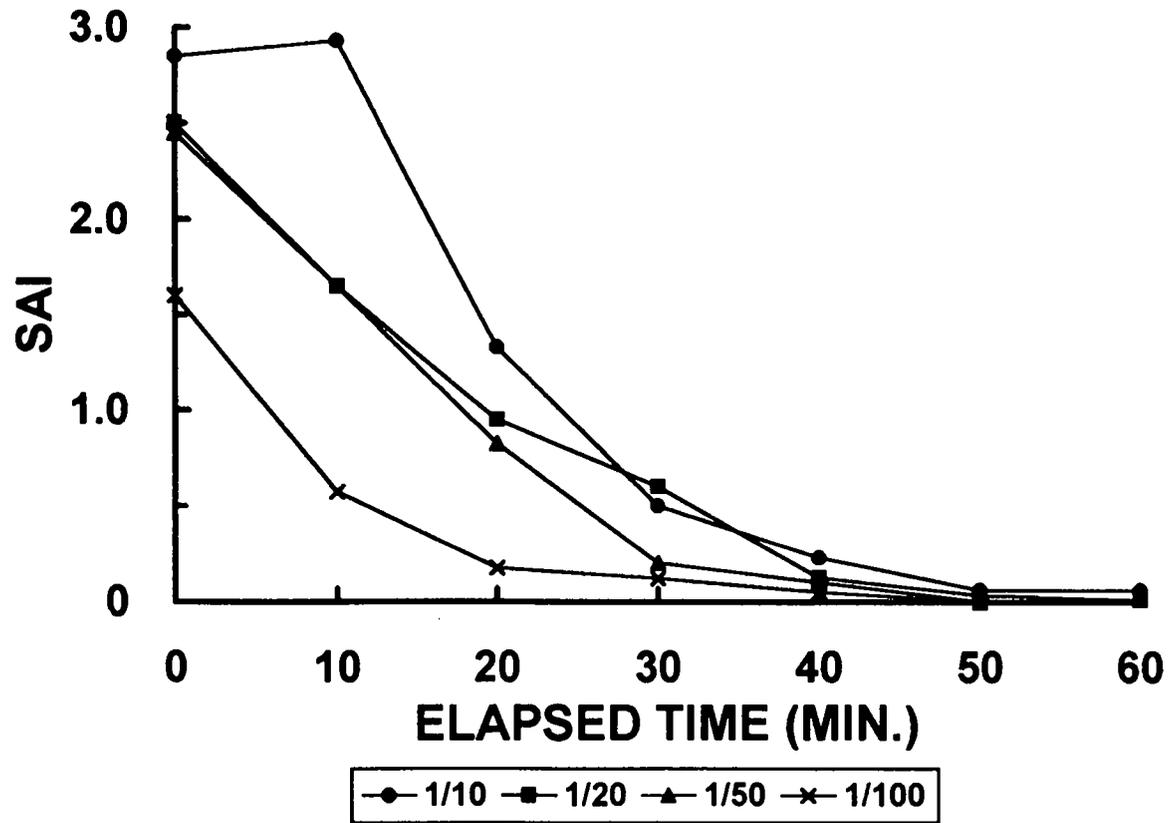


Fig. 16. Variations of sperm activity index (SAI) in artificial seawater by different dilution rates.

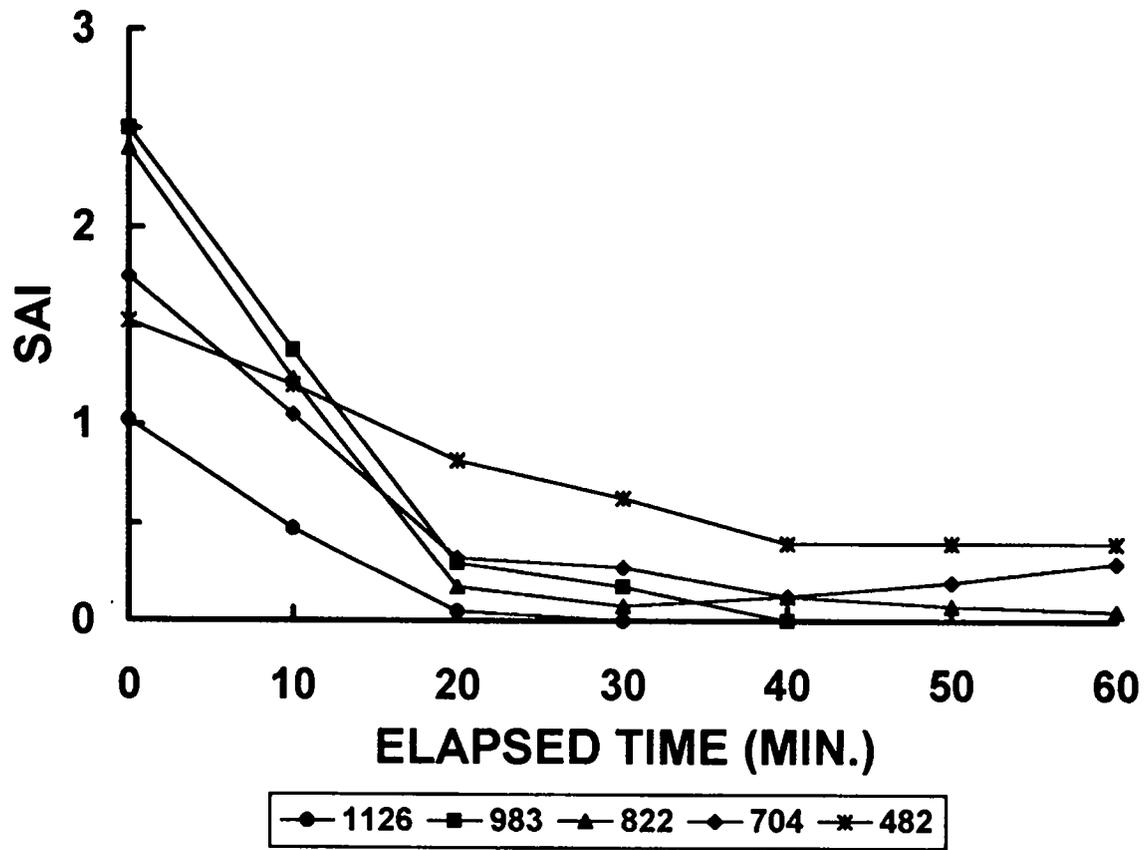


Fig. 17. Variations of sperm activity index (SAI) in artificial seawater by different osmolalities.

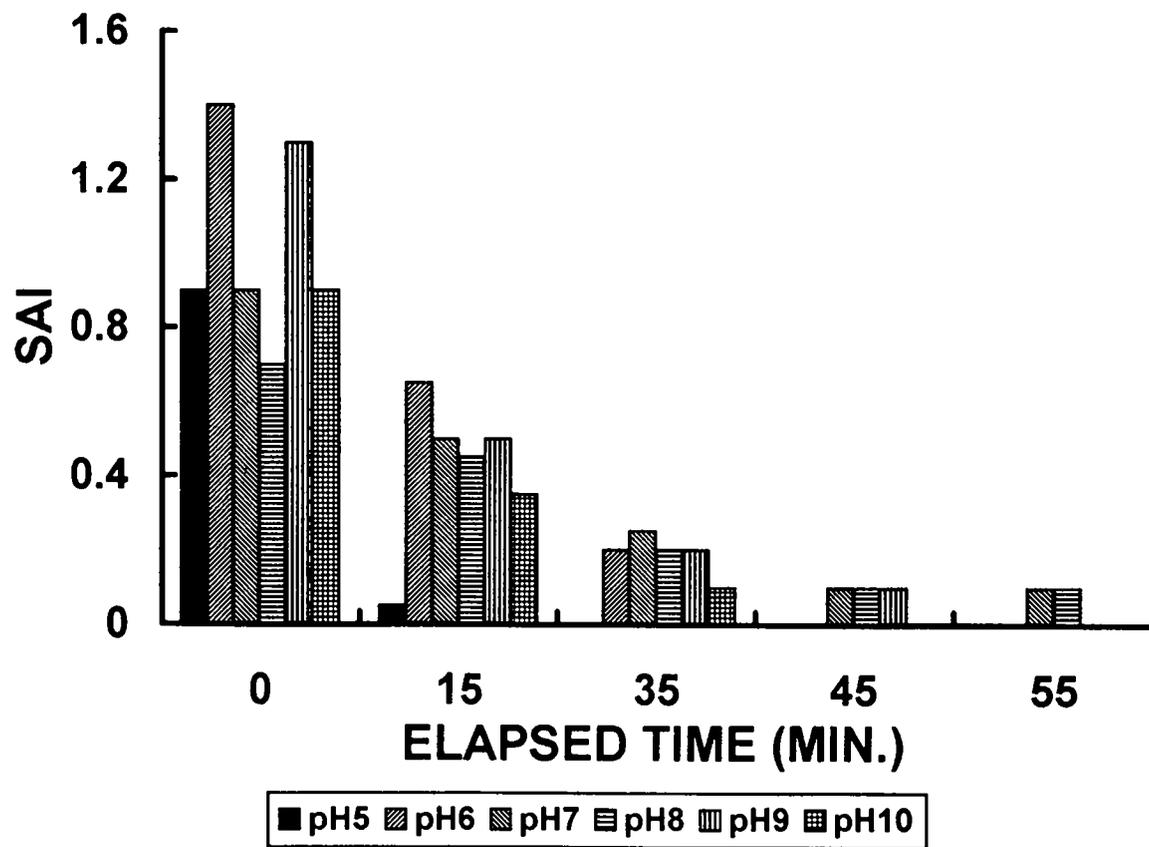


Fig. 18. Variations of sperm activity index (SAI) in artificial seawater by different pHs.

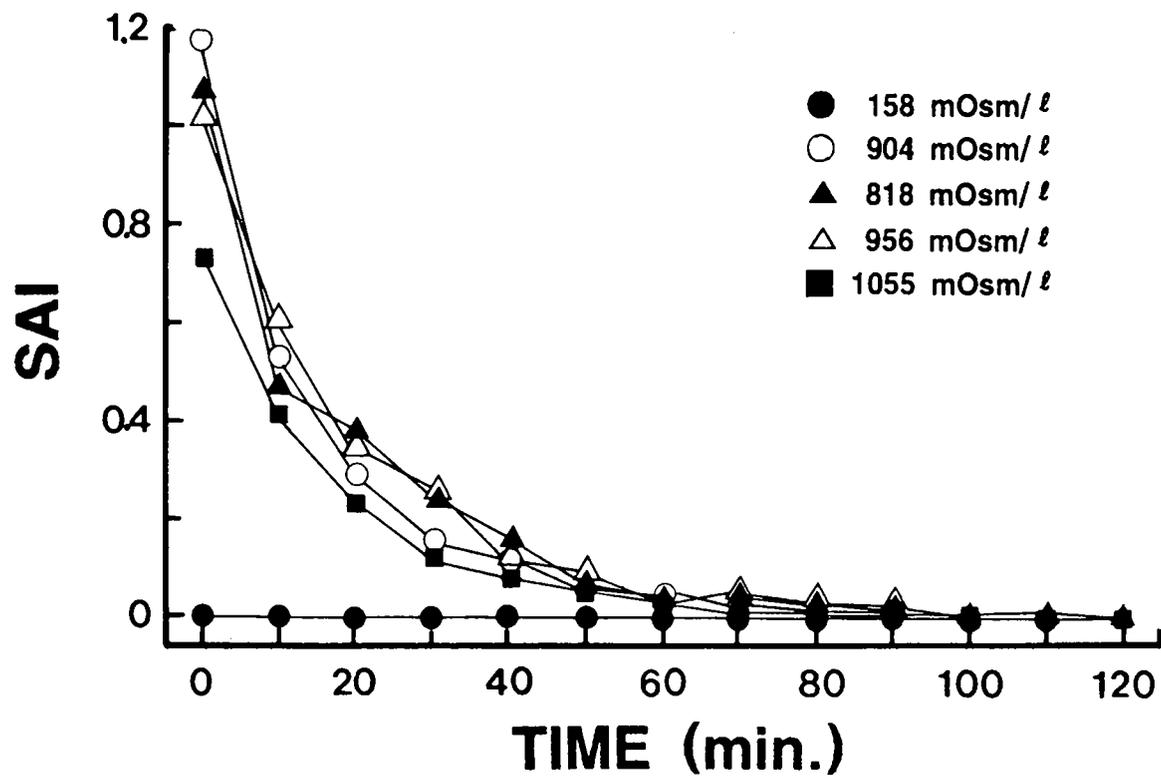


Fig. 19. Time courses of sperm activity index (SAI) of the black seabream at several osmolalities by artificial seawater (ASW, ■), NaCl free ASW (●), KCl free ASW (○), MgCl<sub>2</sub> free ASW (▲) and CaCl<sub>2</sub> free ASW (△).

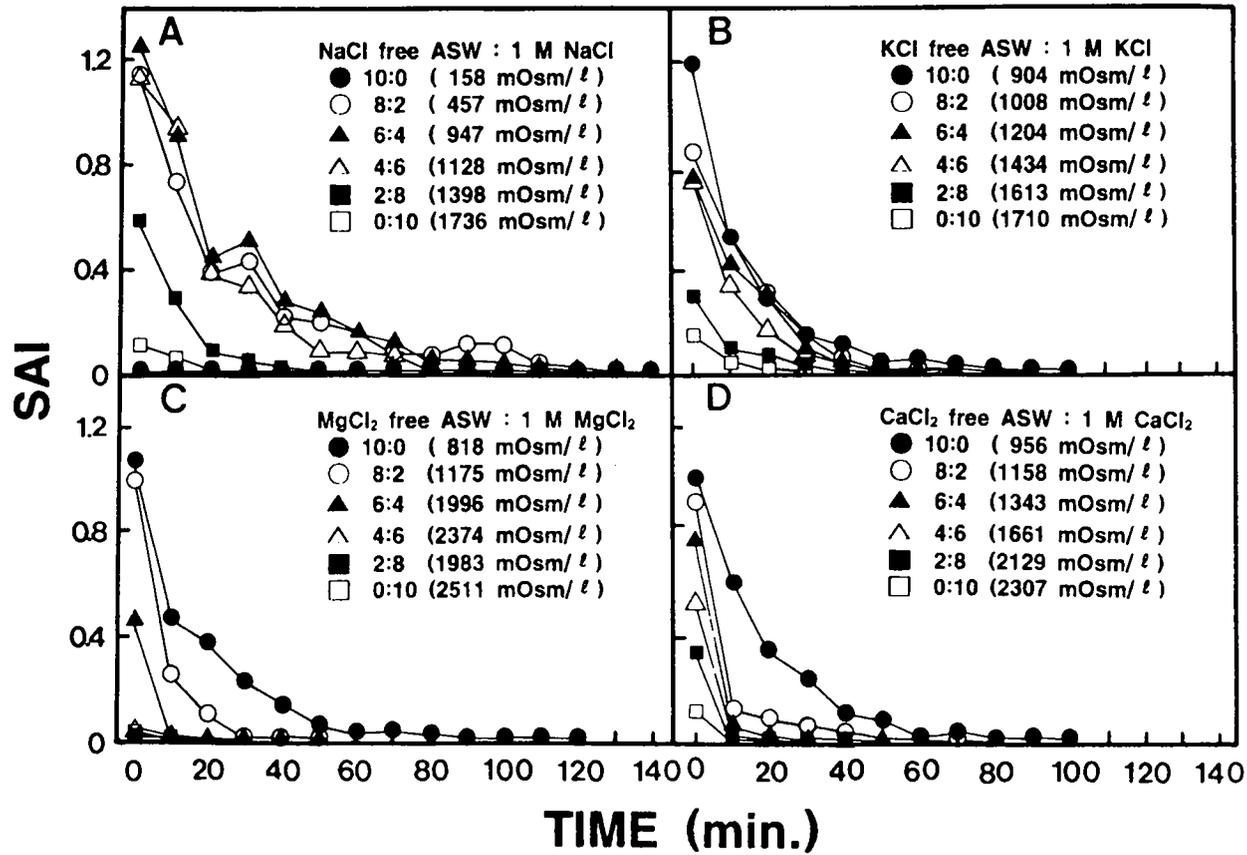


Fig. 20. Time courses of sperm activity index (SAI) of the black seabream at several osmolalities by addition of Na<sup>+</sup> (A), K<sup>+</sup>, (B), Mg<sup>++</sup> (C) and Ca<sup>++</sup> (D) in each ion free artificial seawater (ASW).

$K^+$  결여 인공해수에 1M KCl을 일정비율로 첨가하여 삼투질농도를 상승시켰을 때의 SAI는 Fig. 20B와 같이 삼투질농도 904~1434 mOsm/kg 범위에서는 0.73~1.19로 정자의 운동성이 비교적 높게 나타났다. 그러나 삼투질농도 1613 mOsm/kg 이상에서는 0.30 이하로 낮아지고, 운동지속시간도 50분 이하로 나타나, 삼투질농도 904 mOsm/kg에서의 100분에 비하여 1/2수준의 짧은 운동지속시간을 보였다.

$Mg^{2+}$  및  $Ca^{2+}$ 가 결여된 인공해에 1 M  $MgCl_2$  와 1M  $CaCl_2$ 를 일정 비율로 첨가하여 삼투질농도를 상승시켰을 때,  $Mg^{2+}$ 의 경우 818, 1175 mOsm/kg에서 SAI는 각각 1.08, 1.00으로 나타났으나, 그 이상의 삼투질농도에서는 급격하게 낮아졌다. 반면  $Ca^{2+}$  농도가 다른 인공해수에서는 삼투질농도가 956 mOsm/kg에서 2307 mOsm/kg까지 증가함에 따라 SAI는 1.03에서 0.13으로 변화하였다. 정자의 운동지속 시간은  $Mg^{2+}$  농도가 다른 인공해수의 경우, 삼투질농도 818 mOsm/kg에서 120분이었으나, 그 이상의 삼투질농도에서는 60분 이하로 짧아졌다.  $Ca^{2+}$  결여 인공해수에서도 삼투질농도 956 mOsm/kg와 1158 mOsm/kg에서 운동지속시간은 90분 이상이었으나, 1343 mOsm/kg 이상의 삼투질농도에서는 50분 이하로 짧아졌다(Fig. 20C, D).

## 제4절 고찰

어류 정자의 물리적, 화학적 성상을 파악하는 것은 정자의 생리학적 연구의 측면 뿐만 아니라, 정자의 보존에 있어서 적절한 희석액의 기본조성을 결정하는 데도 기초자료로 이용할 수 있다. 어류 정자의 농도를 파악하는 방법으로는 일반적

으로 정액 1 ml당 정자의 수를 계수하는 방법과 spermatocrit를 측정하는 두가지 방법이 사용되고 있으며(Aas et al. 1991), 최근에는 분광광도계를 이용하는 방법도 시도되고 있다(Cierieszko and Dabrowski 1993). 이 연구에서 혈구계산판을 이용하여 계수한 자주복과 황복, 송어 및 감성돔 정액 1 ml당 정자수는 각각  $9.81 \pm 0.34 \times 10^{10}$ ,  $1.13 \pm 0.27 \times 10^{10}$ ,  $1.10 \pm 0.36 \times 10^{10}$  및  $2.87 \pm 0.92 \times 10^{10}$ 로, 자주복이 다른 세 어종에 비해 매우 높게 나타났다. 이러한 농도는 bluefin tuna, *Thunnus thynnus*의  $5.94 \pm 0.72 \times 10^{10}$ (Doi et al. 1982), turbot, *Scophthalmus maximus*의  $3.83 \pm 0.59 \times 10^{10}$ (Suquet et al. 1993), 대서양연어, *Salmo salar*의  $9.5 \pm 3.2 \times 10^{10}$ (Aas et al. 1991)에 비해서도 월등히 높은 농도였다. 이 연구에서 자주복, 송어 및 감성돔의 spermatocrit는 모두 90 이상으로  $64.8 \pm 1.3$ 이었던 황복에 비하여 높았다. 이처럼 황복의 spermatocrit가 낮은 것은 산란시기가 되면 바다에서 하천으로 올라와 담수에 산란하는 습성 때문에 환경수의 삼투질농도에 영향을 받았을 것으로 생각된다. 실제로 담수어종들인 whitefish, *Coregonus clupeaformis*와 yellow perch, *Perca flavescens*, 무지개송어, *Onchohynchus mykiss*(Cierieszko and Dabrowski 1993) 및 muskellunge, *Esox masquinongy*(Lin et al 1996)의 spermatocrit가 각각 26.6, 64.7, 25.8 및 35.7로 낮게 나타났다. 그러나 어류에 있어서 정자농도와 spermatocrit는 어종간 뿐만 아니라 동종 내에서도 어체의 연령, 성숙도, 크기 및 사육환경 등에 따라 차이를 나타내므로 각 연구자들의 특정시기에 한정된 연구결과만으로 서로 비교하기는 어렵다. 이 연구에서 자주복과 송어 및 감성돔 정장의 pH는 각각  $8.2 \pm 0.2$ ,  $7.8 \pm 0.1$ ,  $8.3 \pm 0.1$ 로, turbot 7.3 (Suquet et al. 1993)과 송어, *Mugil cephalus* 7.4(Chao et al. 1975) 보다 높았고, 대서양연어 8.3(Hwang and Idler 1969), 기수성 어류인 pejerrey, *Odontesthes borarrensis*의 8.3(Strussmann et al. 1994) 및 잉어과 어류의 8.1~8.5(Lahnsteiner et al. 1994)와 비슷한 수준으로

약 알칼리성을 나타냈다. 그러나 Chao et al.(1987)은 틸라피아 *Oreochromis aureus*, *O. mossambicus*, *O. niloticus* 및 *Tilapia zilli*의 pH가 6.2~8.2로 어종에 따라 다양한 값을 가진다고 하였다. 이처럼 정액이나 정장의 pH는 어종에 따라 다양하며, 심지어 같은 어종일지라도 연구자에 따라 차이가 있음이 보고되고 있다. 해산어류의 정장 삼투질농도는 일반적으로 담수어류 보다 높다. 무지개송어의 정장 삼투질농도는 297 mOsm/kg이고, 금붕어 *Carassius auratus*와 잉어 *Cyprinus carpio*는 각각 317, 302 mOsm/kg이었다(Morisawa 1985). 그러나 해산어류인 복섬, *Fugu niphobles*과 감성돔, *Acanthopagrus schlegeli*에서는 각각 342, 359 mOsm/kg으로 담수어류에 비해 40 mOsm/kg 정도 높다(Morisawa 1985). 이 연구에서 자주복과 송어 및 감성돔 정장의 삼투질농도는  $383 \pm 2$ ,  $370 \pm 2$  및  $382 \pm 70$  mOsm/kg으로 Morisawa(1985)의 연구결과와 비슷한 수준을 보였다. 그러나 담수에서 산란하는 황복의 경우  $266 \pm 2$  mOsm/kg으로 담수어류 처럼 낮았다.

어류 정액에서 정자의 보호역할(Cruea 1969)을 하는 것으로 추정되는 총 단백질 함량은 자주복에서 정자 1.4 g/100ml, 정장 0.13 g/100ml로서 turbot 정장의 0.88 g/100ml(Suquet et al. 1993)와 비슷하였으나, Kruger et al.(1984)이 보고한 잉어의 0.13 mg/100ml 보다 매우 높았다. 황복, 송어 및 감성돔의 정자와 정장의 총 단백질 농도도 자주복과 비슷한 수준이었다. 정자와 정장의 생화학 조성중 자주복과 황복에서는 glucose가 거의 검출되지 않았기 때문에 앞으로 정자와 정장에서 유기물 대사에 관한 자세한 연구가 요구된다.

이 연구에서 신선한 자주복 정자의 머리 장경은  $1.35 \pm 0.30$   $\mu\text{m}$ 로, 1.6  $\mu\text{m}$ 인 흑연, *Aristichthys nobilis*, 초어, *Ctenopharingodon idella*, rose bitterling, *Rhodeus ocellatus* 및 백연, *Hypophthalmichthys molitrix*의 정자와 비슷한 크기였으나(Emeljanova and Makeeva 1985), 그외 어종들에 비해서는 작았고(Linhart et al. 1991), 복어류 정자

중에서도 작은 편이었다(Miyaki et al. 1993). 자주복 정자의 중편부에 존재하는 미토콘드리아 수는 7개로서 7~9개인 잉어, 백연과 비슷한 수준이었고, 흑연, rose bitterling, stone moroko, *Pseudorasbora parva* (Linhart et al. 1991)에 비해서 많았다. 자주복의 정자와 같이 긴 타원형의 머리를 가진 황복 정자의 두부는 장경이  $1.81 \pm 0.28 \mu\text{m}$ 로 자주복에 비해 다소 커 잉어의 두부 크기( $1.8 \sim 2.2 \mu\text{m}$ )와 비슷한 수준이었다(Gwo et al. 1993). 송어와 감성돔의 정자는 복어류와는 달리 원형의 머리를 가지고 있었으며, 두부의 직경은 송어  $1.26 \pm 0.08 \mu\text{m}$ , 감성돔  $1.49 \pm 0.07 \mu\text{m}$ 로 Atlantic croaker(Gwo and Arnold 1992)나 turbot(Suquet et al. 1993)와 비슷한 수준이었다. 이 연구에서 조사된 4 어종 모두 두부에 첨체는 가지고 있지 않았으며, 편모는 전형적인 9+2구조를 보였다.

이 연구에서 송어와 감성돔 정자는 인공해수(1055 mOsm/kg)와 정장(382 mOsm/kg) 사이의 삼투질농도에서 운동성이 높았으나, 1200 mOsm/kg 이상에서는 삼투질농도 증가에 비례하여 운동성이 감소하였다. 그러나 삼투질농도가 158 mOsm/kg이었던  $\text{Na}^+$  결여 인공해수에서는 정자의 운동성이 전혀 관찰되지 않았다. Morisawa et al.(1992)은 청어의 정자가 정장과 등장인 용액에서는 움직이지 않지만, 고장액에 희석되면 운동을 개시한다고 하였다. 또 Morisawa and Suzuki (1980)는 복섬, 대구, 가자미류의 움직이지 않던 정자가 해수나 해수와 동일한 삼투질농도를 가진 용액에서 운동을 개시한다고 하여, 이들의 언급과 본 연구의 결과는 정자의 운동성을 촉진하거나 억제하는 요인이 환경수의 삼투질농도임을 나타낸다. 담수어류에서는 해산어류와 반대로 정장보다 낮은 삼투질농도에서 높은 정자의 운동성이 관찰되다가, 삼투질농도 상승과 함께 운동성이 감소하는 것으로 알려져 있다(Morisawa et al. 1983 ; Strussmann et al. 1994).

희석액중  $\text{K}^+$  농도의 감소는 연어과 어류의 정자운동을 촉진시킨다는 Morisawa

(1985)의 연구결과와는 달리 감성돔 정자의 운동성에는 영향을 미치지 않았다. 이것은 해산어류 정장의  $K^+$  농도가 연어나 잉어 보다 낮은 반면, 환경수인 해수의  $K^+$  농도는 오히려 담수에 비해 높기 때문이라고 생각된다. 결론적으로 감성돔 정자의 운동성 변화는 양이온의 농도에 기인한다기 보다 양이온 농도에 따른 환경수의 삼투질농도 변화에 직접적인 영향을 받는 것으로 판단된다.

## 제3장 냉장(단기) 보존

### 제1절 서설

어류 정자의 냉장(단기)보존은 양식 대상 어류의 종묘생산시 친어의 방란·방정 시기와 성비의 차이에 따른 문제점을 극복할 수 있게하며, 정액의 수송이나 조작 등을 간편하게 한다. 이와 같이 어류의 정자보존 기술이 종묘생산에 있어 많은 장점을 가지고 있으나, 우리나라에서는 아직 이 분야에 관한 기초 연구가 미흡한 실정이다. 그러므로 해산어류의 정자보존을 위한 정자의 기초 생리활성 요인에 관한 연구와 함께 실제 종묘생산 현장에서 단기간 효과적으로 활용할 수 있는 냉장보존 기술의 확보가 우선되어야 할 것이다.

지금까지 외국에서 어류 정자의 냉장보존에 관한 연구는 희석액에 따른 보존효과(Chao et al. 1975; Hara et al. 1982; McNiven et al. 1993), 산소공급에 따른 정자의 수정능력 향상(Stoss and Holtz 1983), 항생제 사용에 따른 보존기간 연장(Chao et al. 1992; Saad et al. 1987; Stoss et al. 1978) 및 희석액의 농도에 따른 수정률의 검토(Erdahl and Graham 1987) 등을 통하여, 신선한 정자의 최적 냉장보존 조건을 파악하기 위한 방향으로 연구가 진행되어 왔다.

이 연구에서는 복어류, 숭어 및 감성돔을 대상으로 희석액과 항생제 처리에 따라 정자를 단기간 보존할 수 있는 냉장보존 가능성을 검토하여, 어류의 종묘생산 과정에 이용 가능한 정자보존 방법을 제공하고자 하였다.

## 제2절 재료 및 방법

정자의 보존효과를 파악하기 위한 보존 전의 정자 운동성, 보존과정 및 보존 후의 정자활성 및 수정률의 평가과정은 Fig. 21과 같다.

### 1. 최적 희석액의 조성

#### 가. 자주복

냉장보존의 각 실험조건에서 정자활성을 파악하기 위하여 정자의 운동성과 생존율을 조사하였다.

희석액의 조성에 따른 정자의 냉장보존 효과를 파악하기 위하여, Alsever's solution, Cortland medium, egg-tris, 0.5 M fructose, 0.3 M glucose, Mounib's solution, marine fish ringer solution(MFRS), 1% NaCl, sodium chloride medium, 3.6% sodium citrate 및 2.8% sucrose 등의 11가지 희석액을 정액과 3:1의 비율로 섞은 후, 희석정액별로 시험관( $\phi 1.1$  cm)에 3 cm의 두께가 되도록 분주하였다. 분주가 완료된 희석정액은  $0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 유지한 incubator에서 7일간 보존하면서, 1일 간격으로 0.1 ml의 희석정액을 덜어내어 정자활성을 조사하였다. 각 희석액들의 조성은 Table 12와 같다.

#### 나. 황복

희석액의 조성에 따른 정자의 냉장보존 효과를 파악하기 위하여 egg-tris, 0.1, 0.3, 0.5 M glucose 및 MFRS를 각각 2:1의 비율로 정액과 희석한 후 1.5 ml vial에 분주하였다. 분주가 끝난 vial은  $0 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 냉장고에서 16일 동안 보관하면서 1일 간격으로 정자의 운동성과 생존율을 조사하였다.

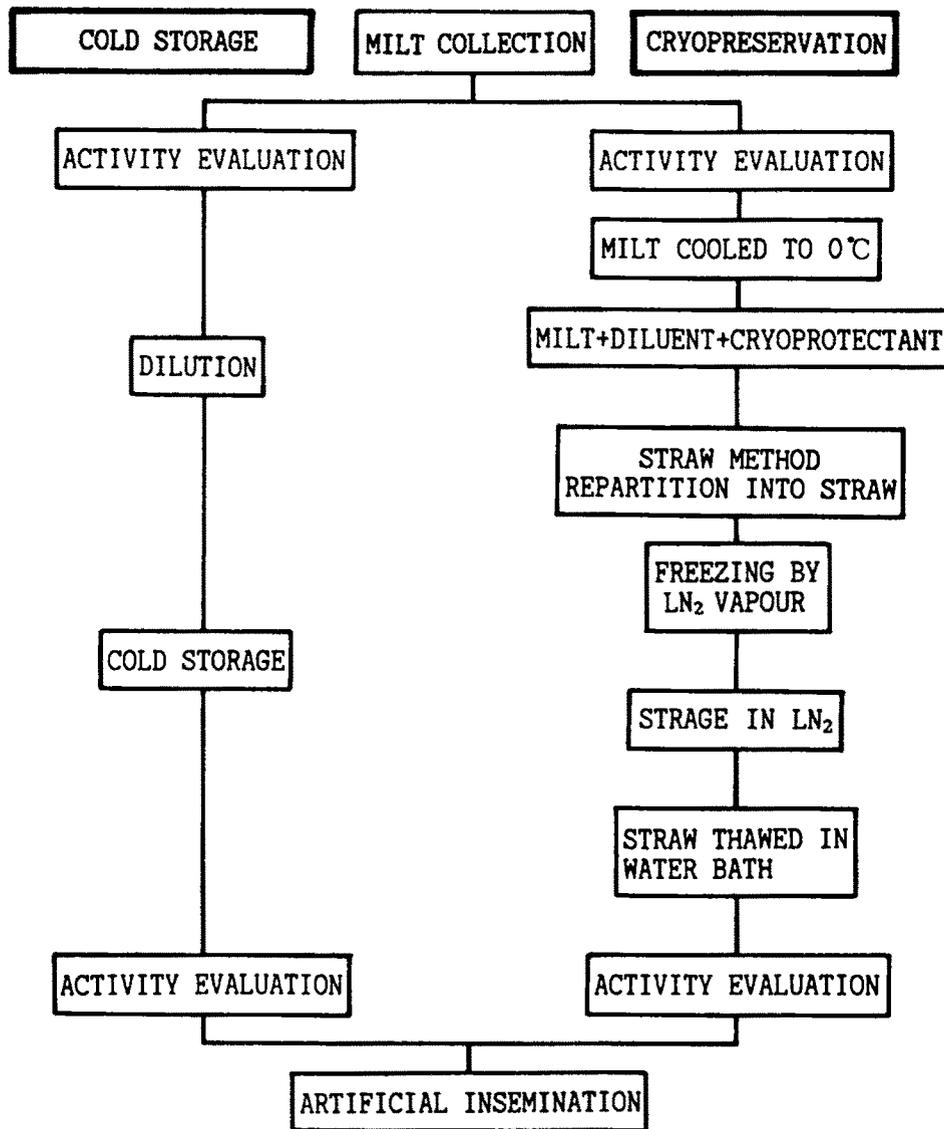


Fig. 21. Procedures of the experiments for cold storage and cryopreservation of fishes spermatozoa.

Table 12. Constituents of diluents used in the experiment of tiger puffer sperm preservation

| Diluents               | Constituent  |
|------------------------|--|
| Alsever's solution     | 2.05 g glucose, 0.4 g sodium chloride, 0.8 g sodium citrate/D.W. 100 ml  |
| Cortland medium        | 0.23 g CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O, 1.0 g glucose, 0.38 g KCl, 0.23 g MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 7.25 g NaCl, 1.0 g NaHCO <sub>3</sub> , 0.41 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O/D.W. 1000 ml |
| Egg-tris               | 1.424 g citric acid, 20 ml hen's egg yolk, 0.48 g fructose, 400 ppm gentamicin, 2.422 g tris/D.W. 80 ml  |
| Mounib's solution      | 6.5 mM glutathione, 100 mM KHCO <sub>3</sub> , 125 mM sucrose  |
| MFRS                   | 0.346 g CaCl <sub>2</sub> , 0.597 g KCl, 0.017 g MgCl <sub>2</sub> , 13.5 g NaCl, 0.025 g NaHCO <sub>3</sub> /D.W. 1000 ml   |
| Sodium chloride medium | 0.4 M NaCl-0.1 M glycine 40 parts, 1.3 % NaHCO <sub>3</sub> 8 parts  |
| Fructose (0.5 M)       | 90 g fructose/D.W. 1000 ml   |
| Glucose (0.3 M)        | 54.3 g glucose/D.W. 1000 ml  |
| NaCl (1%)              | 1 g NaCl/D.W. 100 ml   |
| Sodium citrate (3.6%)  | 3.6 g sodium citrate/D.W. 100 ml   |
| Sucrose (2.8%)         | 2.8 g sucrose/D.W. 100 ml  |

MFRS : marine fish ringer solution. D.W. : distilled water.

#### 다. 송어

희석액의 조성에 따른 정자의 냉장보존 효과를 파악하기 위하여, Alsever's solution, egg-tris, 송어 혈청, MFRS, lactose, 0.1 M, 0.3 M, 0.5 M glucose 및 0.1 M, 0.2 M, 0.3 M sodium citrate 등의 11가지 희석액을 정액과 2:1의 비율로 섞은 후, 희석정액별로 6 ml vial( $\phi$  1.1 cm)에 분주하였다. 분주가 완료된 희석정액은  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 로 유지한 냉장고에서 10일간 보존하면서, 1일 간격으로 정자활성을 조사하였다.

#### 라. 감성돔

희석액의 조성에 따른 정자의 냉장보존 효과를 파악하기 위하여, egg-tris, 0.1 M, 0.3 M, 0.5 M glucose 및 감성돔 혈청을 각각 2:1의 비율로 정액과 희석한 후 1.5 ml vial에 분주하였다. 분주가 끝난 vial은  $0\pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 냉장고에서 10일 동안 보관하면서 1일 간격으로 정자의 운동성과 생존율을 조사하였다.

## 2. 냉장보존을 위한 최적조건

#### 가. 자주복

##### 1) 보존적온

냉장보존시 온도가 보존효과에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 1% NaCl 희석액을 정액과 5:1의 비율로 혼합한 후, 보존정액의 두께 3 cm, agitation 조건으로 각각 0, 5, 10,  $20^{\circ}\text{C}$ 의 온도에서 20일간 보존하였다. 보존 7일까지는 1일 간격으로, 이후 20일까지는 3일 간격으로 정자활성을 평가하였다.

## 2) 냉장보존에서 항생제의 영향

냉장보존시 항생제의 첨가에 따른 보존효과를 평가하기 위하여, 1% NaCl 희석액을 정액과 5:1의 비율로 섞은 후, 보존정액의 액층 3 cm, agitation 조건에서 neomycin과 gentamicin을 최종농도가 각각 200, 400, 600, 800, 1000 ppm 되도록 첨가하였다. 각 실험에서 분주된 시험관( $\phi$  1.1 cm)들은  $0\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 의 incubator에 20일간 보존하면서 7일 동안은 1일 간격으로, 이후부터는 3일 간격으로 정자활성을 평가하였다.

## 3) 희석비율에 따른 보존효과

냉장보존시 정액의 적정 희석비율을 결정하기 위하여, 1% NaCl을 희석액으로 사용하여 정액을 각각 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30배로 희석한 후, 희석정액별로 시험관( $\phi$  1.1 cm)에 3 cm 두께로 한 다음,  $0\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 의 incubator에서 20일간 보존하였다. 처음 7일 동안은 1일 간격으로 그 이후부터 3일 간격으로 정자활성을 평가하였다.

## 4) 보존액층의 두께와 보존 중 agitation의 효과

보존액층의 두께와 agitation 조건에 따른 냉장보존 효과를 평가하기 위하여, 1% NaCl 희석액을 정액과 5:1의 비율로 혼합한 후, 시험관( $\phi$  1.1 cm)에 각각 3, 5, 7 cm의 두께로 분주하여 agitation과 non-agitation 조건으로 20일간 보존하였다. 보존온도는  $0\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 였으며 보존 7일까지는 1일 간격으로, 이후 20일까지는 3일 간격으로 각 액층의 상층과 하층에 있는 정자의 활성을 평가하였다.

## 나. 승어

### 1) 희석액의 pH에 따른 냉장보존 효과

희석액의 최적 pH를 조사하기 위하여 0.3 M glucose에 HCl과 NaOH를 첨가하

여 pH 5, 6, 7, 8 및 9로 조절하였다. 이후 혈청과 정액의 비율을 2:1로 희석하여 1.5 ml vial에 분주하였다. 분주된 각각의 vial들은  $0\pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 냉장고에서 보관하면서 10일 동안 1일 간격으로 정자의 운동성과 생존율을 조사하였다.

#### 다. 감성돔

##### 1) 희석액의 pH에 따른 냉장보존 효과

희석액의 최적 pH를 조사하기 위하여 희석액 조성에 따른 냉장보존 실험에서 가장 좋은 성적을 나타냈던 감성돔 혈청에 HCl과 NaOH를 첨가하여 pH 5, 6, 7, 8 및 9로 조절하였다. 이후 혈청과 정액의 비율을 2:1로 희석하여 1.5 ml vial에 분주하였다. 분주된 각각의 vial들은  $0\pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 냉장고에서 보관하면서 10일 동안 1일 간격으로 정자의 운동성과 생존율을 조사하였다.

##### 2) 냉장보존에서 항생제의 영향

냉장보존시 항생제의 첨가에 따른 보존효과를 평가하기 위하여 0.3 M glucose를 2:1의 비율로 정액과 섞은 후, neomycin, gentamicin 및 chlortetracycline이 최종농도가 400, 600, 800, 1000 ppm이 되도록 첨가하였다. 이후  $0\pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 냉장고에서 10일 동안 보관하면서 1일 간격으로 정자의 운동성과 생존율을 조사하였다.

#### 3. 통계처리

각 실험 결과는 일원 분산분석과 Tukey test (Zar 1984)로 검정하였다.

## 제3절 결 과

### 1. 최적 희석액의 조성

#### 가. 자주복

냉장보존에 적합한 희석액을 결정하기 위하여, 자주복에서 채취한 정액을 다양한 희석액과 혼합한 다음  $0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 에서 7일간 보존하면서 SAI와 생존율을 조사한 결과는 Fig. 22~23과 같다. 희석직후의 희석액별 SAI는 fructose와 sodium chloride medium에서 각각 0.6과 0.9로 가장 낮았고, 그외 9가지 희석액에서는 2.4~2.9로 비교적 높았다. 보존 2일째에는 fructose, glucose 및 sodium chloride medium의 SAI가 급격히 저하하여 거의 0에 이르렀다. 보존 7일째에 MFRS와 1% NaCl의 SAI는 각각 1.7과 1.6으로 다른 희석액에 비해 가장 높았다(Fig. 22).

희석액별 정자의 생존율도 SAI와 비슷한 경향을 보여, MFRS와 1% NaCl을 희석액으로 하였을 때 보존 7일째 정자의 생존율은 각각  $59.0 \pm 1.5\%$ ,  $56.7 \pm 6.2\%$ 로, 다른 희석액에 비해 유의하게 높았으나( $P < 0.05$ ), 두 희석액 사이에는 유의차가 인정되지 않았다(Fig. 23).

#### 나. 황복

황복 정자의 냉장보존 실험에서 희석 직후 정자의 SAI는 egg-tris (0.5)를 제외한 다른 희석액에서 0.9로 비교적 높았으나, 보존 8일 후 0.1, 0.3, 0.5 M glucose에 희석하여 보존한 정자의 SAI는 0.2까지 감소하였다(Fig. 24).

냉장보존 실험에서 희석액별 생존율은 0.1 M, 0.3 M glucose가 가장 높아서 보존 8일째까지 각각 79.4와 79.8%의 생존율을 보였으며 나머지 희석액의 결과는 그다지 좋지 않았다.

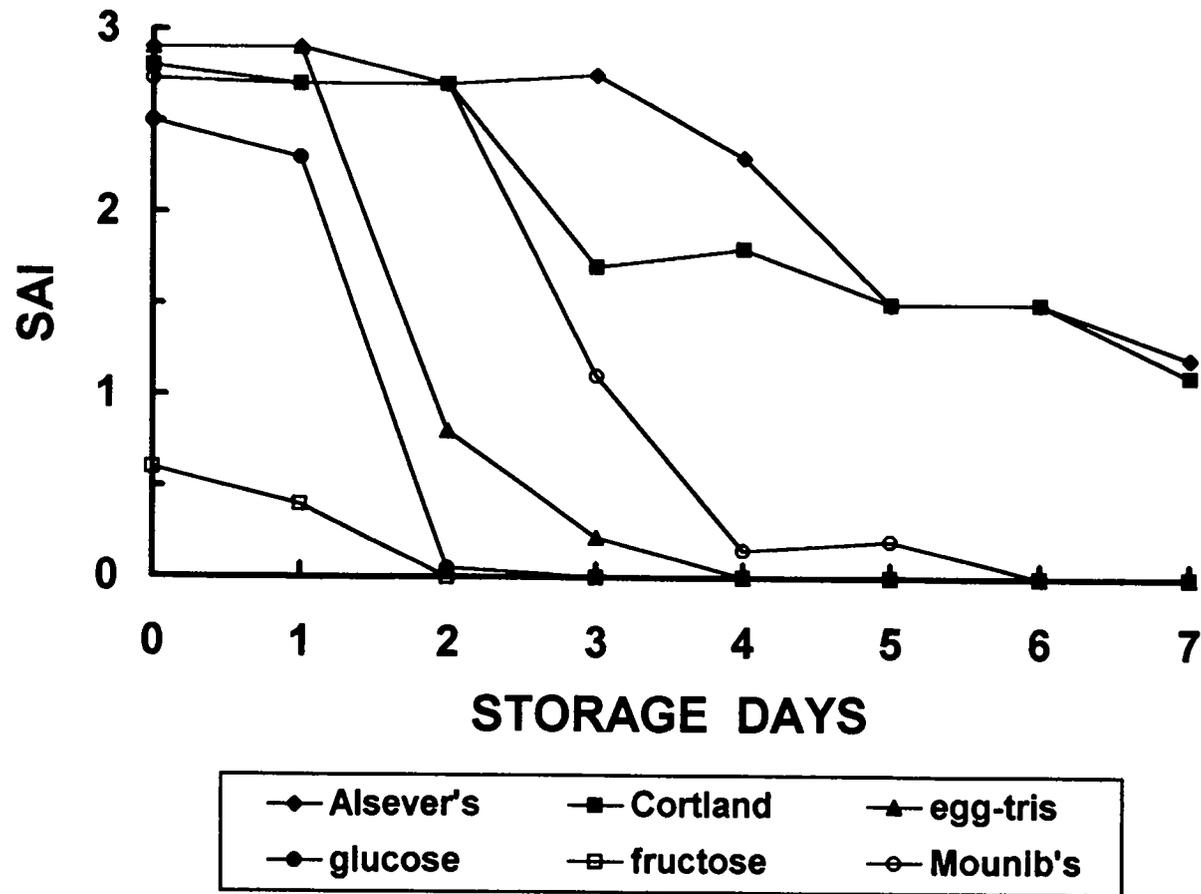


Fig. 22. Variations of sperm activity index (SAI) in tiger puffer spermatozoa stored at 0°C for 7 days with 11 diluents. MFRS: marine fish ringer solution, SCM: sodium chloride medium.

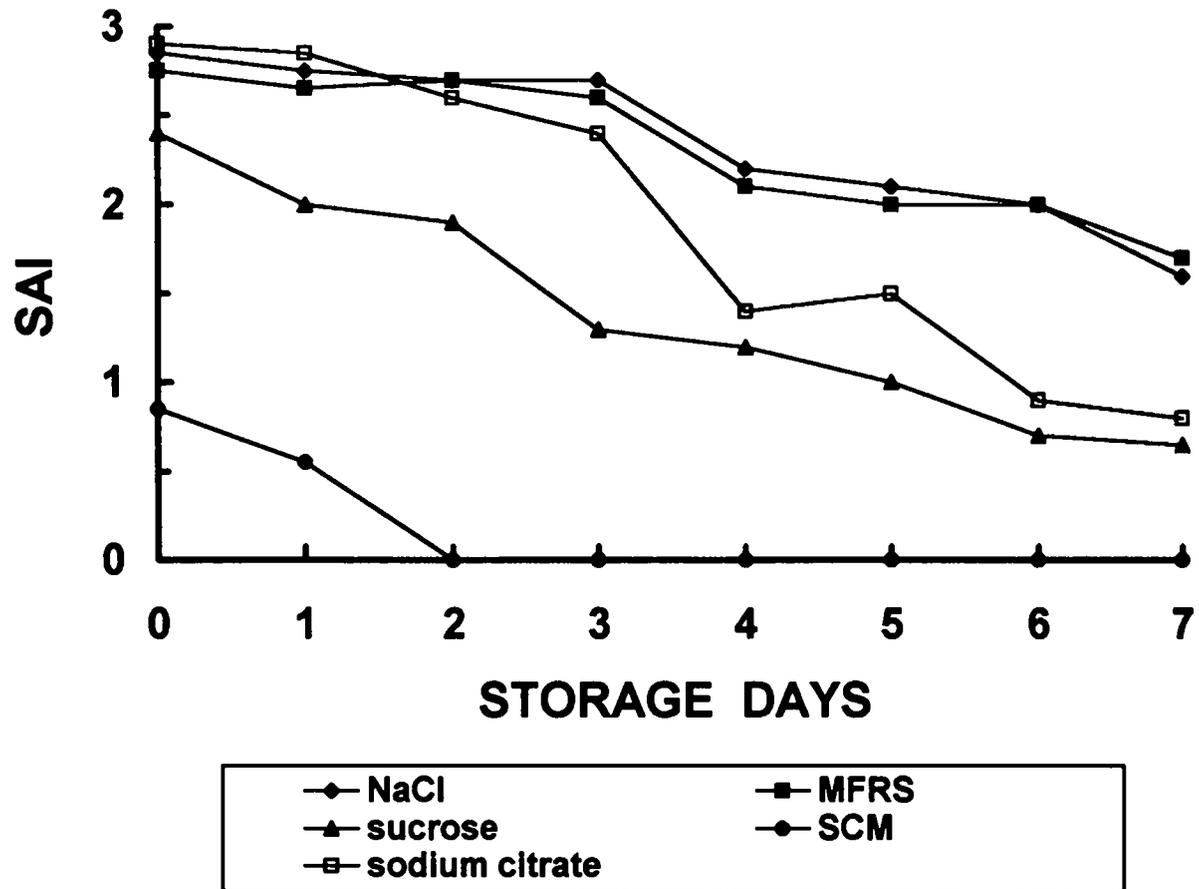


Fig. 22. Continued.

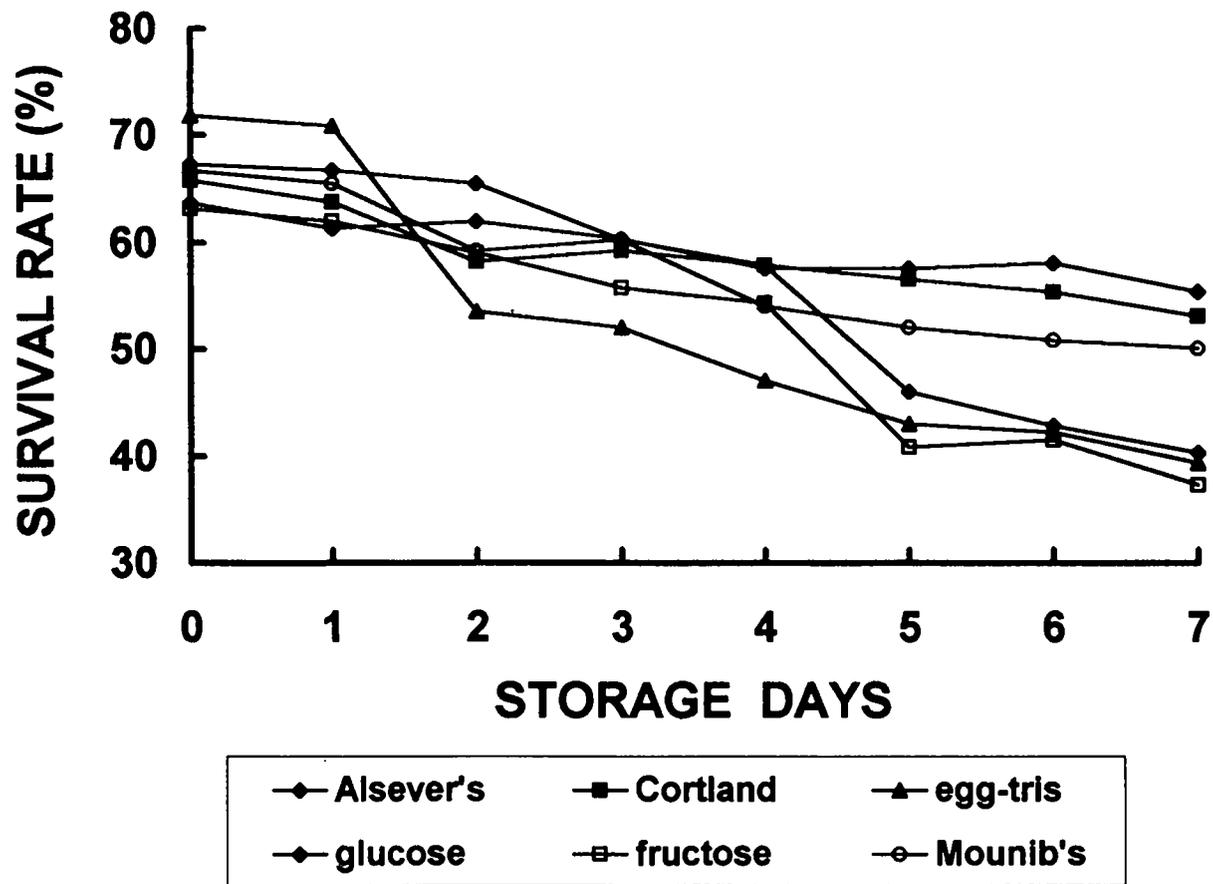


Fig. 23. Variations of survival rate in tiger puffer spermatozoa stored at 0°C for 7 days with 11 diluents. MFRS: marine fish ringer solution, SCM: sodium chloride medium.

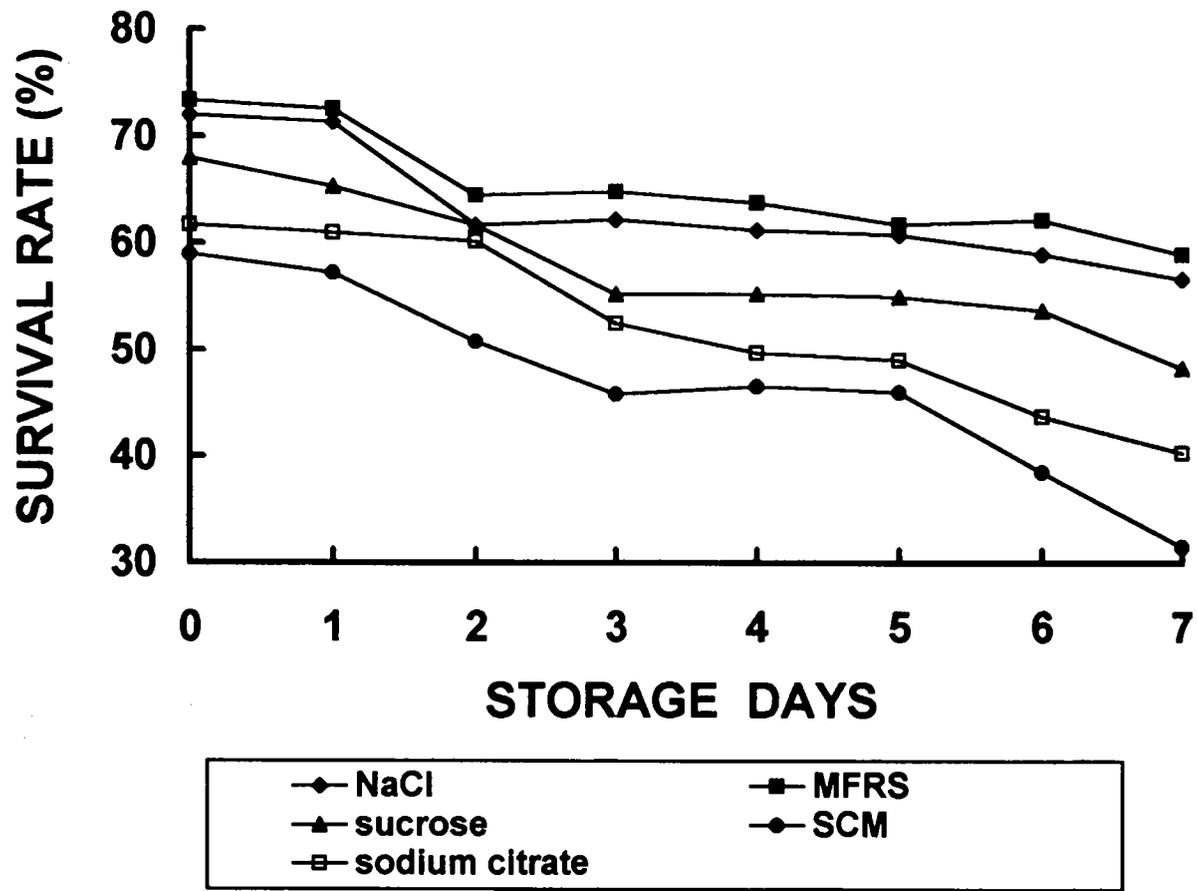


Fig. 23. Continued.

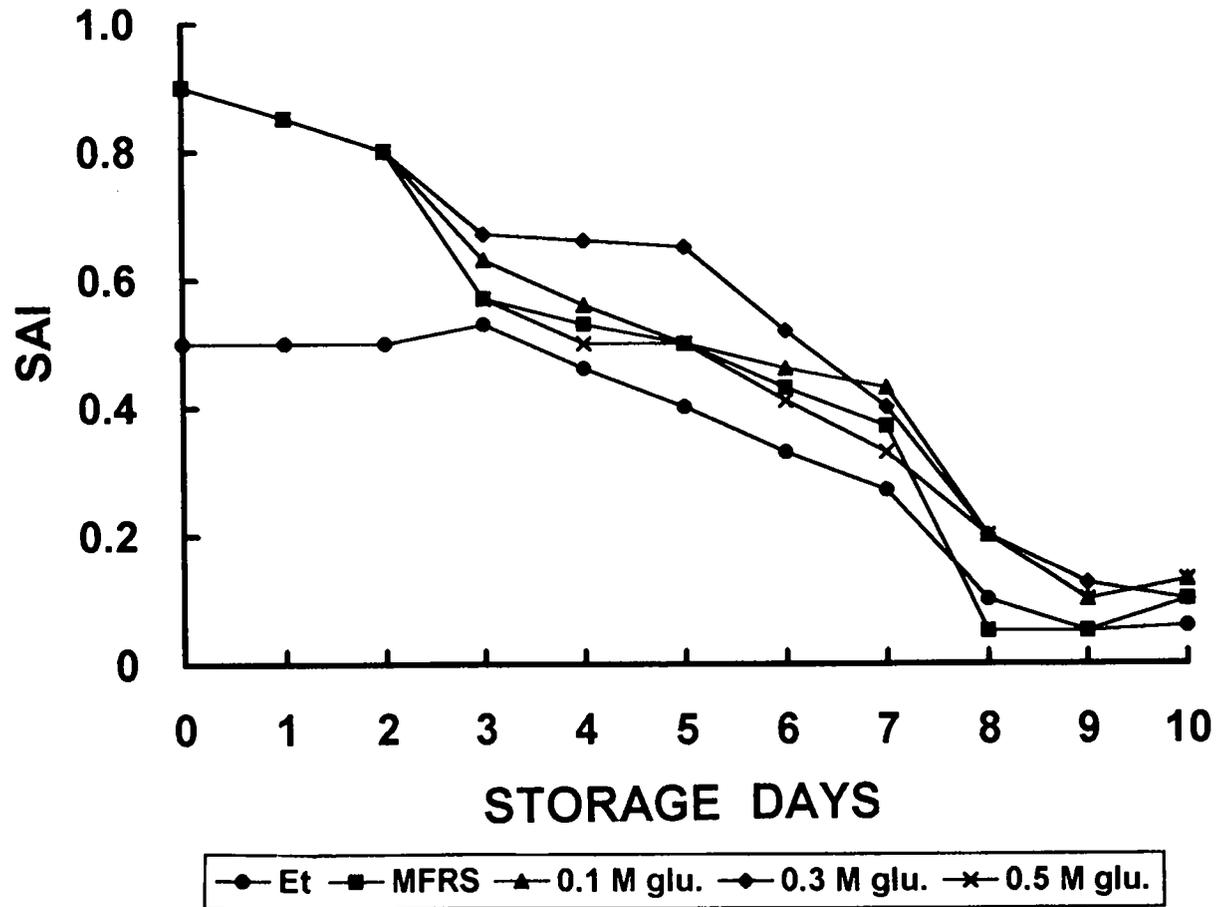


Fig. 24. Variations of sperm activity index (SAI) in river puffer spermatozoa stored at 0°C for 10 days with 5 diluents. Et: egg-tris, G: glucose, MFRS: marine fish ringer solution.

희석액별로 15일 동안 냉장보존한 정자의 알에 대한 수정률은 Fig. 25에 나타내었다. 수정률은 신선한 정액을 사용한 대조구에서  $72.4 \pm 3.3\%$ 로 가장 높았으나, egg-tris, 0.1 M, 0.3 M, 0.5 M glucose 및 MFRS를 사용하였을 때는  $0 \sim 0.7 \pm 0.8\%$ 로 대조구에 비해 매우 낮았다.

#### 다. 송어

채취 직후의 송어 정자를 희석액별로 혼합하여 4℃로 유지한 다음, 보존기간에 따른 정자의 운동성을 조사한 결과는 Fig. 26과 같다. 희석액별 보존 1일후의 SAI는 원정액과 Alserver's solution이 2.5와 2.2로 비교적 활발한 운동성을 보였고, 0.3 M glucose에서는 1.4로 운동성이 가장 저조하였다. 그후 보존 3일 째까지 모든 희석액에서 SAI가 급격히 떨어져서 MFRS와 Alserver's solution이 1.2였고, 원정액에서는 0.7로 가장 낮았다. 보존 4일 째부터는 SAI가 완만하게 감소하여 보존 10일째에는 모든 희석액에서 0.5 전후였다.

#### 라. 감성돔

채취 직후의 정액을 희석액별로 혼합하여 0℃로 유지한 다음, 보존 기간에 따른 SAI와 정자의 생존율을 조사한 결과는 Fig. 27과 같다. 희석액별 희석 직후의 SAI는 egg-tris와 0.5 M glucose에서 1.9로 가장 높았고, 0.1 M glucose에서는 1.5로 가장 낮았다. 그러나 보존 1일째의 SAI는 egg-tris에서 급격히 떨어진 반면, 혈청에서는 서서히 낮아지면서 보존 10일째까지도 0.3으로 비교적 높게 유지되어 보존효과가 가장 좋았다. 희석액별 정자의 생존율에서도 보존기간별 SAI와 비슷한 경향을 보여, 보존 10일째 정자의 생존율은 혈청에서 55.6%로 가장 높았으나 egg-tris에서는 25.5%로 낮았다.

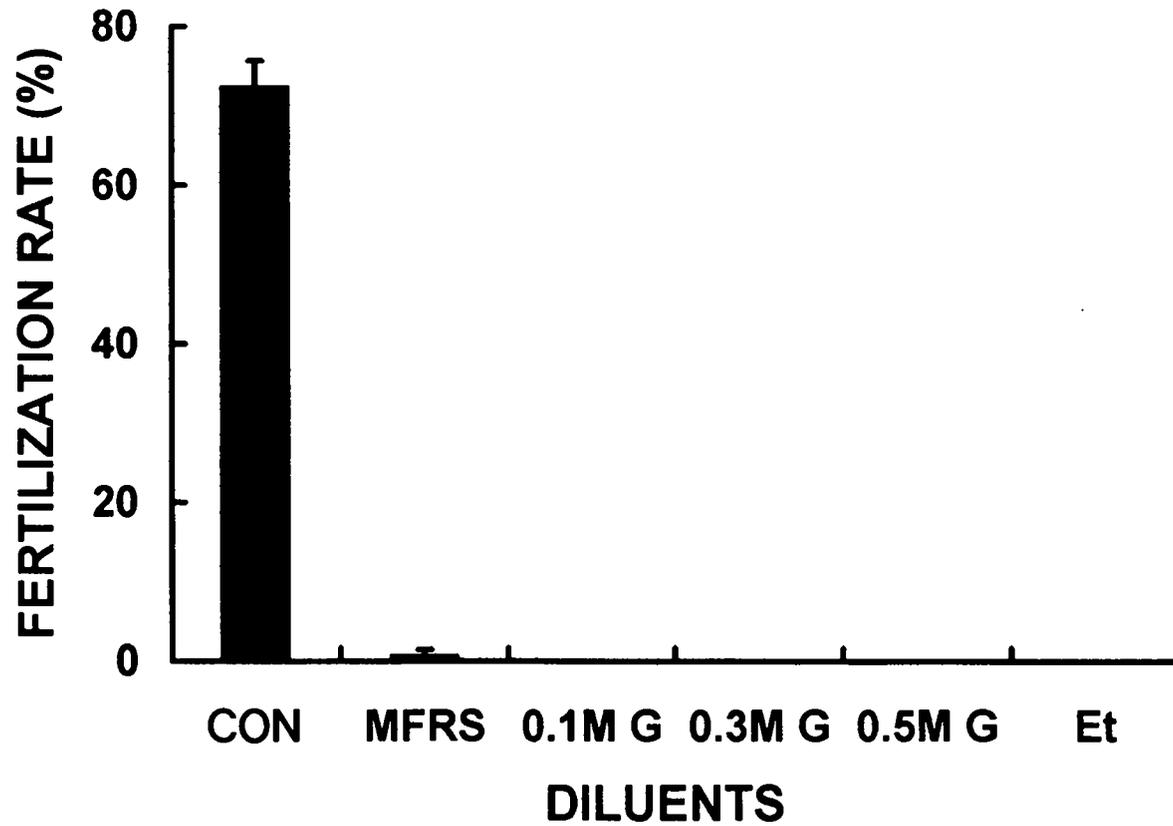


Fig. 25. Fertilization rate in river puffer spermatozoa stored at 0°C during 16 days with five diluents. CON: control, Et: egg-tris, G: glucose, MFRS: marine fish ringer solution.

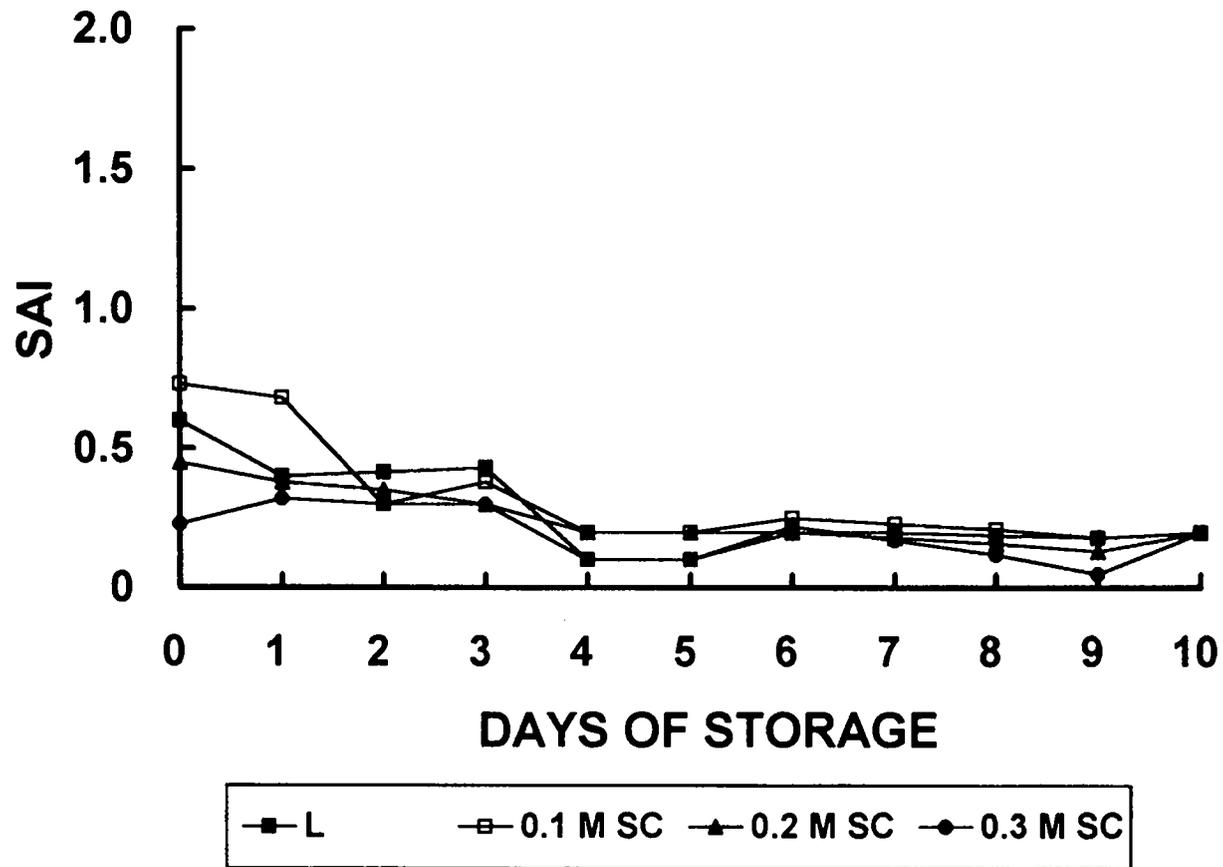


Fig. 26. Variations of survival rate in grey mullet spermatozoa stored at 0°C for 7 days with 9 diluents. Et: egg-tris, G: glucose, L: lactose, MFRS: marine fish ringer solution, SC: sodium citrate.

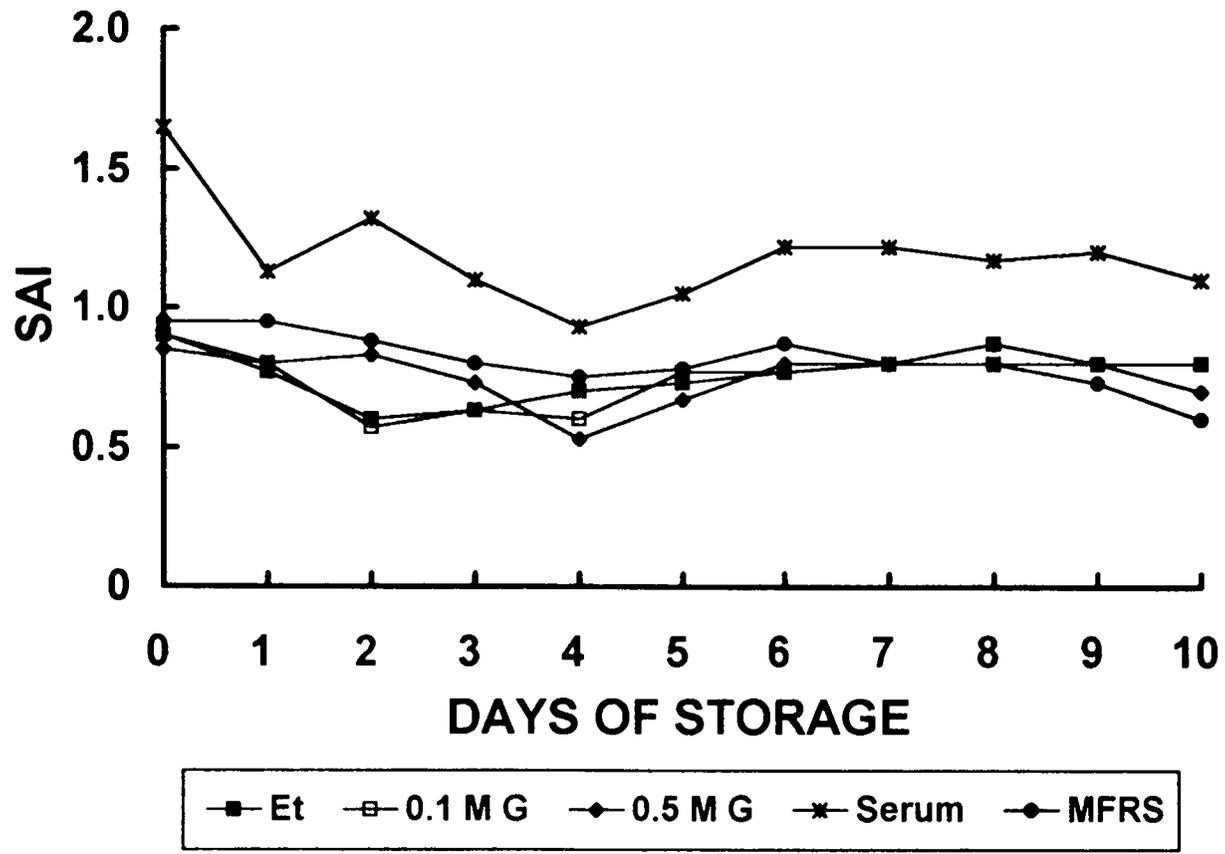


Fig. 26. Continued.

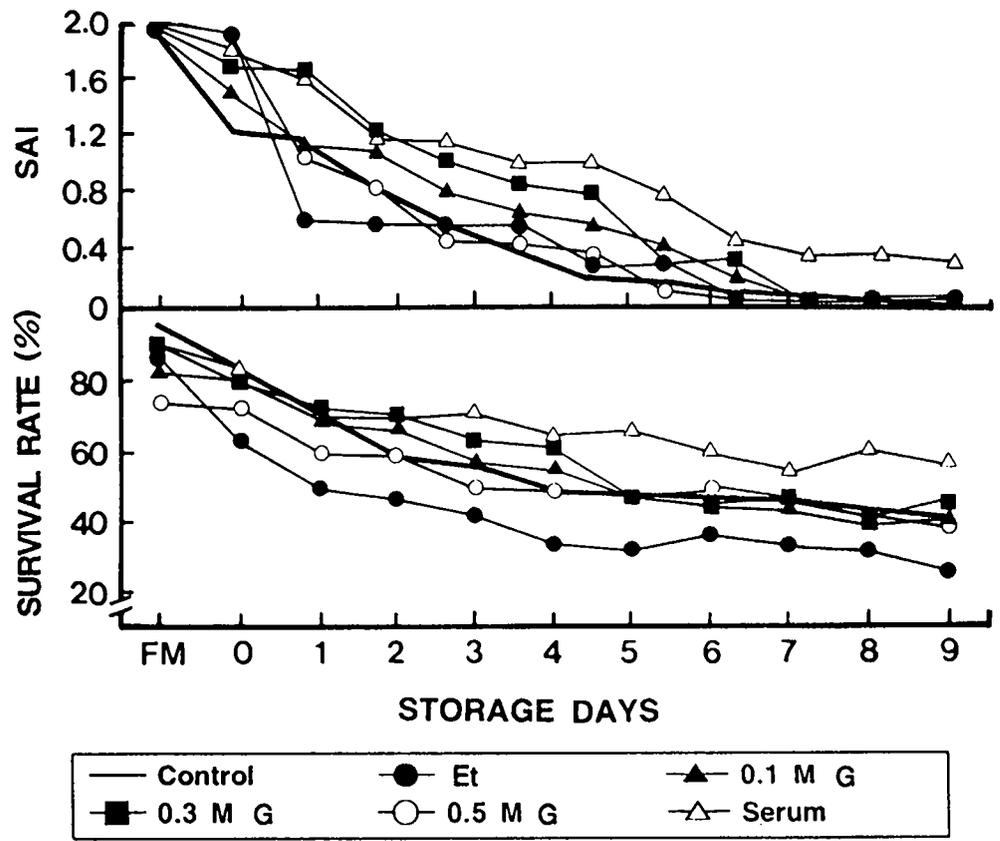


Fig. 27. Variation of sperm activity index (SAI) and survival rate in black seabream spermatozoa stored at 0°C with five diluents. Serum is originated from black seabream. Et: egg-tris, FM: fresh milt, G: glucose.

희석액별로 7일 동안 냉장보존한 정자의 감성돔 알에 대한 수정률은 Table 13과 같이 혈청을 희석액으로 사용하였을 때  $47.7 \pm 7.3\%$ 로 가장 높았고, 그 다음이 0.3 M glucose, 0.5 M glucose, egg-tris, 0.1 M glucose 순이었으나 서로간에 유의한 차이는 없었다. 냉장보존한 정자의 각 수정률은 신선한 정액으로 수정시켰을 때의  $78.3 \pm 8.3\%$  보다 유의하게 낮았다( $P < 0.05$ ).

Table 13. Effects of diluents on fertilization rate of black seabream spermatozoa

| Diluent       | Days of storage | SAI  | Fertilization rate (%) <sup>1</sup> |
|---------------|-----------------|------|-------------------------------------|
| Fresh milt    | 0               | 2.40 | $78.3 \pm 8.3^a$                    |
| Serum         | 7               | 0.87 | $47.7 \pm 7.3^b$                    |
| Egg-tris      | 7               | 0.25 | $37.7 \pm 7.6^b$                    |
| 0.1 M glucose | 7               | 0.32 | $35.8 \pm 8.4^b$                    |
| 0.3 M glucose | 7               | 0.35 | $44.3 \pm 5.3^b$                    |
| 0.5 M glucose | 7               | 0.32 | $39.6 \pm 5.9^b$                    |

<sup>1</sup>values within the same column with different letters are significantly different ( $P < 0.01$ ).

## 2. 냉장보존을 위한 최적조건

### 가. 자주복

11가지 희석액 중 정자의 SAI와 생존율이 높았던 1% NaCl을 희석액으로 하고 정액의 희석비율을 달리하여  $0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 에서 20일간 보존한 결과, 정액을 20배 이상

의 비율로 희석한 것은 20배 미만으로 희석하여 보존한 것에 비해 보존 1일째에 SAI가 급격히 감소하였고, 모든 희석비율에서 보존 20일째의 SAI는 0으로 나타났다(Fig. 28). 그러나 보존 20일째에 정자의 생존율은 최저 12.8%에서 최고 46.7%로 나타나, 운동하지 않는 정자라 할지라도 생존하고 있음을 알 수 있었다(Fig. 29). 여러 가지 희석비율 중 가장 좋은 보존결과를 보인 것은 1% NaCl을 사용하여 정액을 3배와 5배로 희석한 것으로, 보존 20일째의 생존율은 각각  $46.7 \pm 2.7\%$ 와  $45.2 \pm 2.9\%$ 로 다른 희석비율에 비해 유의하게 높았으나( $P < 0.05$ ), 두 희석비율 사이에는 유의차가 인정되지 않았다.

1% NaCl을 희석액으로 하여 정액을 5배 희석한 후, 희석정액의 두께를 각각 3, 5, 7 cm가 되도록 하고 보존과정 중 agitation 및 non-agitation 조건으로 20일간 보존한 결과는 Figs. 30, 31과 같다. 각 실험에서 실험개시시의 SAI는 2.6으로 동일하지만, 보존기간이 길어짐에 따라 SAI가 점차 낮아지는 경향을 보였고, 보존 20일째의 SAI는 대부분의 실험구에서 0이었다. 가장 좋은 보존효과를 보인 것은 agitation 하지 않으면서 3 cm 두께의 희석 정액 상층부에 보존된 정자였고, 보존 20일째의 SAI와 생존율은 각각  $0.1 \pm 0.0$ ,  $53.8 \pm 4.1\%$ 로, 다른 실험구에 비해 유의하게 높았다( $P < 0.05$ )(Figs. 30, 31). 또한 모든 보존두께에서 non-agitation 조건에 든 보존액층 상층부의 정자가 agitation 조건 보다 활력이 좋은 것으로 나타났다.

1% NaCl을 희석액으로 하여 정액을 5배 희석한 후, 희석 정액의 두께를 3 cm로 하고, 보존온도를 달리하여 20일간 보존한 결과는 Figs. 32, 33과 같다. 보존 6일째의 SAI는 0℃와 5℃에서 보존한 정자의 경우 각각 0.9, 1.1을 보인 반면, 10℃ 이상에서 보존한 것은 0.3 이하로 급격히 낮아졌다(Fig. 32). 0℃와 5℃에서 보존한 정자의 보존 20일째 생존율은 각각  $44.5 \pm 3.3\%$ ,  $42.8 \pm 1.7\%$ 로 다른 처리구에 비해 유의하게 높았으며( $P < 0.05$ ), 온도 사이에는 유의차가 인정되지 않았다(Fig. 33).

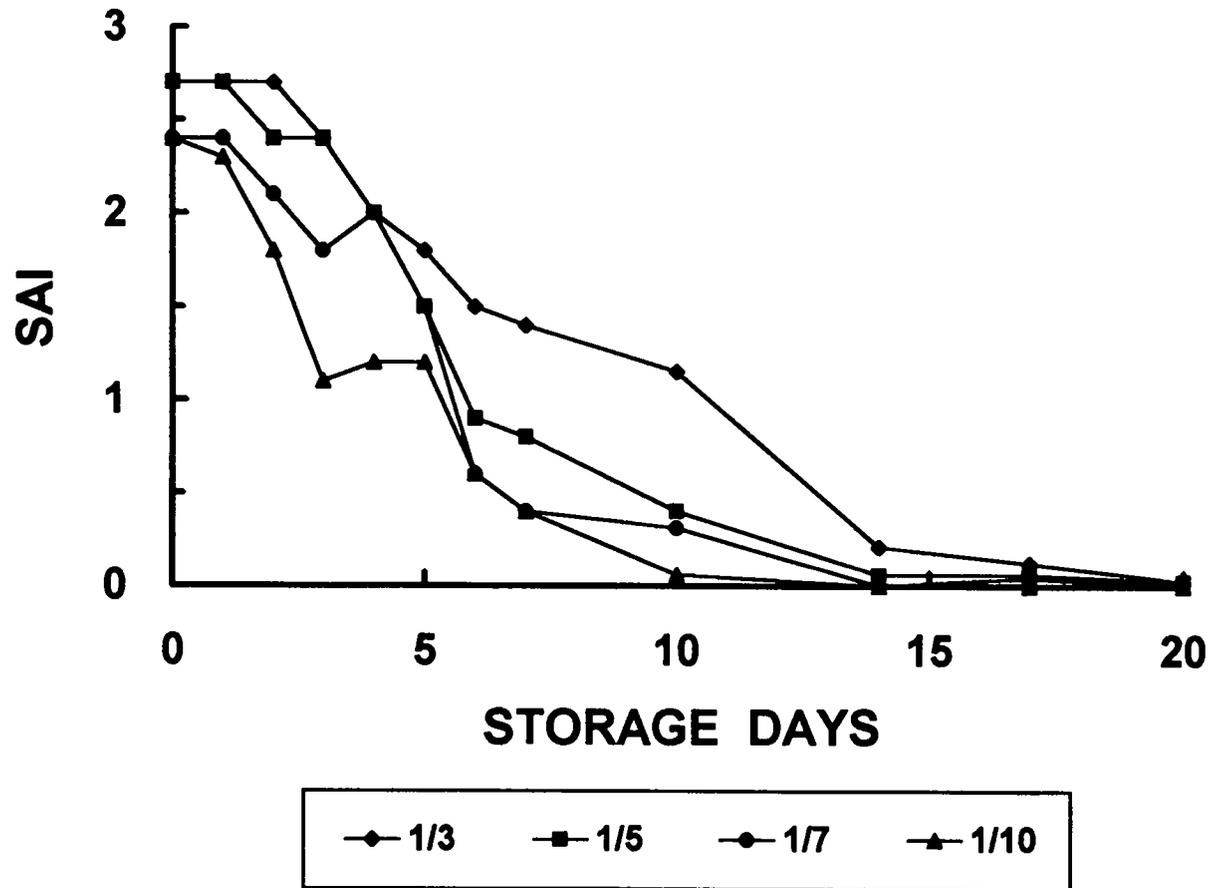


Fig. 28. Variations of sperm activity index (SAI) in tiger puffer spermatozoa stored at 0°C during 20 days with different dilution rates in 1% NaCl diluent.

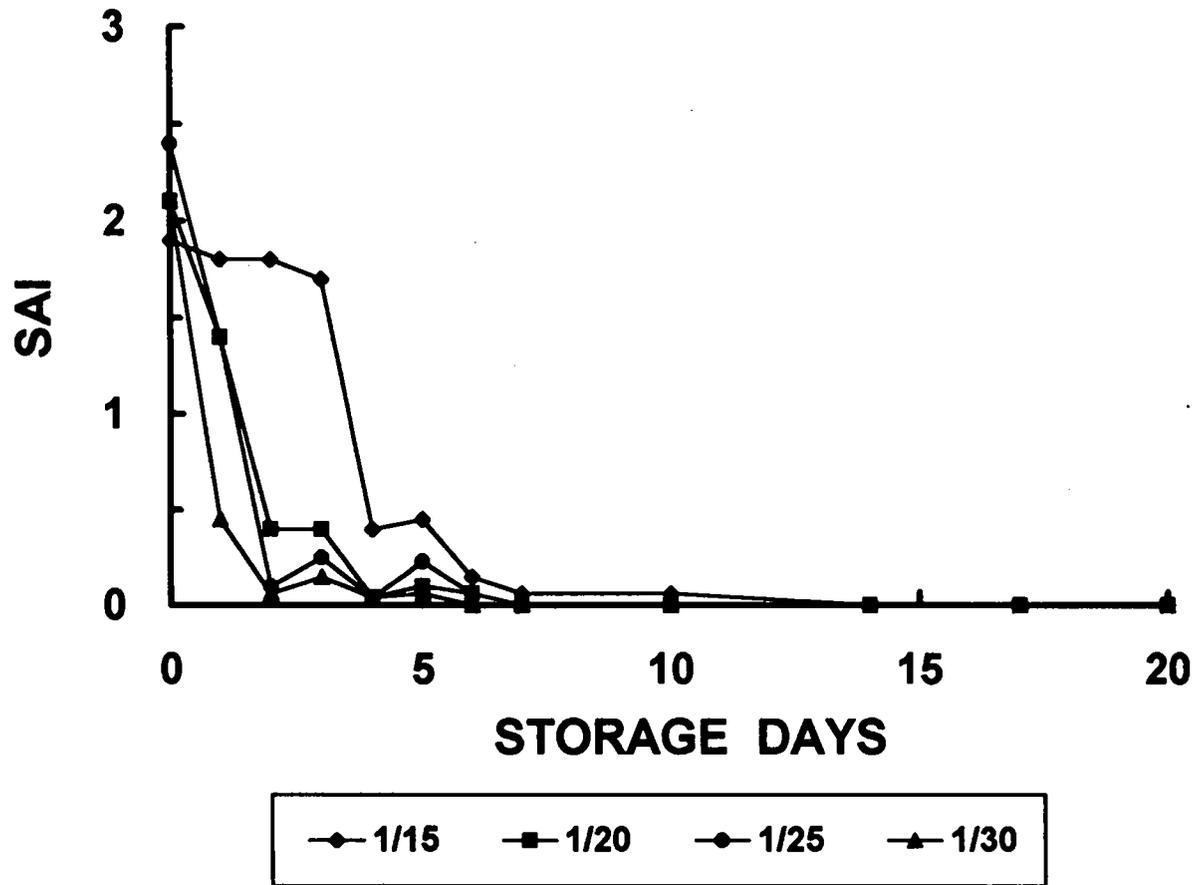


Fig. 28. Continued.

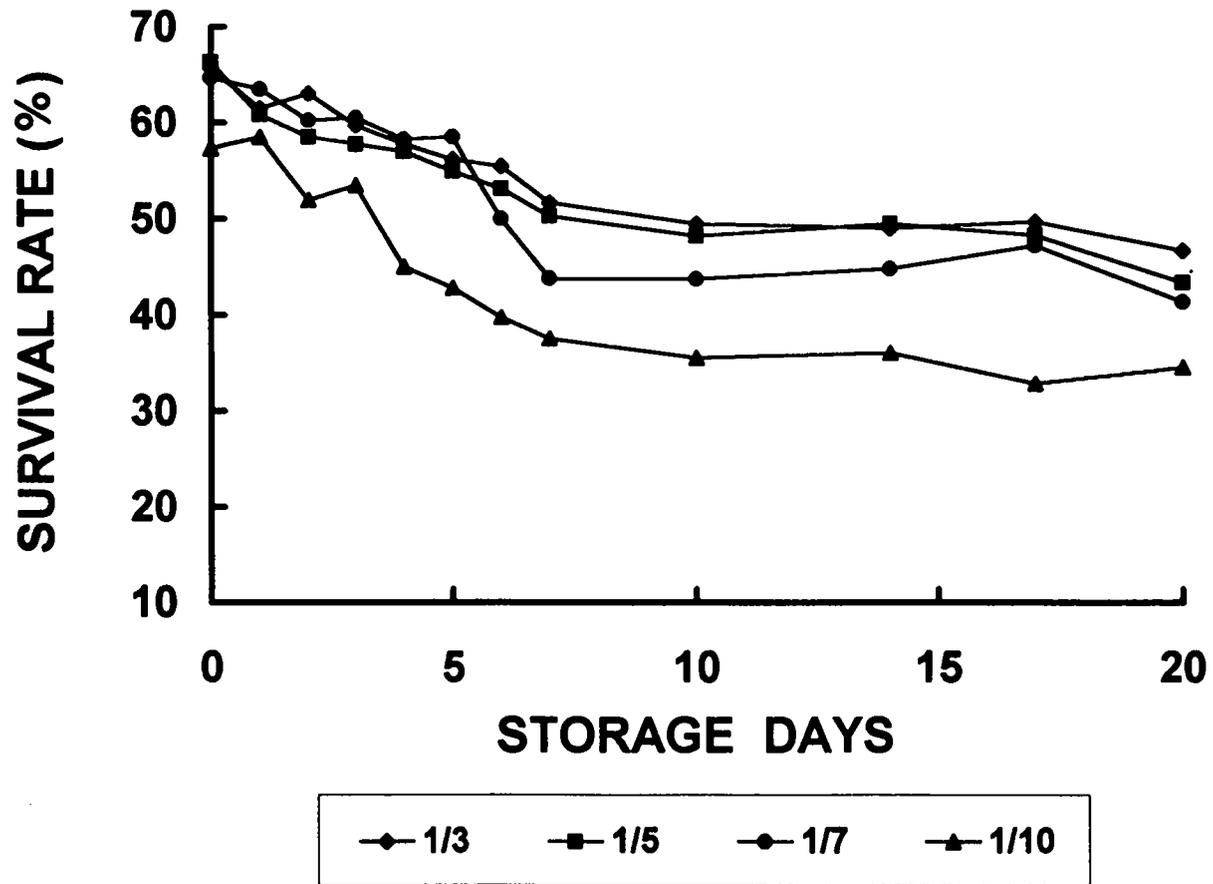


Fig. 29. Variations of survival rate in tiger puffer spermatozoa stored at 0°C during 20 days with different dilution rates in 1% NaCl diluent.

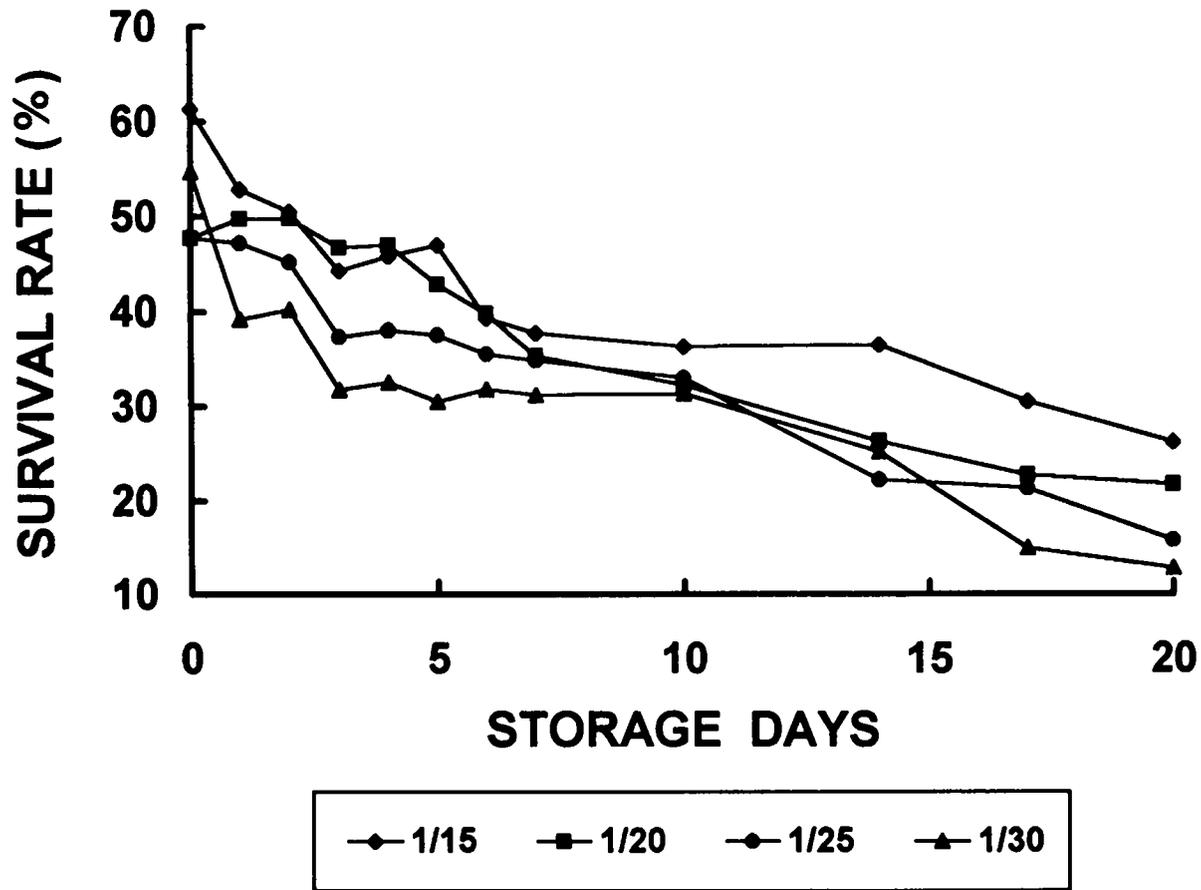


Fig. 29. Continued.

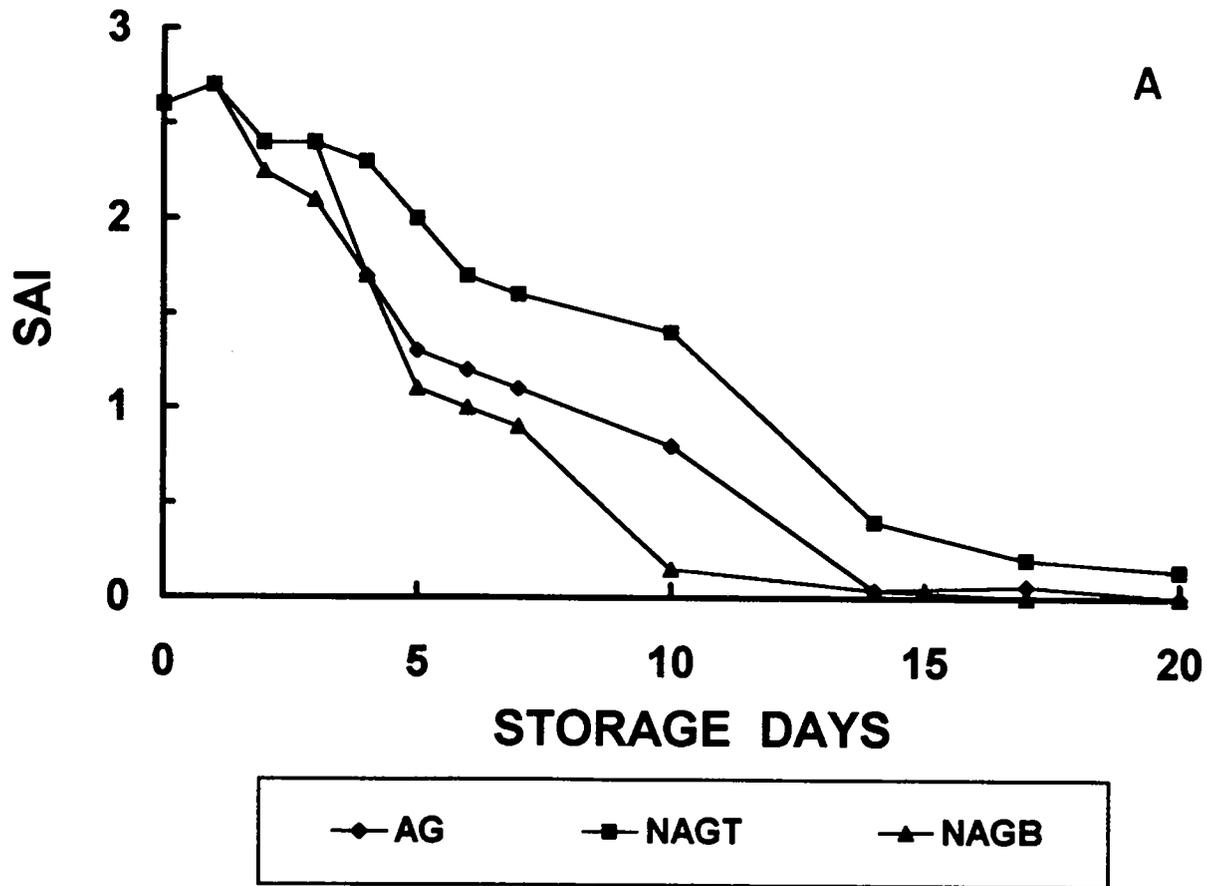


Fig. 30. Variations of sperm activity index (SAI) in spermatozoa stored at 0°C during 20 days at 3, 5 and 7cm depth. A: 3cm, B: 5 cm, C: 7cm. AG: agitation, NAGT: no agitation (Top), NAGB: no agitation (Bottom).

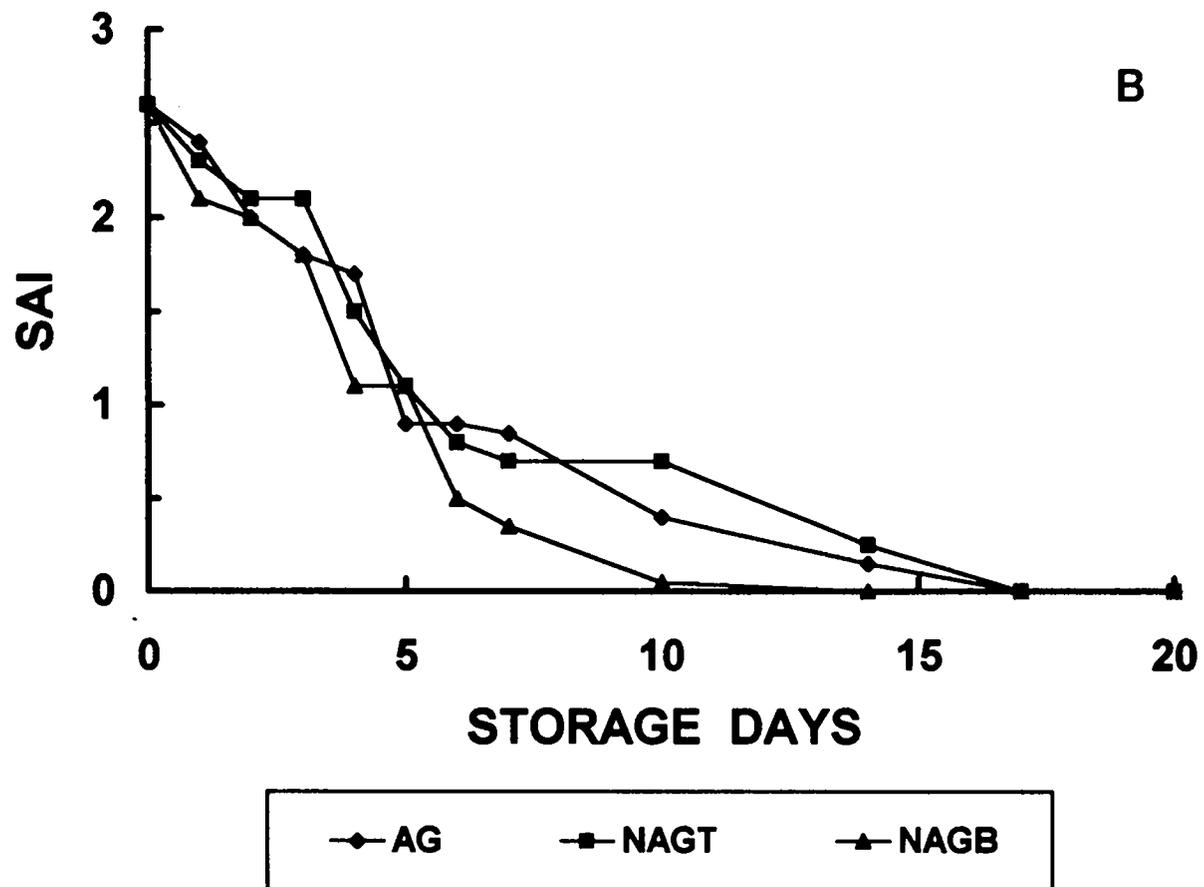


Fig. 30. Continued.

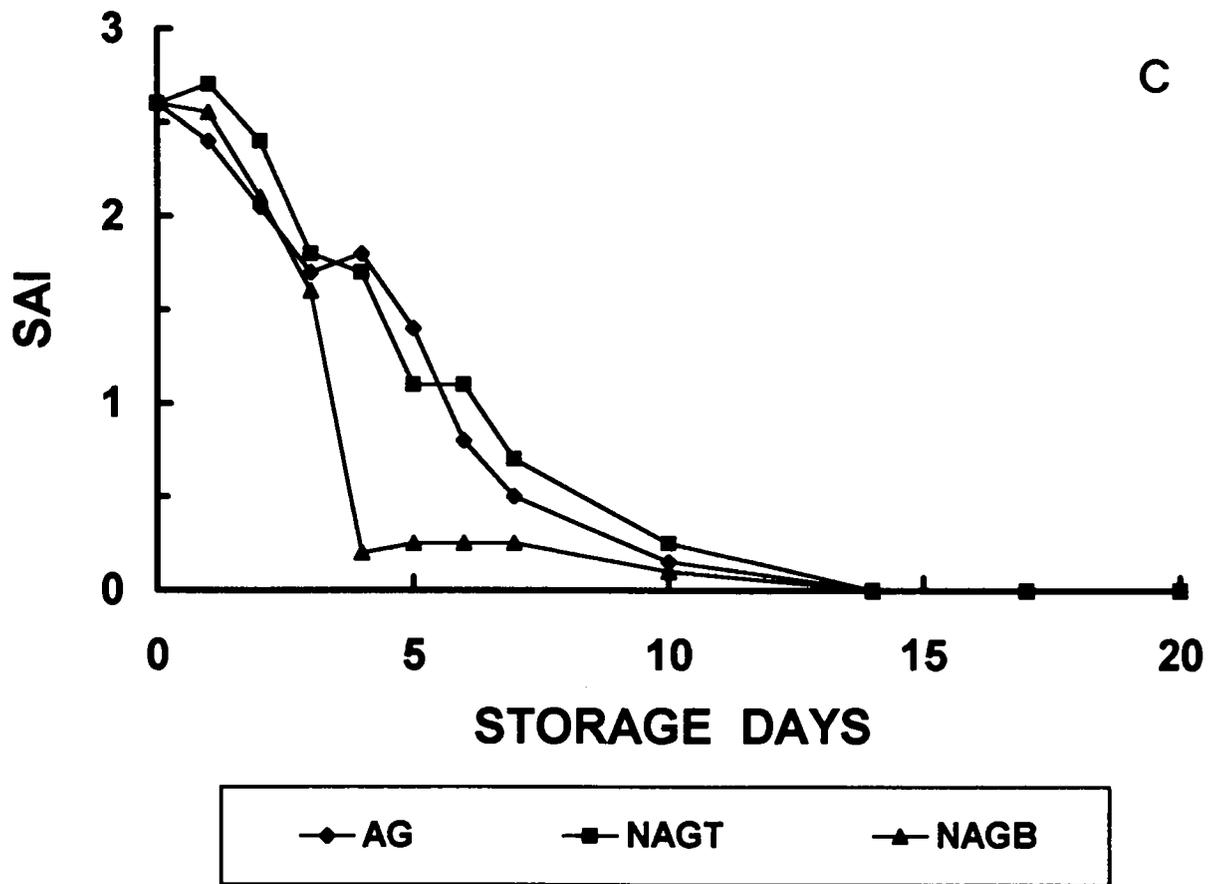


Fig. 30. Continued.

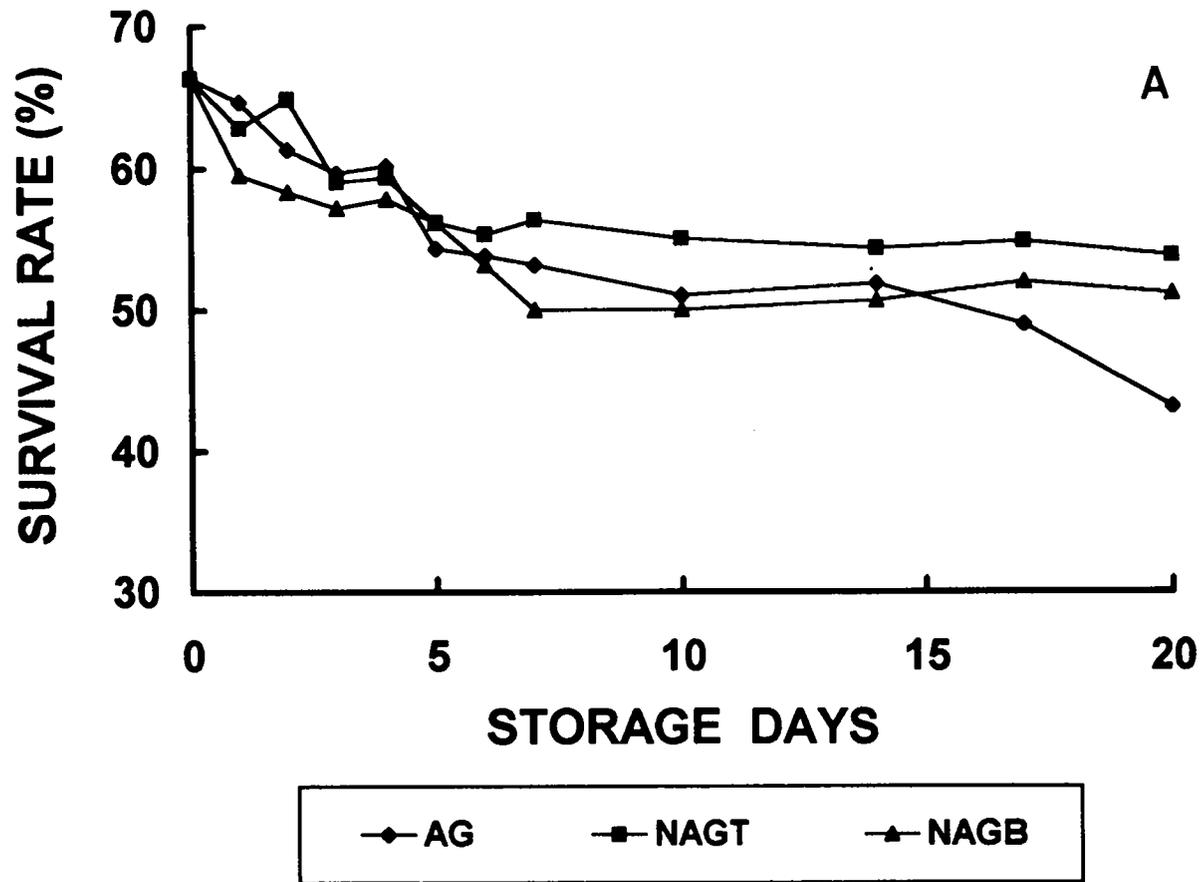


Fig. 31. Variations of survival rate in spermatozoa stored at 0°C during 20 days at 3, 5 and 7cm depth. A: 3cm, B: 5 cm, C: 7cm. AG: agitation, NAGT: no agitation (Top), NAGB: no agitation (Bottom).

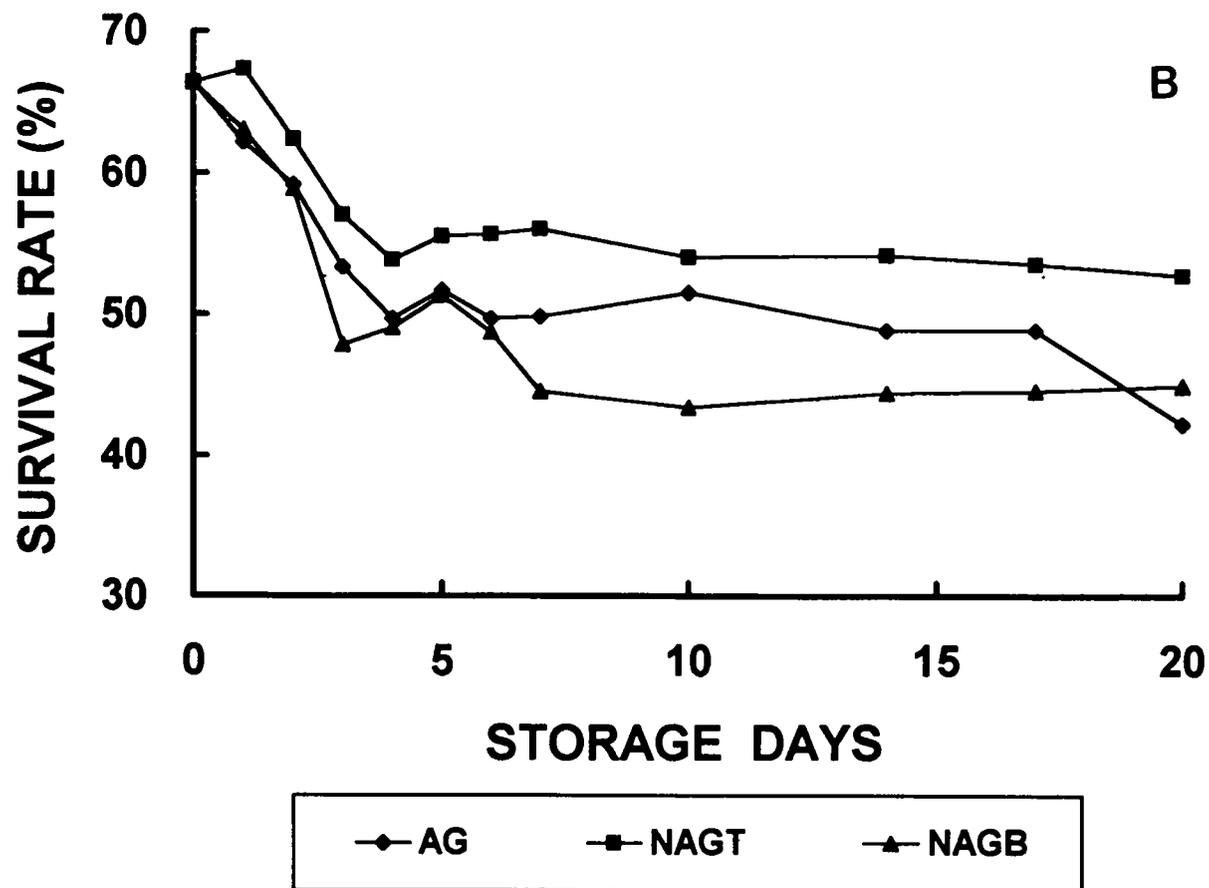


Fig. 31. Continued.

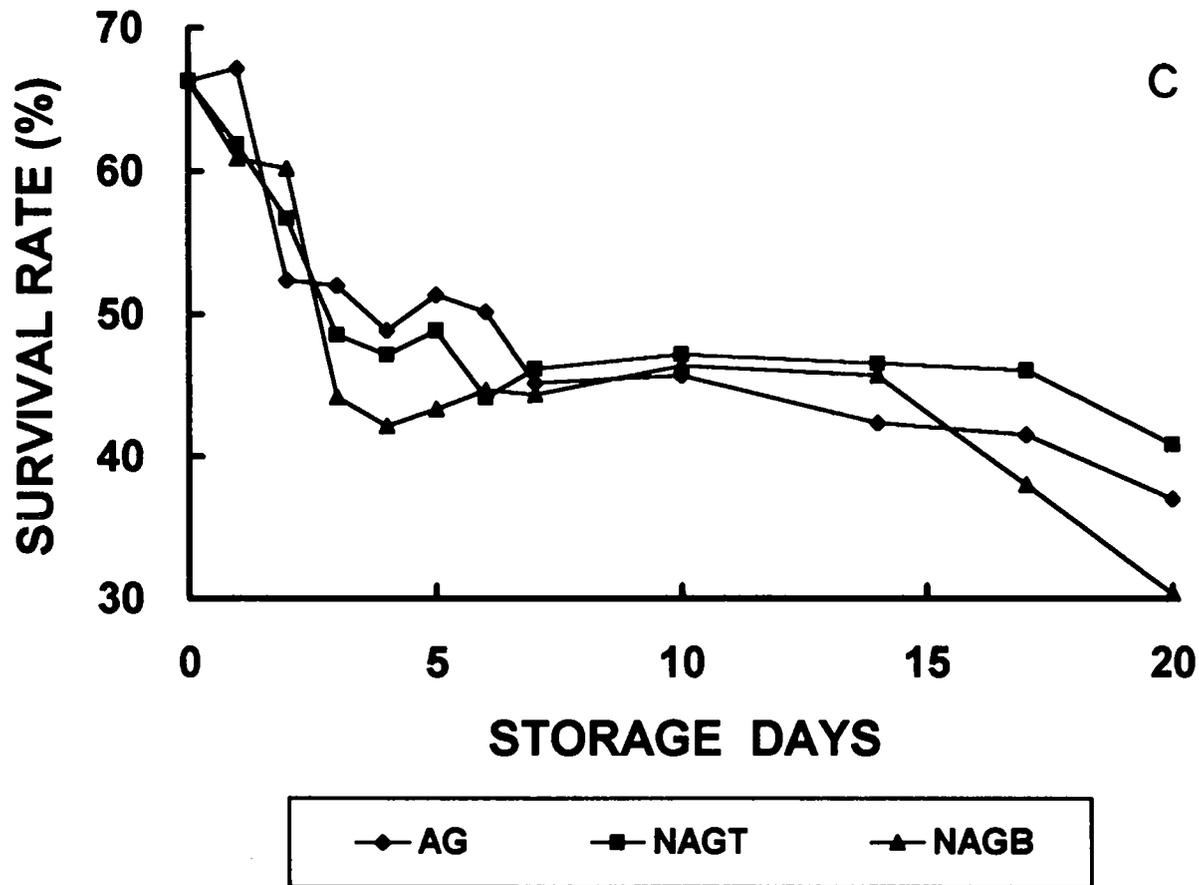


Fig. 31. Continued.

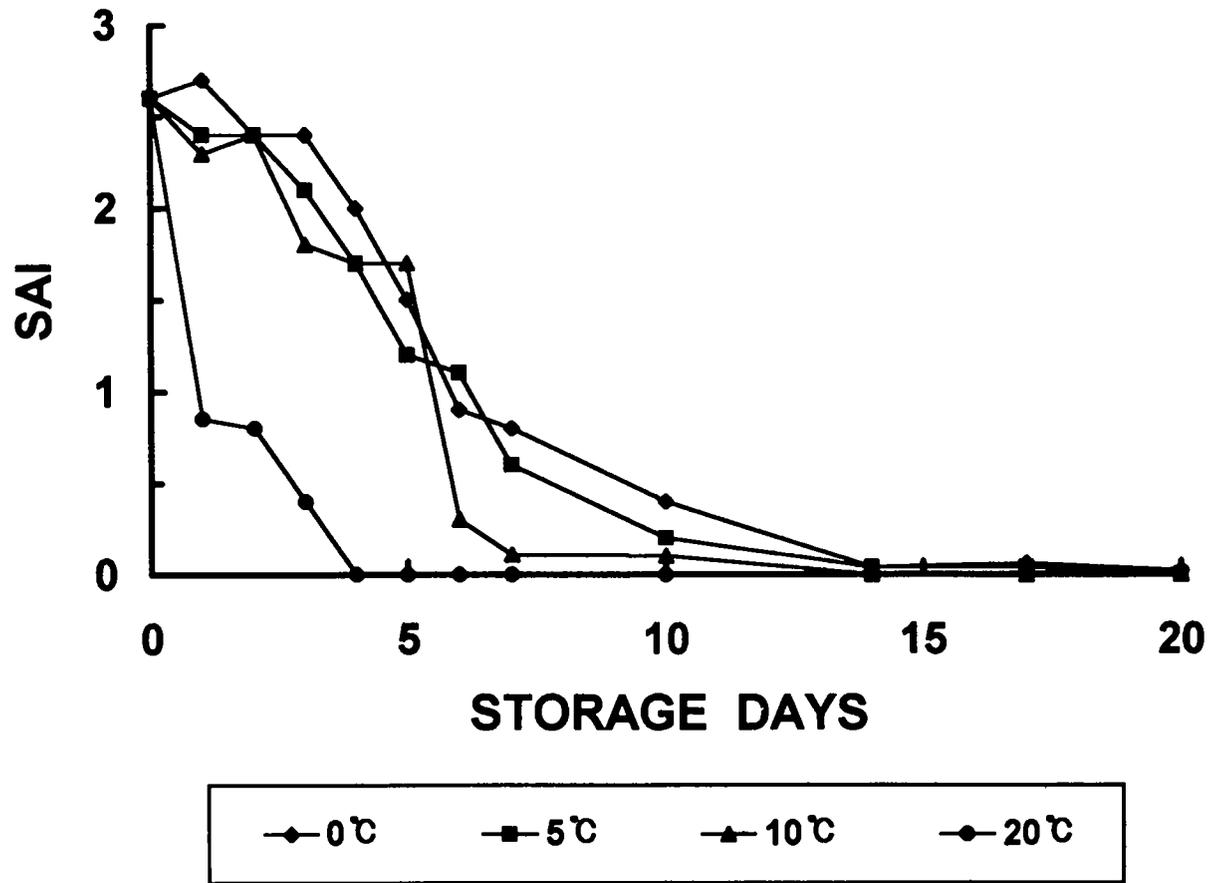


Fig. 32. Variations of sperm activity index (SAI) in spermatozoa stored during 20 days with different storage temperature.

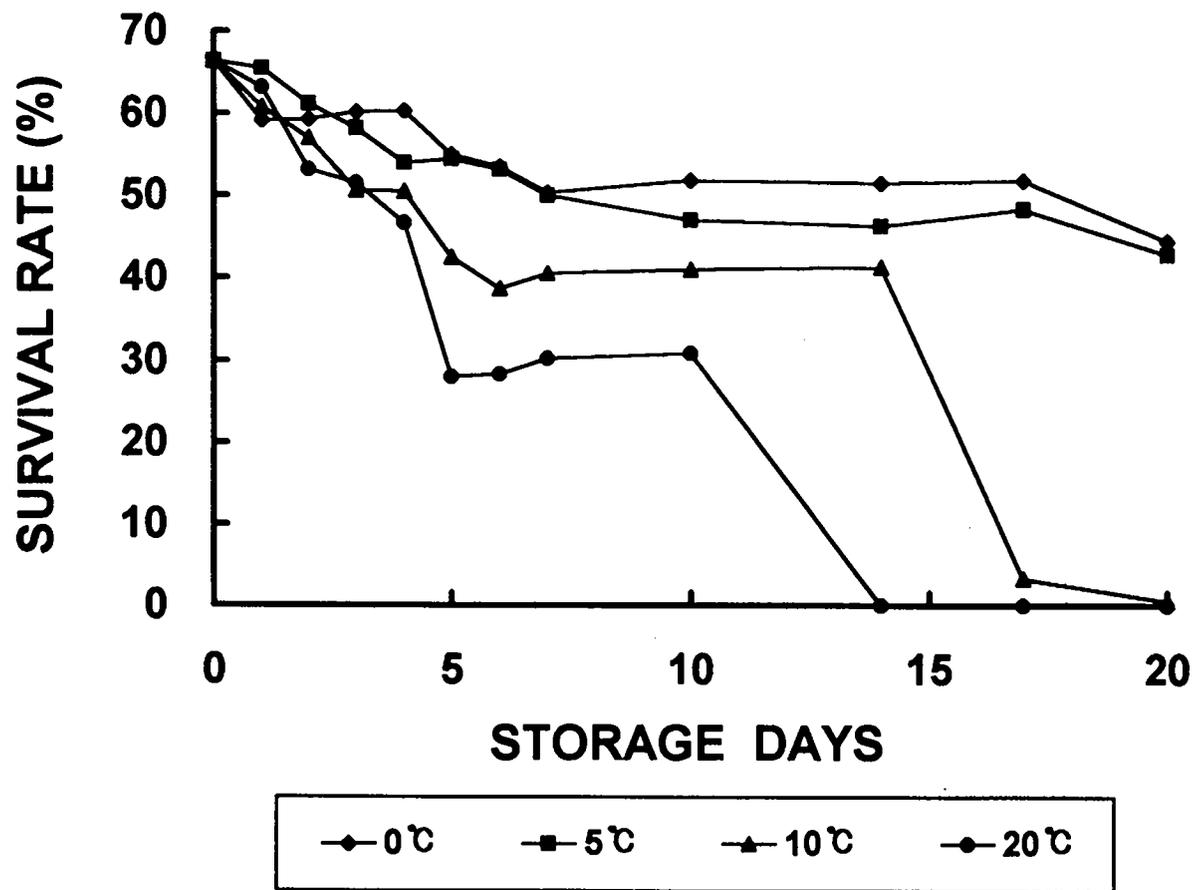


Fig. 33. Variations of survival rate in spermatozoa stored during 20 days with different storage temperature.

그러나 10℃와 20℃에서 보존한 정자의 보존 20일째 생존율은 각각  $0.5 \pm 0.8\%$ ,  $0 \pm 0.0\%$ 로 보존효과가 매우 낮았다.

1% NaCl을 희석액으로 하여 여기에 원정액을 5배 희석한 후, 희석정액의 두께를 3 cm로 하여 항생제인 neomycin과 gentamicin을 농도별로 첨가한 다음, 20일간  $0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 에서 보존하였을 때의 결과는 Figs. 34, 35와 같다. Neomycin 200~1000 ppm의 첨가농도별 SAI는 서로 큰 차이 없이 비슷하였으나, gentamicin에서는 800 ppm 이상에서 보존 1일째부터 SAI가 급격히 낮아지는 경향을 나타냈다 (Figs. 34). 가장 우수한 보존효과를 보인 것은 neomycin 800 ppm구로서, 보존 20일째의 SAI와 생존율은 각각  $0.2 \pm 0.0$ ,  $48.7 \pm 1.6\%$ 로 다른 실험구에 비해 유의하게 높았다( $P < 0.05$ ) (Fig. 35). 항생제를 첨가하지 않았던 대조구의 SAI와 생존율은 800 ppm의 neomycin을 첨가한 것에 비해 낮은 결과를 보였다.

#### 나. 송어

정자의 운동성이 가장 좋았던 송어 혈청을 희석액으로 하여, 희석액의 pH를 달리한 후 보존하였을 때의 SAI는 Fig. 36과 같다. 보존 후 1일 이내에 pH 6에서는 SAI가 급격히 낮아졌고, pH 5에서는 희석할 때부터 정자의 활성이 매우 낮았다. pH 7~9에서는 보존 10일째에 까지 SAI가 0.8로 유지됨으로써 정장의 pH와 유사한 약 알카리 용액에서 정자활성이 오래 유지되었다.

#### 다. 감성돔

정자의 생존율과 수정률이 가장 높았던 감성돔 혈청을 희석액으로 하여, 희석액의 pH를 달리한 후 보존하였을 때의 SAI는 보존 8일째까지는 pH 7과 8에서 높았다. 특히 pH 7~9에서는 보존 9일째에 SAI가 0으로 낮아진 반면, pH 5와 6

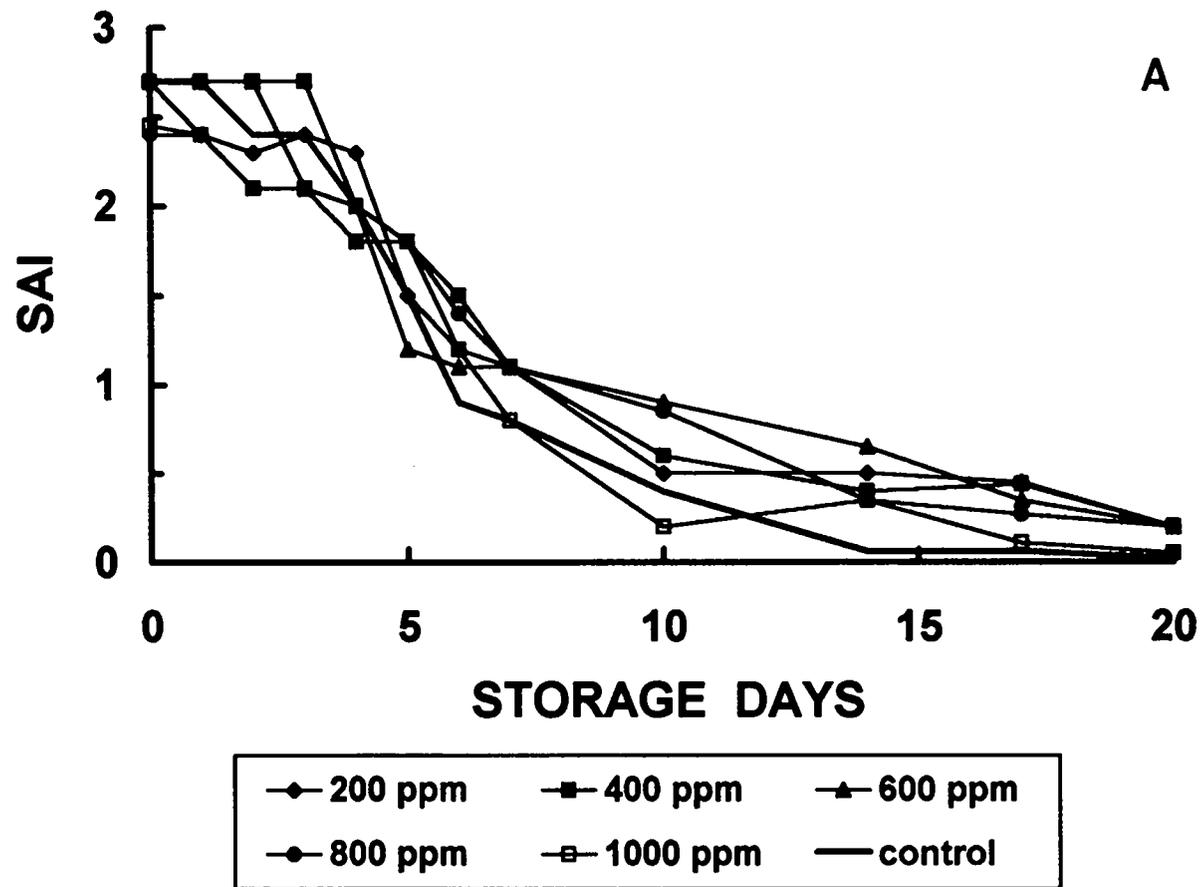


Fig. 34. Variations of sperm activity index (SAI) in tiger puffer spermatozoa stored at 0°C during 20 days with two antibiotic of different concentrations. A: neomycin  
B: gentamicin.

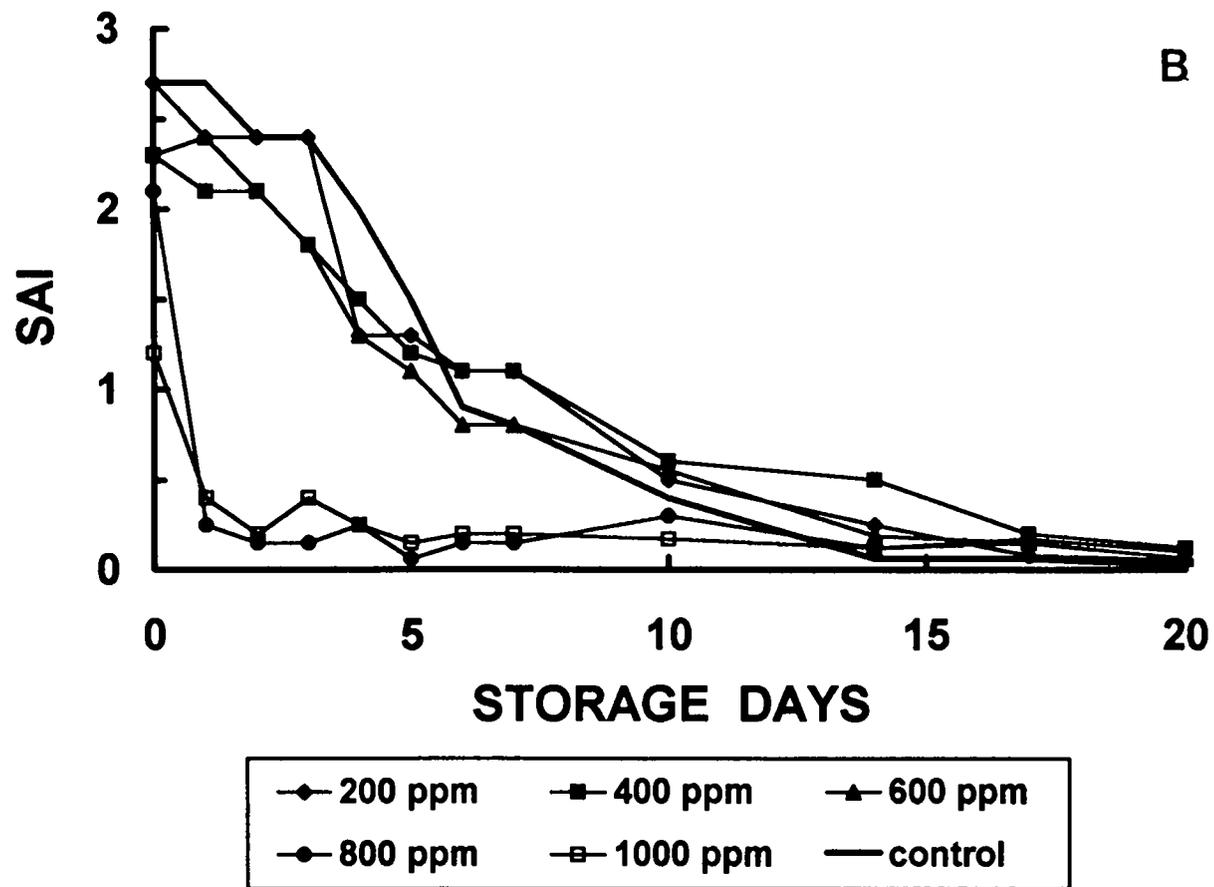


Fig. 34. Continued.

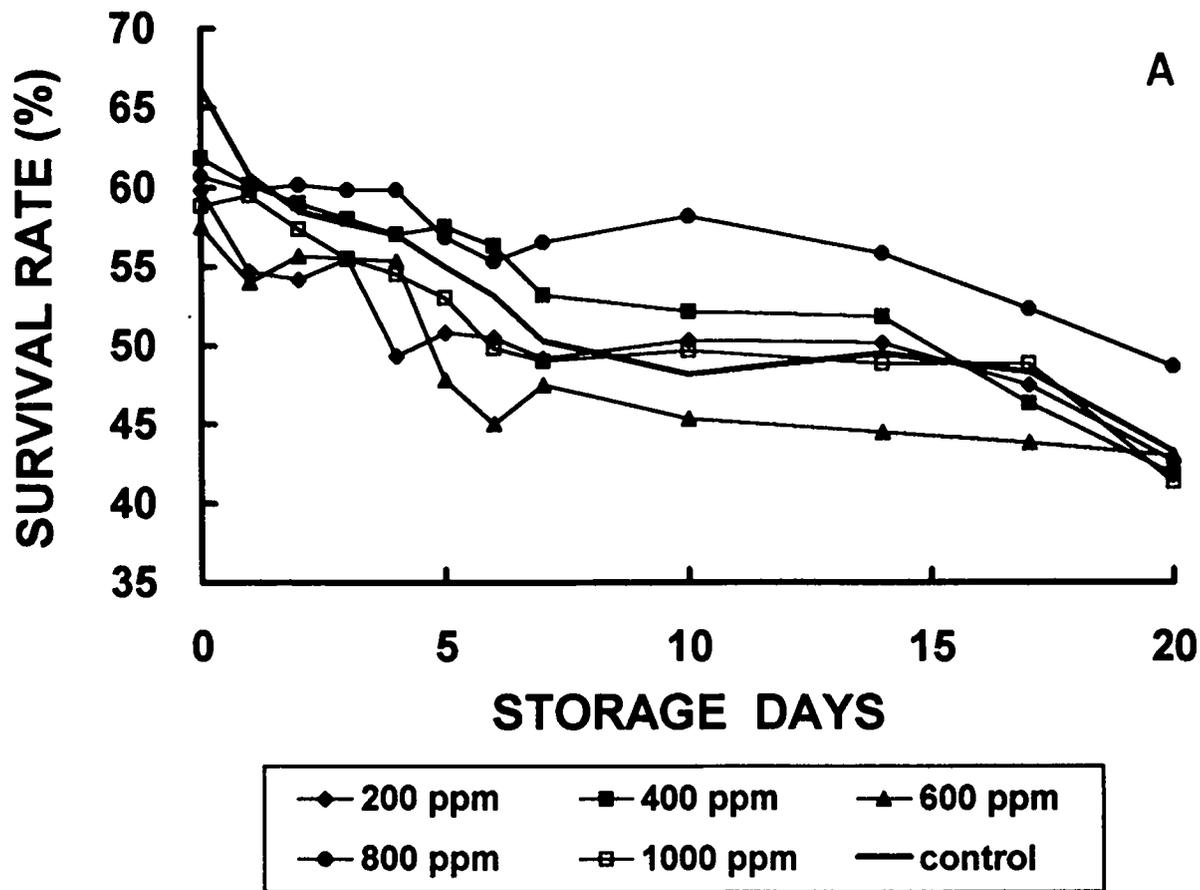


Fig. 35. Variations of survival rate in tiger puffer spermatozoa stored at 0°C during 20 days with two antibiotic of different concentrations. A: neomycin, B: gentamicin.

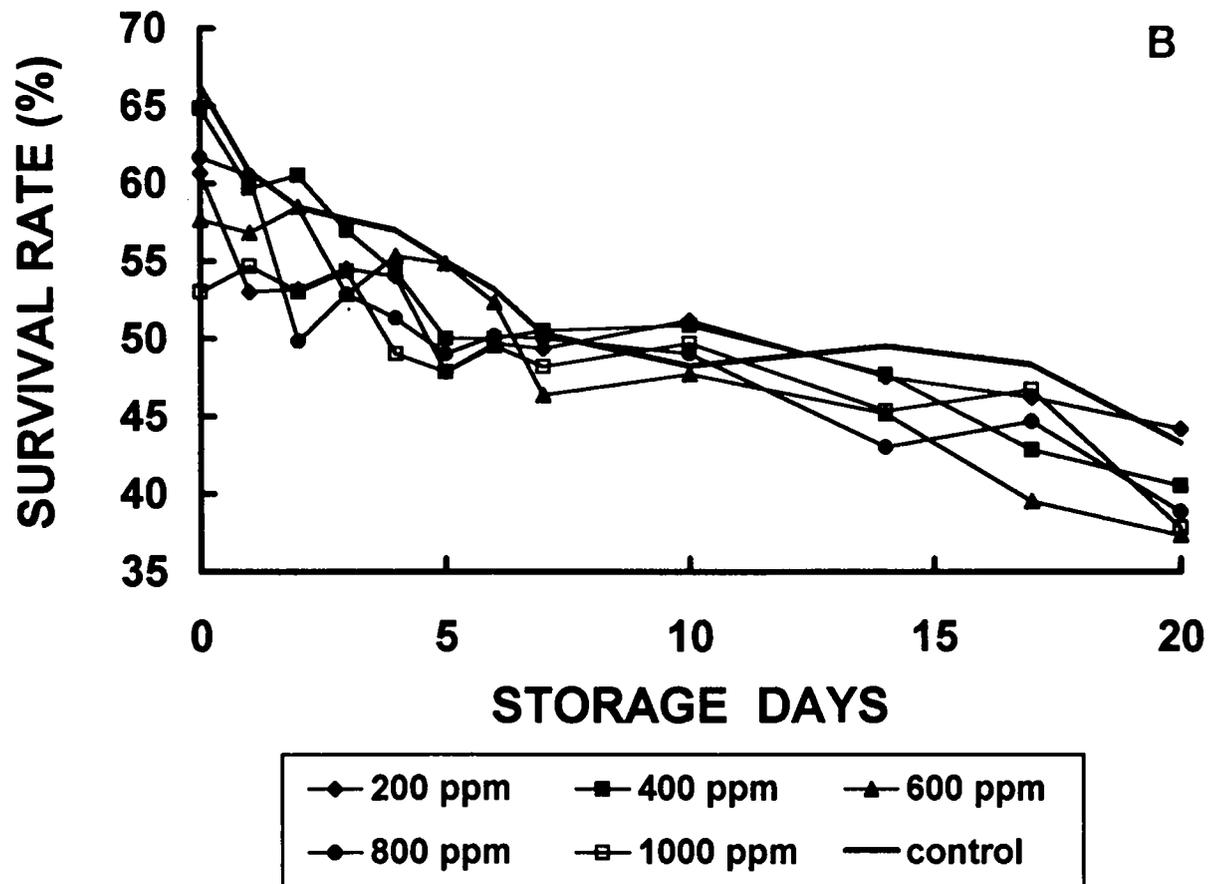


Fig. 35. Continued.

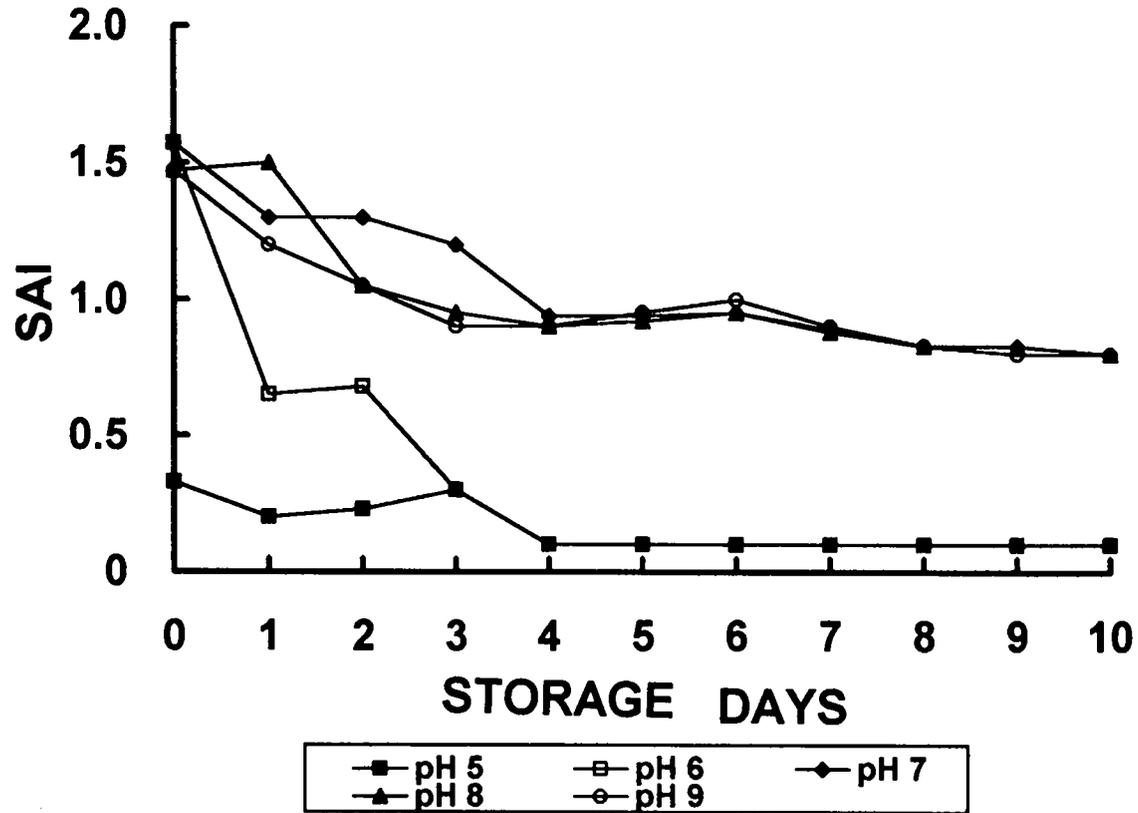


Fig. 36. Variation of sperm activity index (SAI) in grey mullet sperm stored at 0°C with several pH conditions. FM: fresh milt.

의 산성 희석액에서는 정액의 희석과 동시에 SAI가 급격히 감소하여 보존 3일 이내에 0이 됨으로써, 정장에서와 같은 pH 수준에서 보존효과가 좋음을 알 수 있었다(Fig. 37).

한편, 5% glucose를 섞은 희석액에 3종의 항생제를 농도별로 첨가하여 0℃에서 보존하였을 때, 보존기간에 따른 SAI를 조사한 결과는 Fig. 38과 같다. 보존 5일째까지의 SAI는 항생제를 첨가하지 않았던 대조구에서 항생제를 첨가한 희석정액보다 높았다. 그러나 항생제를 첨가한 실험구에서는 보존 직후 및 1일째 사이에 급격히 낮아졌던 SAI가 그 이후 0.8 전후로 유지되어 9일째까지 이어졌으며, 5일 이후부터는 대조구에 비해 높은 SAI를 나타냈다.

이상의 조건에서 3종의 항생제를 농도별로 10일 동안 보존했을 때 정자의 생존율은 neomycin 800 ppm 처리구에서 65.6%로 가장 높았으며, gentamicin과 chlorotetracycline에서도 800 ppm 처리구가 각각 62.4%, 51.8%로 생존율이 가장 높았다. 항생제별로는 neomycin이 가장 생존율이 높았으며, 다음이 gentamicin과 chlorotetracycline 순이었다(Fig. 39).

## 제4절 고찰

어류정자의 냉장보존에 영향을 미치는 주요 요인으로는 희석액, 희석비율, agitation, 항생제 및 보존온도 등이 있다. 이 가운데 적절한 희석액을 결정하는 것은 냉장보존의 효과를 높이기 위해 선결되어야 할 요건이다. 어종에 따라 다양한 종류의 희석액이 이용되어지고 있는데(Chao et al. 1975; Hara et al. 1982; Scott and Baynes 1980; Truscott et al. 1968), 각종의 희석액들이 갖추어야 할 가장 중요한

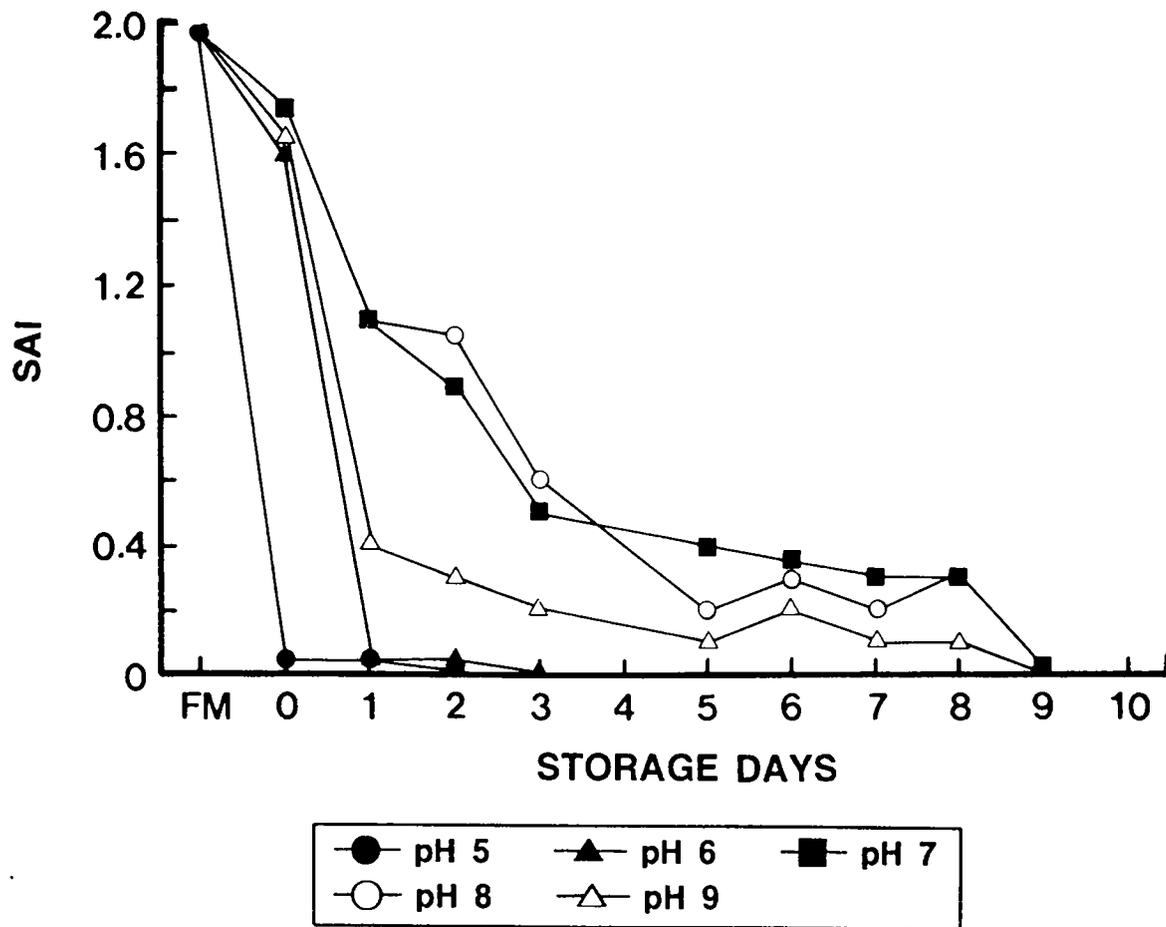


Fig. 37. Variation of sperm activity index (SAI) in black seabream spermatozoa stored at 0°C with several pH conditions. FM: fresh milt.

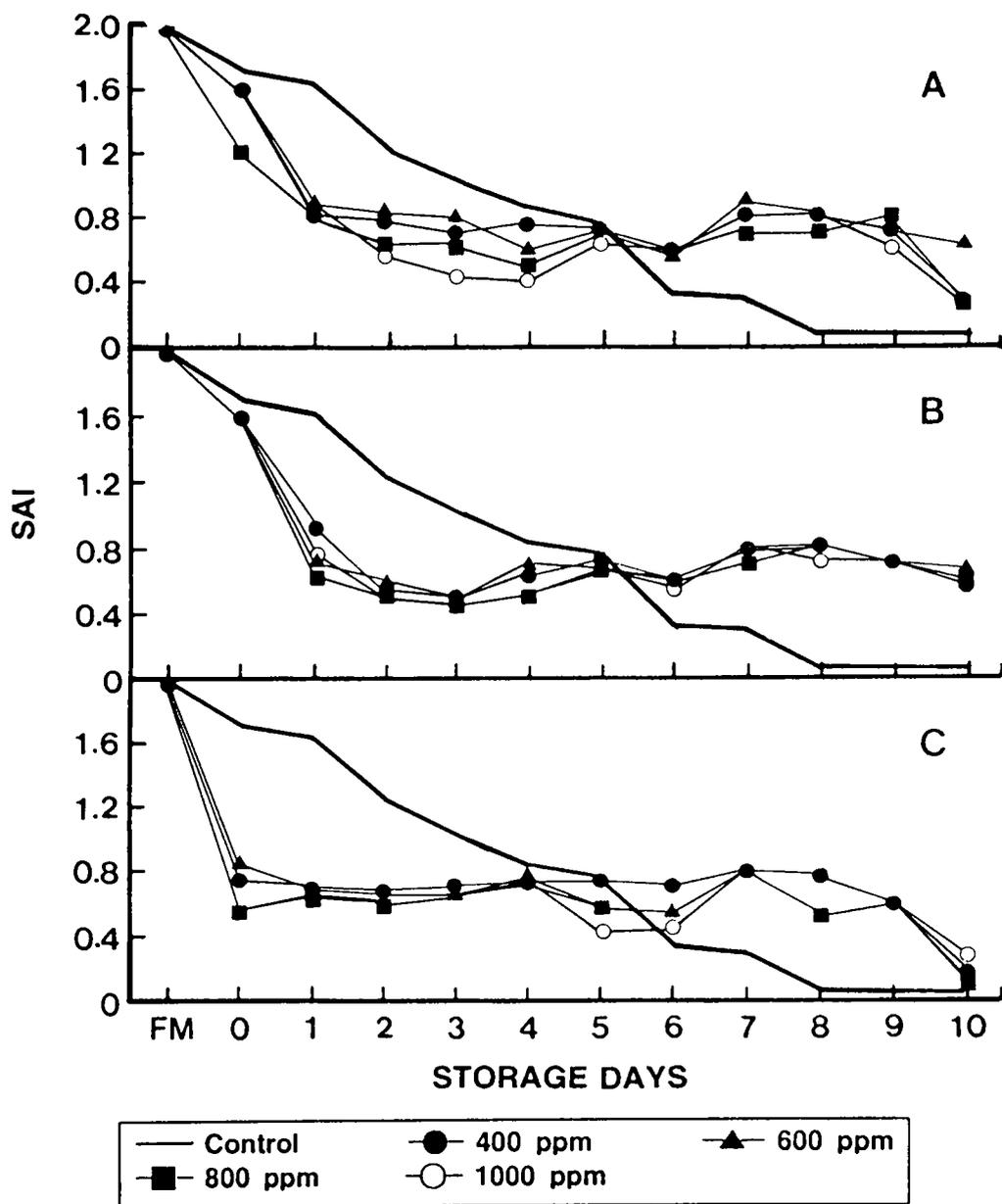


Fig. 38. Variation of sperm activity index (SAI) in black seabream spermatozoa stored at 0°C with three antibiotic. FM: fresh milt. A: neomycin, B: gentamicin, C: chlorotetracycline.

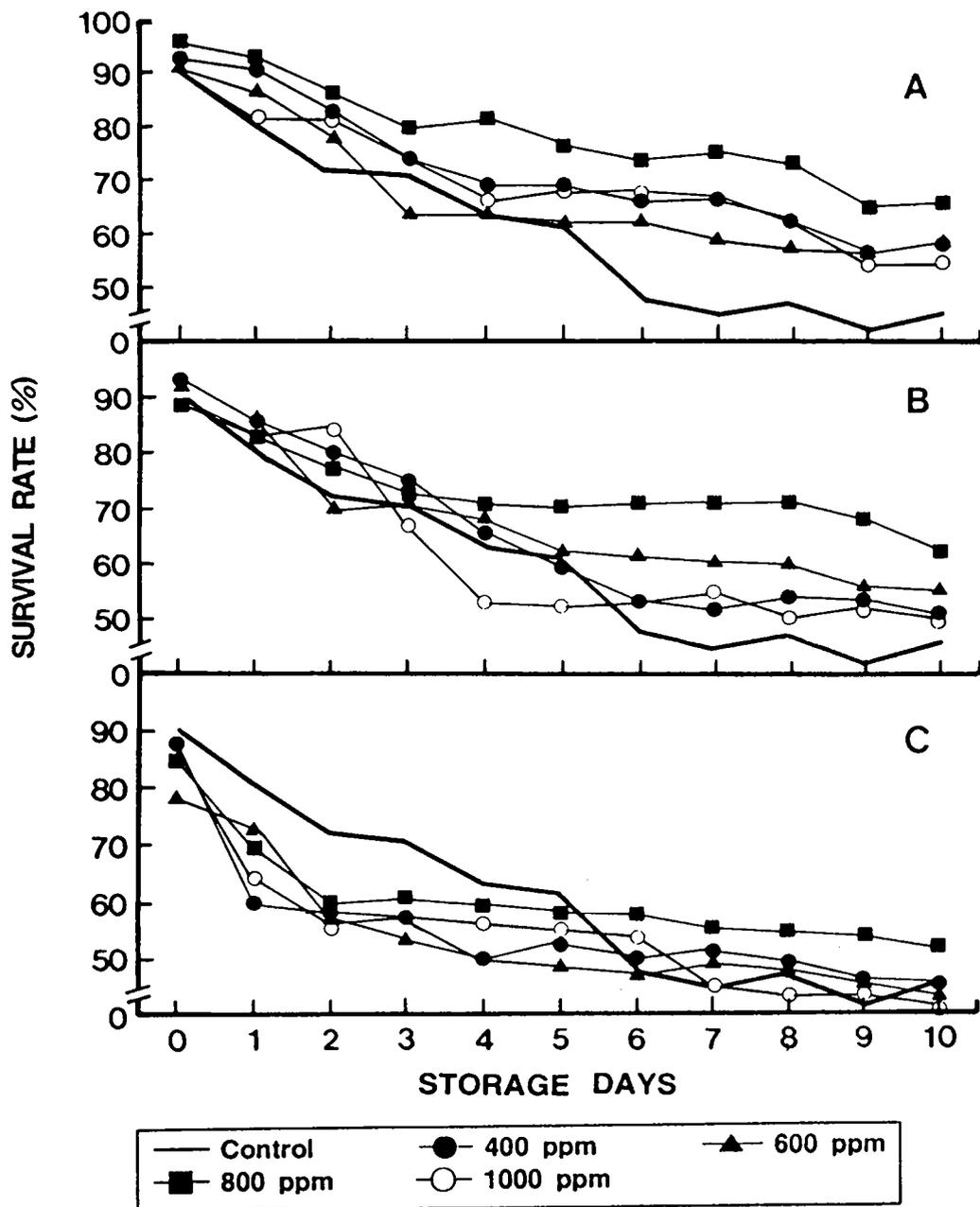


Fig. 39. Variation of survival rate in black seabream spermatozoa stored at 0°C with three antibiotic. A: neomycin, B: gentamicin, C: chlorotetracycline.

요건은 회석 후에도 정자가 운동하지 않도록 하여 운동에 필요한 에너지가 소비되는 것을 효과적으로 억제시키는 데에 있다(Ohta and Izawa 1996). 자주복 정자의 냉장보존을 위한 적정 회석액을 결정하는 실험에서는 MFRS와 1% NaCl이 적절한 회석액인 것으로 나타났고, 황복에서는 0.3 M glucose가 효과가 있었으며, 송어와 감성돔에서는 각각 동일 어종의 혈청을 사용하였을 때, 냉장보존 효과가 좋았다. Hara et al.(1982)은 milkfish, *Chanos chanos*의 정자를 0~4℃에서 보존하였을 때, 동종의 혈청이 다른 회석액들 보다 뛰어난 보존효과를 보였다고 하였다.

Chao et al.(1975)은 송어의 운동성을 유지하는 데에 있어 6, 10 및 12%의 sodium citrate가 좋은 회석액이라고 보고하였다. 이 처럼 냉장보존에 있어 적절한 회석액의 종류는 어종에 따라 차이가 있으므로, 정자의 운동을 억제시킬 수 있고 삼투질농도나 이온조성이 정장과 유사한 회석액을 선택하여 사용함으로써 보존효과를 높일 수 있을 것으로 생각된다.

자주복 정자의 냉장보존에서 적정 회석비율은 3~5배로서 bluefin tuna의 정자를 낮은 비율(3배)로 회석할수록 운동성과 수정률이 높다는 Doi et al.(1982)의 결과와 일치한다. Erdahl and Graham(1987)은 회석비율이 높으면 정자의 운동이 개시되어 보존효과가 떨어진다는 dilution effect를 제시하였다.

냉장보존시 정액을 agitation 하지 않는 것이 정자의 운동성이나 생존율을 연장시키는 데에 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Stoss et al. 1978; Stoss and Holtz 1983a; Stoss et al. 1987). Stoss et al.(1978)은 계속적으로 반복된 agitation은 정자에게 해롭다고 하였으며, Stoss et al.(1987)은 좁은 표면적으로 정액층을 두껍게 보존할 때, agitation에 의해 저층의 정자가 액층표면으로 올라오는 것은 다른 정자의 운동성을 저해시킨다고 보고하였다. 자주복의 냉장보존에서도 agitation을 하지 않는 것이 좋은 것으로 나타나 Stoss et al.(1987)의 결과들과 일치하였다. 더

육이 그들은 냉장보존시 상층부에 분포하여 산소와 접할 수 있는 정자들은 저층에 보존된 정자에 비해 운동성이 높다고 하였다(Stoss et al. 1987). 또한 무지개송어에서도 ml당 정자수가 많은 어종( $5 \times 10^9 \sim 20 \times 10^9$ )의 정자를 보존할 때, 표면적은 넓게, 보존두께는 얇게 하면, 산소와의 접촉이 쉬워져 정자가 활발하게 대사물질을 소비해 버리므로 보존기간이 짧아진다고 하였다. 자주복에서도 냉장보존시 상층부에 분포하는 정자가 하층부에 분포하는 정자 보다 운동성과 생존율이 높았다. 따라서 ml당 정자의 수가 많은 자주복( $8.5 \times 10^{10} \sim 10.1 \times 10^{10}$  sperm) 정자의 냉장보존시에는 적합한 보존두께에서 표면적이 좁은 상태로 agitation하지 않으면서 보존하는 것이 좋을 것으로 생각된다.

냉장보존시 희석액에 항생제를 첨가하는 것은 채정시 혼입된 세균의 성장을 억제시켜(Stoss and Refstie 1983), 정자의 운동성이나 생존을 뿐만 아니라 수정률을 높이는 데에 도움이 된다(Chao et al. 1992; Saad et al. 1988; Stoss et al. 1978). 그러나 Stoss et al.(1978)은 적정 농도의 항생제 첨가가 정자의 보존기간을 연장시키지만, 고농도일 때는 역효과가 나타난다고 하였다. 또한 Chao et al.(1992)은 grouper, *Epinephelus malabaricus*의 정자보존시 penicillin이나 neomycin에 비해 500 ppm의 streptomycin을 사용하였을 때 수정률이 높아짐으로써, 항생제의 종류 뿐만 아니라 항생제의 농도에 따라서도 보존효과에 차이가 있음을 강조하였다. 이 연구에서도 gentamicin에 비해 neomycin이 정자의 SAI와 정자의 생존율을 높게 하였다. 이와 같이 정자의 냉장보존시 어종에 따른 적합한 항생제의 종류와 농도가 다르므로 이를 충분히 고려하여 항생제를 선택하는 것이 중요하다. 이 연구에서 neomycin 800 ppm이 자주복과 감성돔의 냉장보존시 정자의 생존율을 연장시키기 위한 적합한 농도의 항생제였다.

Stoss and Holtz(1983a)는 저온( $0^\circ\text{C}$ )이 정자의 대사를 감소시켜 보존기간을 연

장시키는 데에 중요한 역할을 한다고 하였다. 자주복에서도 0~5℃에 정자를 보존했을 때 정자의 활력이 비교적 오래 지속되었다.

여 백

## 제4장 냉동(장기) 보존

### 제1절 서설

어류정자의 보존은 양식 대상 어류의 방란·방정시기의 불일치 때문에 발생하는 문제나 성비의 차이에 따른 채란과 채정의 어려움을 해결할 수 있게 한다. 그리고 수컷 친어의 사육관리에 필요한 경비 및 노력을 절약할 수 있게 할 뿐만 아니라, 우량종의 선택교배를 가능하게 하고 우량종이나 재래종의 보존을 용이하게 한다. 이와 같이 어류의 정자보존 기술이 축산업에서 처럼 많은 장점을 가지고 있고, 세계적으로도 많은 나라에서 기술개발에 주력하고 있음에도 불구하고, 우리나라에서는 아직 이 분야에 관한 기초 연구조차 이루어지지 않고 있다. 그러므로 이미 의학이나 축산학 분야에서 활용되고 있는 것처럼 해산어류의 정자보존을 위한 정자의 기초 생리활성 요인에 관한 연구와 실제 종묘생산시 효과적으로 활용할 수 있는 기반기술의 확보가 우선되어야 할 것이다.

어류정자의 냉동(장기)보존에 관한 연구는 Blaxter(1953)의 연구를 효시로 하여 현재까지 많은 연구들이 있었고, 아직도 연구가 활발하게 진행되고 있다. 그러나 냉동보존에 관한 지금까지의 연구는 대부분 담수어류(黒倉 1984; Kurokura et al. 1984)와 연어류(Baynes and Scott 1987; Ott and Horton 1971; Stoss and Holtz 1983b; Yamamoto 1976)를 위주로 하여 정액의 성상과 냉동보존 방법을 구명한 사례였으며, 그 성과를 해산 어류를 포함한 다양한 어종에 응용한 비교연구는 드물다.

따라서 이 연구에서는 산업적으로 유용한 어류인 복어류와 송어 및 감성돔을

대상으로 정자를 장기간 보존할 수 있는 냉동보존 방법을 개발하여, 어류의 인공 종묘 생산시 정자보존 기술에 관한 기초자료를 제공하고자 하였다.

## 제2절 재료 및 방법

### 1. 정자의 냉동과 해동방법

다음의 각 실험에서 정자를 냉동시키기 위하여, 희석정액이 주입된 0.5 ml 용량의 straw를 액체질소 증기(-76℃)에 의해 천천히 1차 냉동한 다음, 신속히 액체질소(-196℃)에서 넣어 2차 냉동하였다(奥村·廣瀬 1991). 다음의 각 실험에서 냉동된 정자는 액체질소 탱크에 1일간 저장한 후 30±1℃의 항온수조에서 10초 이내에 해동시켜 운동성과 생존율을 평가하였다.

### 2. 냉동처리가 정액성상에 미치는 영향

#### 가. 냉동보존한 정자의 화학적 조성변화와 생존율

냉동보존 하였던 정액을 해동한 후 원심분리하여 얻은 정자와 정장의 총 단백질, 총 지질 및 glucose 함량은 각각 biuret 반응법, 비색정량법, 효소법으로, Na 및 K 농도는 불꽃 분광광도법으로 분석하였다(由岐 1984).

#### 나. 정자의 물리적 손상

냉동보존 후 해동한 정자의 미세구조를 관찰하기 위하여 전술한 방법에 따라

투과형 전자현미경 시료를 제작하였다. 정자 두부의 핵과 세포막을 중심으로 관찰하여 정자가 동해를 받는지 여부를 파악하였다.

### 3. 동해방지제

#### 가. 자주복

##### 1) 적정 희석액과 동해방지제의 평가

정자의 냉동보존에 적합한 희석액을 결정하고 동해방지제의 정자활성에 미치는 영향을 평가하기 위하여, Alsever's solution, Cortland medium, egg-tris, 0.5 M fructose, 0.3 M glucose, Mounib's solution, MFRS, 1% NaCl, sodium chloride medium, 3.6% sodium citrate 및 2.8% sucrose 등의 11가지 희석액을 정액과 5:1의 비율로 섞은 후, 여기에 DMSO, ethylene glycol, glycerol 및 methanol 등의 4가지 투과성 동해방지제를 최종농도가 15%로 되도록 혼합하였다. 혼합 직후 정자의 운동개시 여부와 자연해수로 활성화시킨 정자의 운동성을 조사하였다. 또한 이것을  $0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 로 유지되는 incubator에서 1일간 보존하여 적절한 희석액을 파악하고 동해방지제가 정자활성에 미치는 영향을 평가하였다. 냉동보존 실험에 사용한 희석액의 조성은 냉장보존에 사용한 것과 동일한 조성이었다 (Table 12).

##### 2) 적정 동해방지제의 종류와 농도

냉동보존에 적합한 동해방지제의 종류와 농도를 결정하기 위하여, 적정 희석액을 결정하는 실험에서 좋은 결과를 보였던 Alsever's solution과 MFRS를 희석액으로 하여 정액과 5:1의 비율로 섞은 후, 여기에 투과성 동해방지제인 DMSO,

ethylene glycol, glycerol 및 methanol을 혼합하였다. 이때 각 동해방지제는 최종 농도가 각각 5, 10, 15, 20%로 되도록 2개의 희석액과 혼합하였으며 20초 이내의 평형시간을 둔 후 냉동하였다.

### 3) 평형시간에 따른 보존효과

평형시간에 따른 냉동보존 효과를 알아보기 위하여, 희석액으로는 Alsever's solution을 사용하여 정액과 5:1의 비율로 섞은 후, 여기에 동해방지제인 DMSO, ethylene glycol, glycerol 및 methanol을 혼합하였다. 이때 동해방지제의 최종농도는 각각 5, 10, 15, 20%로 되게 하였다. 평형시간은 각각 0, 1, 5, 10, 20, 40, 60분으로 설정하여 정자를 냉동하였다.

### 4) Bovine serum albumin(BSA)과 계란난황의 첨가효과

비투과성 동해방지제인 BSA와 계란난황이 투과성 동해방지제의 효과를 상승시키는지 알아보기 위하여, 희석액으로 Alsever's solution을, 동해방지제로 15% ethylene glycol을 사용하였으며, BSA와 계란난황의 최종농도를 5%가 되도록 하여 실험하였다. 정액:희석액:동해방지제:BSA 또는 계란난황을 0.14:0.69:0.12:0.05의 비율로 혼합하고 20초 이내의 평형시간을 둔 후 냉동하였다.

## 나. 황복

### 1) 적정 희석액

희석액에 따른 정자의 냉동보존 효과를 조사하기 위한 실험에서는 egg-tris, 5% glucose, Alsever's solution 및 MFRS를 희석액으로 사용하였고, 동해방지제로는 DMSO를 사용하였다. 희석은 정액:희석액:DMSO가 0.2:0.65:0.15의

비율이 되도록 하였으며 평형시간은 1분 이내로 하였다.

## 2) 적정 동해방지제의 종류와 농도

동해방지제의 종류와 농도별 실험에서는 5% glucose에 DMSO와 glycerol을 각각 최종 농도가 5, 10, 15 및 20%로 되도록 농도를 조절하여 사용하였으며, 평형시간은 1분 이내로 하였다.

다. 승어

### 1) 적정 희석액

희석액에 따른 정자의 냉동보존 효과를 조사하기 위한 실험에서는 MFRS, 0.15 M sodium citrate, 0.3 M glucose를 희석액으로 사용하였고, 동해방지제로는 DMSO를 사용하였다. 정액:희석액:DMSO는 0.2:0.7:0.1의 비율로 혼합하였으며 평형시간은 1분 이내로 하였다.

라. 감성돔

### 1) 적정 희석액

희석액에 따른 정자의 냉동보존 효과를 조사하기 위한 실험에서는 5% glucose, 3% sodium citrate, 2.8% sucrose, Alserver's solution 및 MFRS를 희석액으로 사용하였고, 동해방지제로는 DMSO를 사용하였다. 정액:희석액:DMSO는 0.2:0.65:0.15의 비율로 혼합하였으며 평형시간은 1분 이내로 하였다.

## 2) 적정 동해방지제의 종류와 농도

동해방지제의 종류와 농도별 실험에서는 5% glucose에 DMSO와 glycerol을 각

각 최종 농도가 5, 10, 15, 20, 25 및 30% 되도록 하였으며, 평형시간은 1분 이내로 하였다.

### 3) 평형시간에 따른 보존효과

평형시간에 따른 냉동보존 효과를 알아보기 위한 실험에서 희석액으로는 5% glucose를, 동해방지제로는 DMSO를 사용하였다. 정액:희석액:DMSO는 0.2:0.65:0.15의 비율로 혼합하였고, 평형시간은 5, 10, 20, 40 및 80분으로 하였다.

### 4. 해동온도

해동온도가 해동 후 자주복 정자의 활성화에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 희석액으로 Alsever's solution을, 동해방지제로 ethylene glycol을 사용하였다. 정액:희석액:동해방지제는 0.15:0.72:0.13의 비율로 혼합하였고, 20초 이내의 평형시간을 둔 후 냉동하였다. 냉동한 정액은 1일 후에 각각 10, 20, 30, 40, 50℃에서 해동시켰다.

### 5. 통계처리

각 실험 결과는 일원 분산분석과 Tukey test (Zar 1984)로 검정하였다.

## 제3절 결 과

### 1. 냉동처리가 정액성상에 미치는 영향

냉동과 해동과정을 거치면서 여러 가지 희석액과 동해방지제를 사용하였기 때

문에 정자의 화학적 조성을 파악하기에는 어려움이 있었다. 그러나 정자 냉동보존의 성공 여부에 가장 많은 영향을 미치는 정자의 형태적 손상 유무는 전자현미경을 이용하여 자세히 파악하였다.

#### 가. 자주복

냉동보존한 후 해동한 정자의 대부분은 신선한 정자의 구조와 별다른 차이를 보이지 않았으나, 동해를 입은 일부의 정자에서는 편모(Fig. 40A)와 머리를 둘러싸고 있는 세포막이 이탈되어 있었다(Fig. 40B).

#### 나. 황복

황복정자도 냉동보존한 후 해동한 정자의 대부분은 신선한 정자의 구조와 별다른 차이를 보이지 않았으나, 동해를 입은 일부의 정자에서는 자주복 정자에서와 같이 편모(Fig. 41A)와 머리를 둘러싸고 있는 세포막이 이탈되어 있었다(Fig. 41B).

#### 다. 송어

냉동과 해동과정에서 극히 일부의 송어 정자는 복어류 정자 보다 많은 물리적 손상을 받았다. 원형질 막은 대부분 이탈되어 있었으며, 머리의 모양도 신선한 정자는 타원형이었으나 냉동보존하였던 정자는 찌그러져 있었다(Fig. 42A). 머리의 기부에서 미토콘드리아가 이탈된 정자가 관찰되었고, 미토콘드리아의 외막도 이탈되었거나 소실되어 있었다(Fig. 42A).

#### 라. 감성돔

냉동보존 후 해동한 정자에서도 냉동하지 않은 정자와 같은 구조를 나타내는

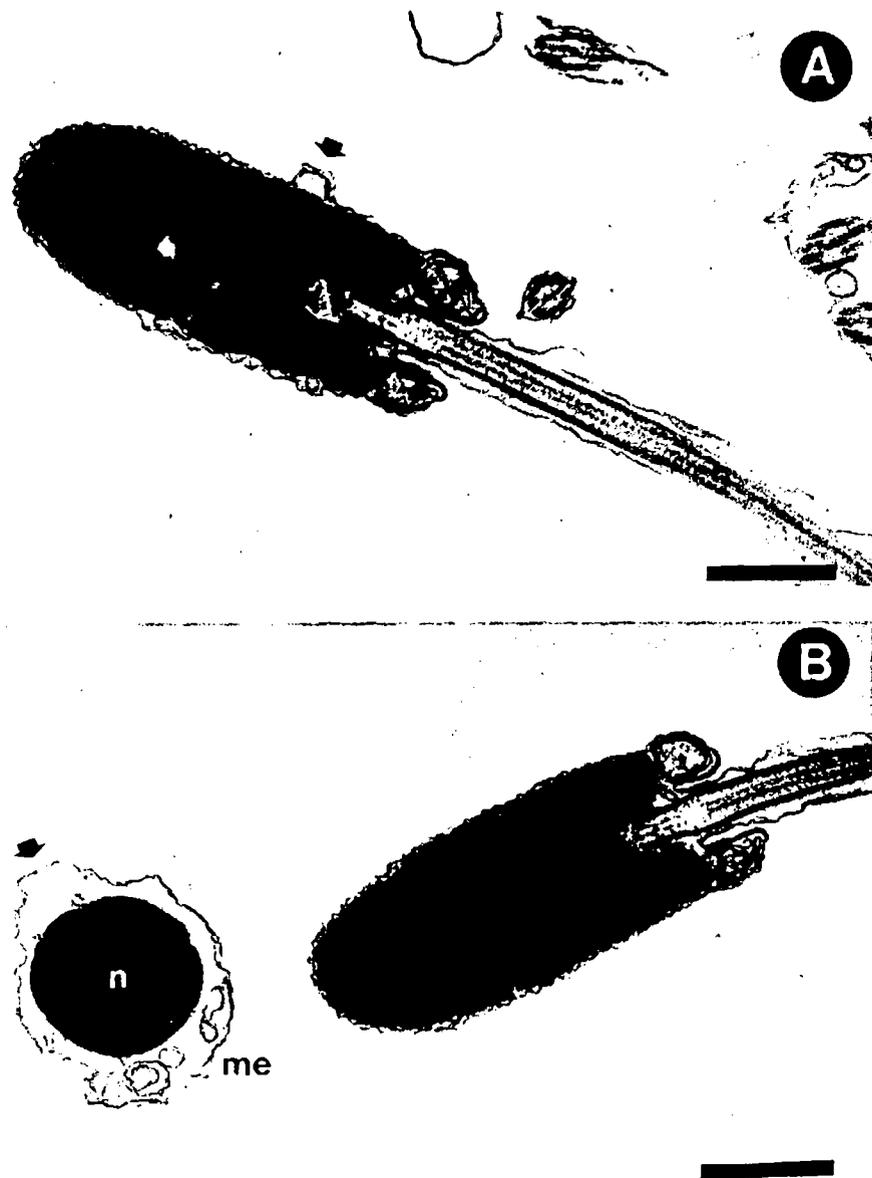


Fig. 40. Electron micrographs of cryopreserved spermatozoa in tiger puffer. A: Sagittal section of a spermatozoon. B: Cross and sagittal section of spermatozoa head. me: plasma membrane, n: nucleus. Arrows: damaged plasma membranes. Bar=0.5  $\mu$ m.

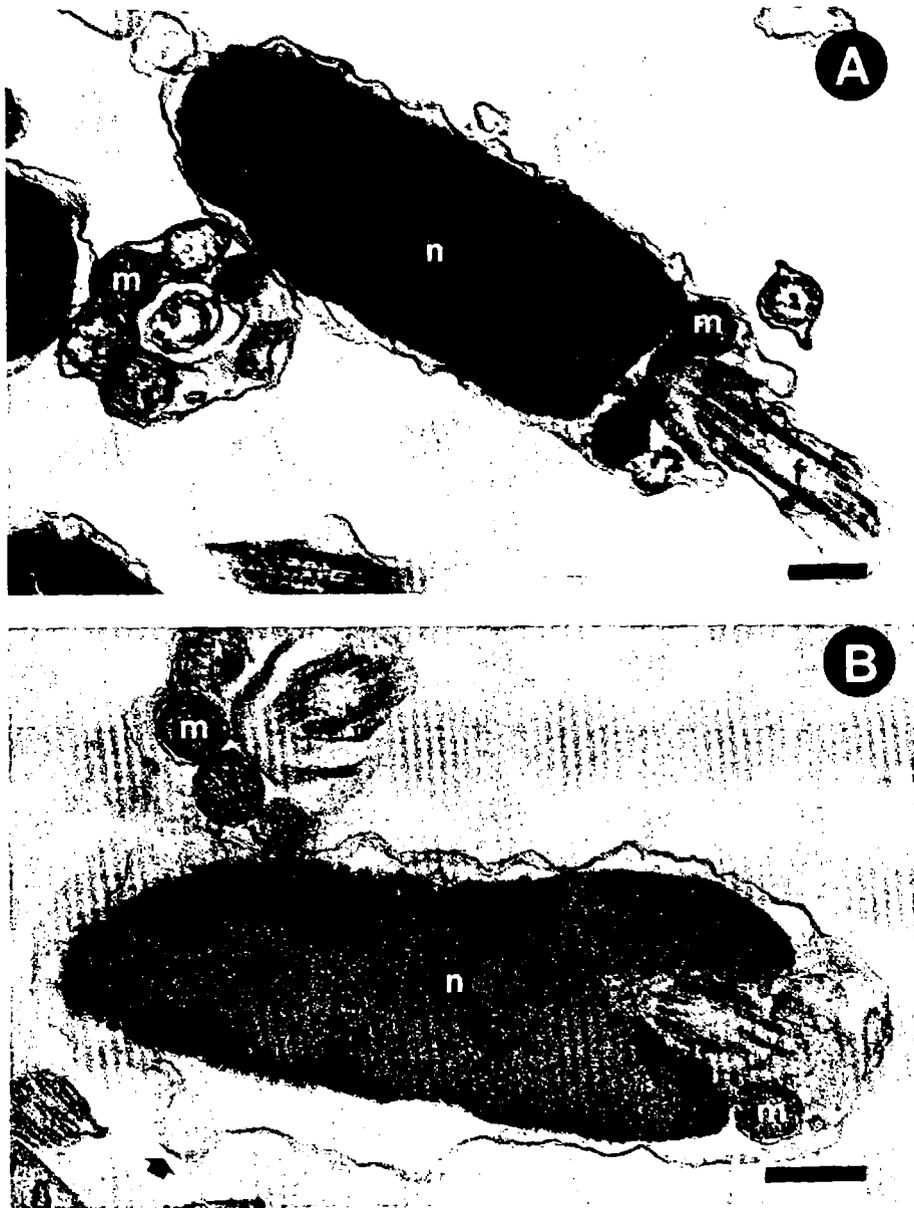


Fig. 41. Electron micrographs of cryopreserved spermatozoa in river puffer. A: Sagittal section of a spermatozoon and cross section of flagellum surrounded mitochondria. B: Sagittal section of spermatozoa head. f: flagellum, m: mitochondrion, n: nucleus. Arrow: damaged plasma membrane. Bar=0.2  $\mu$ m.

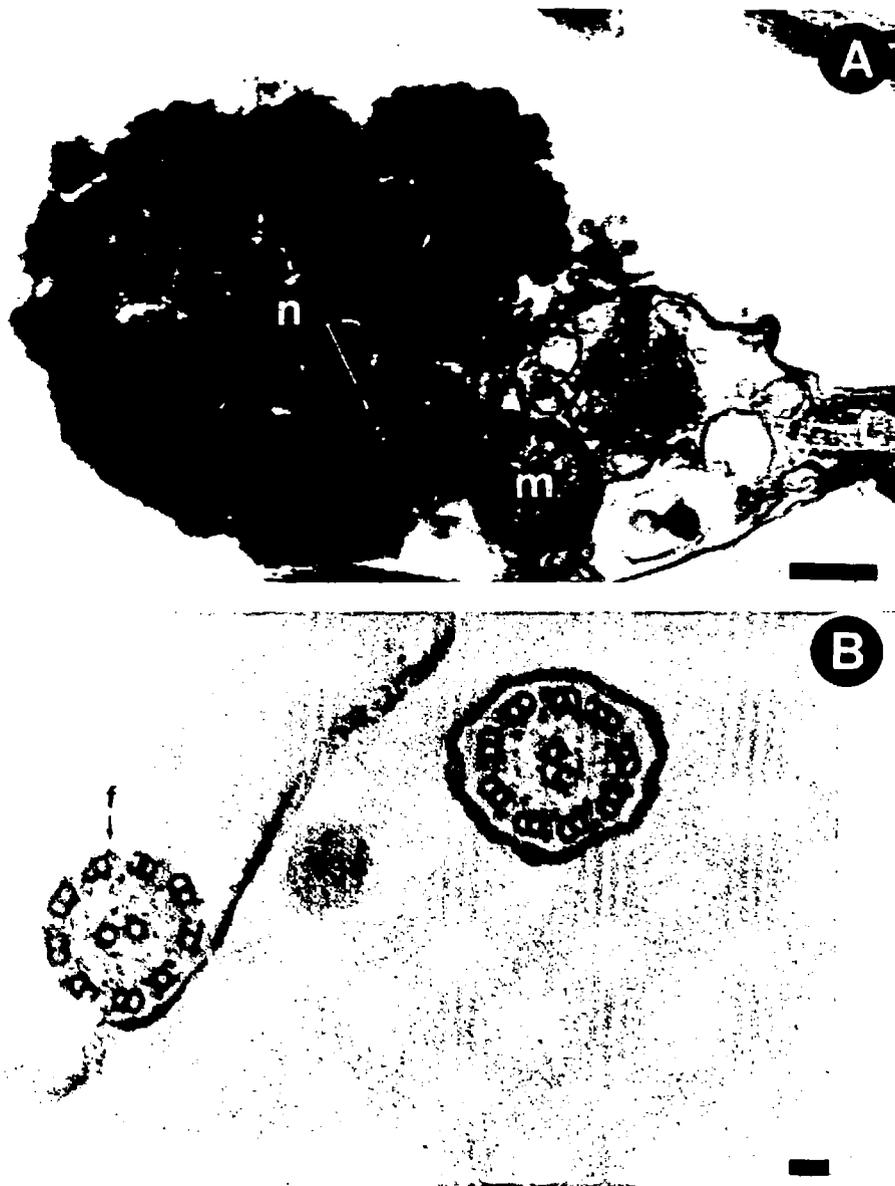


Fig. 42. Electron micrographs of cryopreserved spermatozoa in grey mullet. A: Sagittal section of a spermatozoon showing head with granular chromatin, mitochondria and flagellum. B: Cross section of middle piece showing a flagellum with the 9+2 pattern. f: flagellum, m: mitochondrion, n: nucleus. Bar=0.2  $\mu$ m.

반면, 일부 정자에서는 염색질이 과립상으로 변하거나, 균질화되지 않았다(Fig. 43A). 머리의 크기도 냉동전의 정자와 비교할 때 다소 커졌으며, 세포막은 정자의 머리로부터 이탈되어 있고, 중편부와 편모도 약간 변형되어 있었다(Fig. 43B).

## 2. 동해방지제

### 가. 자주복

정자의 냉동보존에 적합한 희석액을 결정하고 동해방지제가 냉동전 정자활성에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 11가지 희석액과 4가지 동해방지제를 정액과 섞은 다음, 희석직후, 희석후 해수첨가로 활성화시킨 직후 및 1일간 냉장보존한 후의 정자활성을 평가한 결과는 Table 14에 나타내었다. 15%의 DMSO와 glycerol을 첨가한 희석액으로 정액을 희석한 직후의 정자는 활성화시키지 않았음에도 불구하고 대부분의 희석액에서 운동성을 나타내는 것이 확인되었다. 한편, 희석후 해수첨가로 활성화시킨 정자의 SAI는 희석액과 동해방지제로 정액을 희석한 직후의 정자 SAI와 역상관 관계를 보였다. 동해방지제를 첨가한 희석정액을  $0\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 에서 1일간 냉장보존한 실험에서는 glycerol을 첨가한 거의 모든 희석액에서 SAI가 0으로 나타나, 나쁜 결과를 보였다. 또한 DMSO와 glycerol을 각각 달리 첨가한 희석액으로 정액을 희석하여 1일간 냉장보존 하였을 때의 정자 생존율은 각각 21.0~47.2%, 23.8~54.0%로, 희석직후의 43.5~76.0%, 45.8~75.3%에 비해 크게 낮아졌다. 이에 비해 ethylene glycol이나 methanol을 동해방지제로 첨가한 11가지 희석액을 사용한 경우, 희석직후에 정자가 운동을 개시한 희석액은 ethylene glycol에 이어 fructose, glucose, sodium cholride medium, sodium citrate, methanol에서 fructose, glucose, sodium cholride medium의 순이었다. 이들을

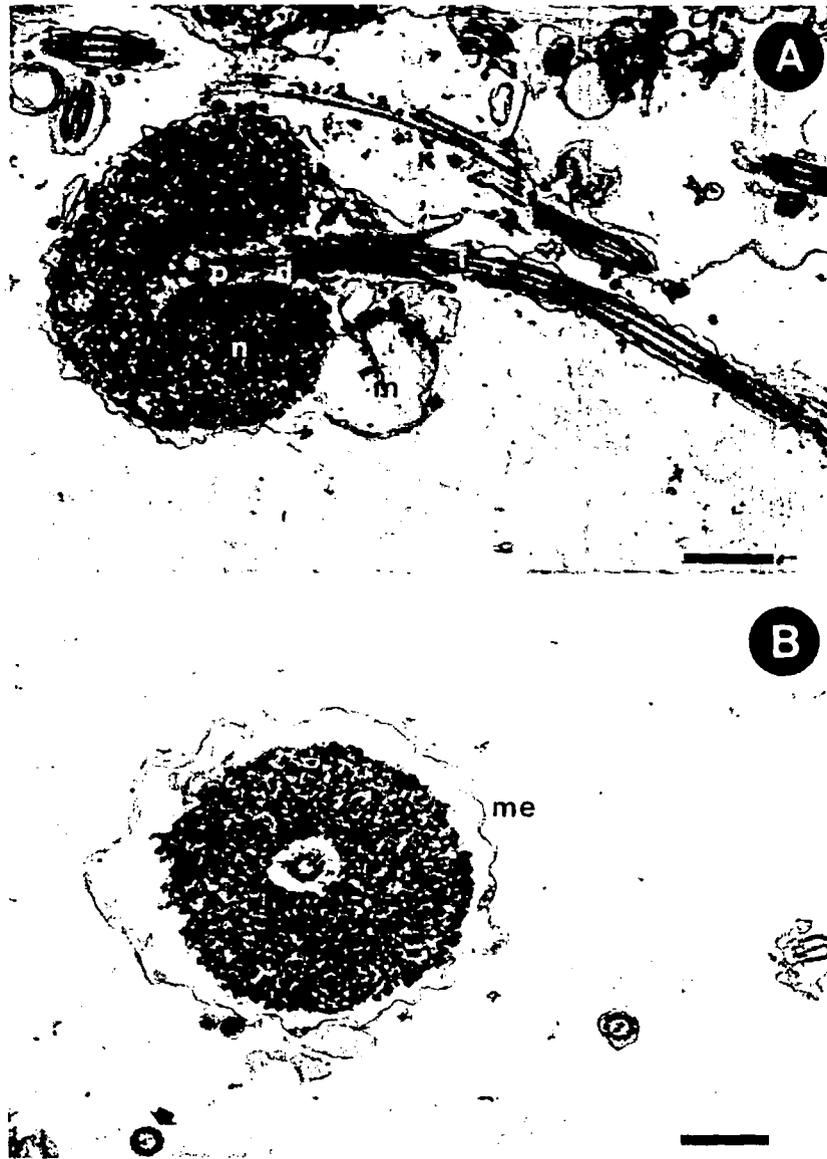


Fig. 43. Electron micrographs of cryopreserved spermatozoa in black seabream. A: Sagittal section of head showing granular chromatin, the centriole, mitochondrion and flagellum. B: Cross section of head showing proximal centriole. Note the modified flagellum (arrow). d: distal centriole, f: flagellum, m: mitochondrion, me: plasma membrane, p: proximal centriole. Bar=0.5  $\mu$ m.

Table 14. Sperm vitality after dilution with various media, activation with seawater and 1 day cold storage in various media

| Cryoprotectant | Diluent                | SAI after |            |                      | Survival rate (%) after |                       |
|----------------|------------------------|-----------|------------|----------------------|-------------------------|-----------------------|
|                |                        | Dilution  | Activation | Storage during 1 day | Dilution                | Storage during 1 day  |
| DMSO(15%)      | Alsever's solution     | 0.2       | 1.9        | 1.7                  | 66.5±3.4                | 47.2±2.3 <sup>a</sup> |
|                | Cortland medium        | 0.1       | 2.1        | 2.1                  | 76.0±3.9                | 45.8±2.9 <sup>a</sup> |
|                | Egg-tris               | 2.4       | 1.4        | 0.3                  | 67.8±2.8                | 31.5±3.3 <sup>d</sup> |
|                | Fructose               | 2.7       | 2.6        | 0.0                  | 48.7±3.6                | 21.0±2.1 <sup>f</sup> |
|                | Glucose                | 2.7       | 1.4        | 0.0                  | 43.5±3.1                | 46.2±2.8 <sup>a</sup> |
|                | MFRS                   | 0.0       | 2.4        | 2.0                  | 70.2±1.7                | 46.8±3.4 <sup>a</sup> |
|                | Mounib's solution      | 2.4       | 1.6        | 2.4                  | 68.7±2.4                | 42.2±2.8 <sup>b</sup> |
|                | NaCl                   | 2.4       | 1.3        | 2.0                  | 55.7±3.4                | 37.8±3.7 <sup>c</sup> |
|                | Sodium chloride medium | 0.2       | 0.9        | 0.0                  | 57.5±2.9                | 27.3±2.6 <sup>e</sup> |
|                | Sodium citrate         | 2.7       | 2.4        | 0.9                  | 60.8±3.2                | 32.2±2.6 <sup>d</sup> |
|                | Sucrose                | 0.0       | 2.2        | 1.8                  | 72.7±1.8                | 37.8±3.0 <sup>c</sup> |

Values within the same column with different letters are significantly different ( $P<0.05$ ). MFRS : marine fish ringer solution, SAI : sperm activity index.

Table 14. Continued

| Cryoprotectant           | Diluent                | SAI after |            |                      | Survival rate (%) after |                        |
|--------------------------|------------------------|-----------|------------|----------------------|-------------------------|------------------------|
|                          |                        | Dilution  | Activation | Storage during 1 day | Dilution                | Storage during 1 day   |
| Ethylene glycol<br>(15%) | Alsever's solution     | 0.0       | 2.4        | 2.6                  | 75.3±2.9                | 64.3±2.5 <sup>a</sup>  |
|                          | Cortland medium        | 0.0       | 2.8        | 2.6                  | 73.3±2.1                | 58.5±2.1 <sup>b</sup>  |
|                          | Egg-tris               | 0.0       | 2.3        | 0.1                  | 52.3±3.1                | 47.8±1.8 <sup>fg</sup> |
|                          | Fructose               | 3.0       | 2.4        | 1.0                  | 55.3±3.6                | 51.8±2.0 <sup>e</sup>  |
|                          | Glucose                | 2.7       | 2.7        | 0.8                  | 62.8±2.1                | 52.8±1.6 <sup>de</sup> |
|                          | MFRS                   | 0.0       | 2.4        | 2.4                  | 70.5±3.5                | 60.0±2.0 <sup>b</sup>  |
|                          | Mounib's solution      | 0.0       | 2.4        | 2.4                  | 74.5±3.3                | 59.2±3.6 <sup>b</sup>  |
|                          | NaCl                   | 0.2       | 2.4        | 2.2                  | 72.7±3.7                | 57.2±2.9 <sup>bc</sup> |
|                          | Sodium chloride medium | 2.7       | 2.2        | 0.0                  | 42.0±3.2                | 46.2±2.1 <sup>g</sup>  |
|                          | Sodium citrate         | 2.7       | 2.7        | 2.1                  | 62.7±3.4                | 50.0±2.2 <sup>eg</sup> |
| Sucrose                  | 0.0                    | 2.2       | 2.0        | 67.8±3.2             | 55.2±3.3 <sup>cd</sup>  |                        |

Values within the same column with different letters are significantly different ( $P<0.05$ ). MFRS : marine fish ringer solution, SAI : sperm activity index.

Table 14. Continued

| Cryoprotectant | Diluents               | SAI after |            |                      | Survival rate (%) after |                        |
|----------------|------------------------|-----------|------------|----------------------|-------------------------|------------------------|
|                |                        | Dilution  | Activation | Storage during 1 day | Dilution                | Storage during 1 day   |
| Glycerol(15%)  | Alsever's solution     | 2.7       | 0.8        | 0.0                  | 71.8±2.6                | 43.3±2.7 <sup>c</sup>  |
|                | Cortland medium        | 2.7       | 0.7        | 0.0                  | 75.3±3.4                | 44.7±3.7 <sup>bc</sup> |
|                | Egg-tris               | 0.0       | 1.5        | 0.0                  | 54.0±3.0                | 28.7±2.1 <sup>f</sup>  |
|                | Fructose               | 2.9       | 2.4        | 0.0                  | 60.3±2.4                | 23.8±3.1 <sup>g</sup>  |
|                | Glucose                | 2.9       | 1.1        | 0.0                  | 45.8±2.3                | 36.3±3.3 <sup>d</sup>  |
|                | MFRS                   | 2.7       | 0.7        | 0.0                  | 69.8±3.8                | 46.7±3.3 <sup>b</sup>  |
|                | Mounib's solution      | 2.9       | 1.0        | 0.1                  | 59.7±4.2                | 33.2±3.4 <sup>e</sup>  |
|                | NaCl                   | 2.8       | 1.2        | 0.0                  | 68.2±2.1                | 54.0±3.5 <sup>a</sup>  |
|                | Sodium chloride medium | 0.2       | 2.2        | 0.0                  | 68.5±2.7                | 34.3±3.2 <sup>de</sup> |
|                | Sodium citrate         | 0.0       | 2.9        | 0.0                  | 54.3±2.7                | 28.2±3.5 <sup>f</sup>  |
| Sucrose        | 2.7                    | 1.2       | 0.0        | 66.8±3.2             | 42.7±3.4 <sup>c</sup>   |                        |

Values within the same column with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). MFRS : marine fish ringer solution, SAI : sperm activity index.

Table 14. Continue

| Cryoprotectant | Diluents               | SAI after |            |                      | Survival rate (%) after |                        |
|----------------|------------------------|-----------|------------|----------------------|-------------------------|------------------------|
|                |                        | Dilution  | Activation | Storage during 1 day | Dilution                | Storage during 1 day   |
| Methanol(15%)  | Alsever's solution     | 0.0       | 1.7        | 2.4                  | 72.2±4.1                | 60.0±2.4 <sup>a</sup>  |
|                | Cortland medium        | 0.0       | 2.8        | 2.4                  | 65.8±2.2                | 42.7±3.1 <sup>e</sup>  |
|                | Egg-tris               | 0.0       | 2.5        | 0.3                  | 57.8±2.3                | 32.8±2.5 <sup>f</sup>  |
|                | Fructose               | 2.9       | 2.1        | 1.2                  | 68.0±2.1                | 31.0±3.1 <sup>f</sup>  |
|                | Glucose                | 2.7       | 2.5        | 1.2                  | 72.5±1.9                | 42.0±2.5 <sup>e</sup>  |
|                | MFRS                   | 0.0       | 2.0        | 2.3                  | 67.3±3.2                | 59.5±3.4 <sup>ab</sup> |
|                | Mounib's solution      | 0.1       | 2.6        | 2.4                  | 75.7±2.0                | 48.2±3.4 <sup>d</sup>  |
|                | NaCl                   | 0.0       | 2.4        | 2.6                  | 66.0±2.4                | 56.7±3.4 <sup>b</sup>  |
|                | Sodium chloride medium | 2.9       | 0.0        | 0.0                  | 50.2±2.6                | 27.3±3.7 <sup>g</sup>  |
|                | Sodium citrate         | 0.0       | 2.7        | 1.6                  | 73.8±3.9                | 33.3±2.2 <sup>f</sup>  |
| Sucrose        | 0.0                    | 2.3       | 2.0        | 70.5±1.6             | 53.3±3.4 <sup>c</sup>   |                        |

Values within the same column with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). MFRS : marine fish ringer solution, SAI : sperm activity index.

제외한 나머지 희석액에서는 희석직후에 정자가 운동을 개시하지 않았고, 해수로 활성화시켰을 때만 정자가 매우 활발하게 운동하는 것이 관찰되었다. 더욱이 ethylene glycol 첨가와 methanol 첨가 희석액을 사용하여 1일간 냉장보존한 후의 정자 생존율도 각각 46.2~64.3%, 27.3~60.0%로 나타나, 희석직후의 42.0~75.3%, 50.2~73.8%에 비해 그다지 낮아지지 않았으며, DMSO 첨가 및 glycerol 첨가 희석액보다 생존율이 높았다.

희석액을 Alsever's solution과 MFRS로 하였을 때, 동해방지제인 DMSO, ethylene glycol, glycerol 및 methanol을 각각 달리 첨가하여 1일간  $0\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 에서 냉장보존한 후의 SAI와 생존율은 각각 0~2.6, 43.3~64.3%로 나타나, 다른 희석액에 비해 비교적 좋은 결과를 보였다. 특히 가장 우수한 결과를 보인 것은 희석액으로 Alsever's solution을 동해방지제로 15% ethylene glycol을 사용한 것으로서, 1일간 냉장보존한 후의 SAI와 정자 생존율은 각각 2.6,  $64.3\pm 2.5\%$ 인 것으로 나타났다.

여러 가지 희석액과 동해방지제를 혼합하여 1일간 냉장보존 하였던 앞의 실험의 결과를 토대로, 희석액은 Alsever's solution과 MFRS로 하고, 동해방지제로는 DMSO, ethylene glycol, glycerol 및 methanol을 사용하되 각각의 농도를 달리하여 정액과 혼합한 후 액체질소로 냉동한 결과는 Table 15와 같다. 희석액으로 Alsever's solution을 사용하였을 때의 SAI와 정자 생존율은 각각 MFRS에 비해 전체적으로 좋은 결과를 보였다. 특히 Alsever's solution을 희석액으로 하고 ethylene glycol의 최종농도가 15%가 되도록 혼합하여 냉동하였을 때, SAI와 정자 생존율이 각각 2.0,  $72.0\pm 2.9\%$ 로 나타나, 다른 동해방지제에 비해 보존효과가 유의하게 높았다( $P<0.05$ ). 이것은 SAI와 생존율이 각각 2.7,  $83.7\pm 3.2\%$ 인 신선한 정액에 비해서는 다소 낮은 것이지만, 동해방지제를 첨가하지 않고 냉동시켰을 때

Table 15. SAI and survival rate of tiger puffer spermatozoa in two diluents and different concentrations of four cryoprotectants on post-thawing

| Diluent            | Cryoprotectant  | Concentration (%) | SAI | Survival rate (%)         |
|--------------------|-----------------|-------------------|-----|---------------------------|
| Alsever's solution | DMSO            | 5                 | 0.2 | 19.8 ± 2.2 <sup>h</sup>   |
|                    |                 | 10                | 0.2 | 19.8 ± 3.1 <sup>h</sup>   |
|                    |                 | 15                | 0.2 | 36.5 ± 2.9 <sup>g</sup>   |
|                    |                 | 20                | 0.8 | 52.7 ± 2.7 <sup>bc</sup>  |
|                    | Ethylene glycol | 5                 | 0.4 | 39.3 ± 1.6 <sup>fg</sup>  |
|                    |                 | 10                | 0.5 | 42.3 ± 2.0 <sup>def</sup> |
|                    |                 | 15                | 2.0 | 72.0 ± 2.9 <sup>a</sup>   |
|                    |                 | 20                | 1.5 | 54.3 ± 3.3 <sup>b</sup>   |
|                    | Glycerol        | 5                 | 0.2 | 36.7 ± 3.4 <sup>g</sup>   |
|                    |                 | 10                | 0.2 | 36.8 ± 2.5 <sup>g</sup>   |
|                    |                 | 15                | 0.2 | 40.5 ± 1.9 <sup>ef</sup>  |
|                    |                 | 20                | 0.7 | 51.2 ± 2.1 <sup>c</sup>   |
|                    | Methanol        | 5                 | 0.6 | 42.7 ± 3.1 <sup>de</sup>  |
|                    |                 | 10                | 0.6 | 44.5 ± 2.4 <sup>d</sup>   |
|                    |                 | 15                | 1.4 | 44.8 ± 2.8 <sup>d</sup>   |
|                    |                 | 20                | 1.5 | 53.7 ± 3.7 <sup>def</sup> |

Values within the same column with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). SAI : sperm activity index.

Table 15. Continued

| Diluent | Cryoprotectant  | Concentration (%) | SAI | Survival rate (%)        |
|---------|-----------------|-------------------|-----|--------------------------|
| MFRS    | DMSO            | 5                 | 0.0 | 6.5 ± 2.3 <sup>g</sup>   |
|         |                 | 10                | 0.0 | 6.3 ± 2.2 <sup>g</sup>   |
|         |                 | 15                | 0.0 | 22.2 ± 2.9 <sup>d</sup>  |
|         |                 | 20                | 0.0 | 22.3 ± 3.6 <sup>cd</sup> |
|         | Ethylene glycol | 5                 | 0.0 | 5.2 ± 2.8 <sup>g</sup>   |
|         |                 | 10                | 0.0 | 5.2 ± 2.9 <sup>g</sup>   |
|         |                 | 15                | 0.0 | 5.0 ± 1.1 <sup>g</sup>   |
|         |                 | 20                | 0.0 | 6.7 ± 2.3 <sup>g</sup>   |
|         | Glycerol        | 5                 | 0.2 | 16.5 ± 3.9 <sup>f</sup>  |
|         |                 | 10                | 0.3 | 29.0 ± 3.3 <sup>b</sup>  |
|         |                 | 15                | 0.3 | 35.5 ± 3.6 <sup>a</sup>  |
|         |                 | 20                | 0.3 | 36.7 ± 3.5 <sup>a</sup>  |
|         | Methanol        | 5                 | 0.0 | 18.8 ± 3.8 <sup>ef</sup> |
|         |                 | 10                | 0.0 | 19.3 ± 2.8 <sup>e</sup>  |
|         |                 | 15                | 0.0 | 19.5 ± 3.6 <sup>c</sup>  |
|         |                 | 20                | 0.2 | 24.8 ± 3.4 <sup>c</sup>  |

Values within the same column with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). MFRS : marine fish ringer solution, SAI : sperm activity index.

의 SAI와 생존율이 각각 0,  $16.7 \pm 2.1\%$ 인 것에 비하면 월등히 높은 수준이었다. Methanol은 15% ethylene glycol에서 나타난 결과에는 미치지 못하지만, DMSO나 glycerol에 비해서는 비교적 보존효과가 좋았다.

희석액으로 Alsever's solution을, 동해방지제로 DMSO, ethylene glycol, glycerol, methanol을 각각 사용하였을 때, 평형시간별로 정자를 냉동한 다음, 1일 후에 해동시킨 SAI와 정자의 생존율은 Table 16과 같다. SAI와 생존율은 모든 동해방지제에서 평형시간을 늘릴수록 점차 낮아졌다. 가장 좋은 결과를 보인 것은 15% ethylene glycol을 동해방지제로 하여 평형시간을 최소로 하면서 냉동시킨 것으로, SAI와 정자의 생존율은 각각 1.5,  $69.8 \pm 3.7\%$ 였다.

희석액을 Alsever's solution, Cortland medium, Mounib's solution 및 sucrose로, 동해방지제를 15% ethylene glycol로 하여 BSA나 계란난황의 최종농도가 5%로 되도록 정액을 희석하여 냉동시킨 다음, 해동시켜 SAI와 정자의 생존율을 조사한 결과는 Table 17에 나타내었다. BSA나 계란난황의 보존 상승효과는 희석액으로 Cortland medium을 사용한 경우에서만 나타났으며, Mounib's solution과 sucrose에서는 BSA나 계란난황의 첨가에 의한 상승효과를 인정할 수 없었다. BSA나 계란난황을 Alsever's solution에 첨가한 경우 SAI와 생존율이 낮아짐으로써 오히려 보존효과를 떨어뜨리는 것으로 나타났다.

#### 나. 황복

황복정자의 냉동보존을 위한 예비실험에서 희석액으로 효과가 가장 좋았던 MFRS를 희석액으로 사용하고 동해방지제로 DMSO를 농도별로 혼합하여 냉동하였을 때의 수정률은 Fig. 44에 나타내었다. 동해방지제인 DMSO의 농도를 서서히 증가시킬수록 수정률은 점차 감소하였으며 수정률이 가장 높았던 5% DMSO에서는  $79.3 \pm 6.5\%$ 로 대조구의  $82.5 \pm 2.1\%$ 와 큰 차이가 없었다.

Table 16. SAI and survival rate of tiger puffer spermatozoa in different equilibration time on post-thawing

| Cryoprotectant        | Equilibration time (min) | SAI | Survival rate (%)        |
|-----------------------|--------------------------|-----|--------------------------|
| DMSO (20%)            | 0                        | 0.8 | 45.7 ± 2.9 <sup>a</sup>  |
|                       | 1                        | 0.1 | 40.0 ± 2.2 <sup>b</sup>  |
|                       | 5                        | 0.0 | 34.7 ± 2.9 <sup>c</sup>  |
|                       | 10                       | 0.0 | 33.2 ± 3.1 <sup>c</sup>  |
|                       | 20                       | 0.0 | 33.3 ± 3.9 <sup>c</sup>  |
|                       | 40                       | 0.0 | 28.2 ± 3.2 <sup>d</sup>  |
|                       | 60                       | 0.0 | 22.3 ± 2.7 <sup>e</sup>  |
| Ethylene glycol (15%) | 0                        | 1.5 | 69.8 ± 3.7 <sup>a</sup>  |
|                       | 1                        | 0.9 | 45.5 ± 3.1 <sup>b</sup>  |
|                       | 5                        | 0.6 | 43.7 ± 3.3 <sup>b</sup>  |
|                       | 10                       | 0.5 | 34.0 ± 3.3 <sup>c</sup>  |
|                       | 20                       | 0.5 | 32.9 ± 2.3 <sup>cd</sup> |
|                       | 40                       | 0.3 | 32.0 ± 3.7 <sup>cd</sup> |
|                       | 60                       | 0.3 | 30.0 ± 2.8 <sup>d</sup>  |
| Glycerol (20%)        | 0                        | 0.1 | 47.5 ± 2.6 <sup>a</sup>  |
|                       | 1                        | 0.1 | 39.8 ± 3.7 <sup>b</sup>  |
|                       | 5                        | 0.1 | 40.3 ± 2.8 <sup>b</sup>  |
|                       | 10                       | 0.1 | 41.3 ± 3.8 <sup>b</sup>  |
|                       | 20                       | 0.1 | 40.3 ± 3.3 <sup>b</sup>  |
|                       | 40                       | 0.0 | 40.3 ± 2.9 <sup>b</sup>  |
|                       | 60                       | 0.0 | 40.2 ± 2.3 <sup>b</sup>  |
| Methanol (20%)        | 0                        | 1.5 | 52.3 ± 3.2 <sup>a</sup>  |
|                       | 1                        | 0.8 | 45.5 ± 3.1 <sup>b</sup>  |
|                       | 5                        | 0.6 | 46.0 ± 2.4 <sup>bc</sup> |
|                       | 10                       | 0.6 | 46.5 ± 2.7 <sup>bc</sup> |
|                       | 20                       | 0.6 | 44.0 ± 2.8 <sup>bc</sup> |
|                       | 40                       | 0.4 | 42.3 ± 3.7 <sup>bc</sup> |
|                       | 60                       | 0.5 | 43.0 ± 3.5 <sup>c</sup>  |

Values within the same column with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). SAI : sperm activity index.

Table 17. Effect of BSA or egg yolk on post-thawing vitality of spermatozoa

| Diluent            | Addition of BSA or egg yolk | SAI | Survival rate (%)     |
|--------------------|-----------------------------|-----|-----------------------|
| Alsever's solution | Control                     | 2.0 | 69.8±3.7 <sup>a</sup> |
|                    | BSA                         | 1.8 | 54.2±2.8 <sup>c</sup> |
|                    | Egg yolk                    | 1.9 | 62.0±2.5 <sup>b</sup> |
| Cortland medium    | Control                     | 1.4 | 54.0±2.6 <sup>b</sup> |
|                    | BSA                         | 1.8 | 63.7±2.7 <sup>a</sup> |
|                    | Egg yolk                    | 1.9 | 63.8±3.8 <sup>a</sup> |
| Mounib's solution  | Control                     | 1.5 | 53.0±2.4 <sup>a</sup> |
|                    | BSA                         | 1.8 | 54.8±2.4 <sup>a</sup> |
|                    | Egg yolk                    | 1.8 | 55.3±3.6 <sup>a</sup> |
| Sucrose            | Control                     | 1.8 | 50.7±2.5 <sup>a</sup> |
|                    | BSA                         | 1.8 | 52.8±2.3 <sup>a</sup> |
|                    | Egg yolk                    | 1.8 | 53.5±3.2 <sup>a</sup> |

Values within the same column with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). BSA : bovine serum albumin, SAI : sperm activity index.

#### 다. 송어

송어 정자의 냉동보존을 위하여 여러가지 희석액에 10% DMSO를 동해방지제로 사용하여 혼합한 정액을 액체질소에서 5일 동안 냉동보존하여 해동직후의 SAI와 수정률을 조사한 결과는 Fig. 45와 같다. 대조구인 신선한 정액의 SAI는 2.8이었으나 냉동보존하였던 정자는 SAI가 낮아져 MFRS, 0.15 M sodium citrate 및 0.3 M glucose에서 각각 0.6, 0.4, 0.6이었다. 수정률은 대조구인 신선한 정액의 수정률이 평균  $65.7 \pm 2.4\%$ 였고, MFRS, 0.15 M sodium

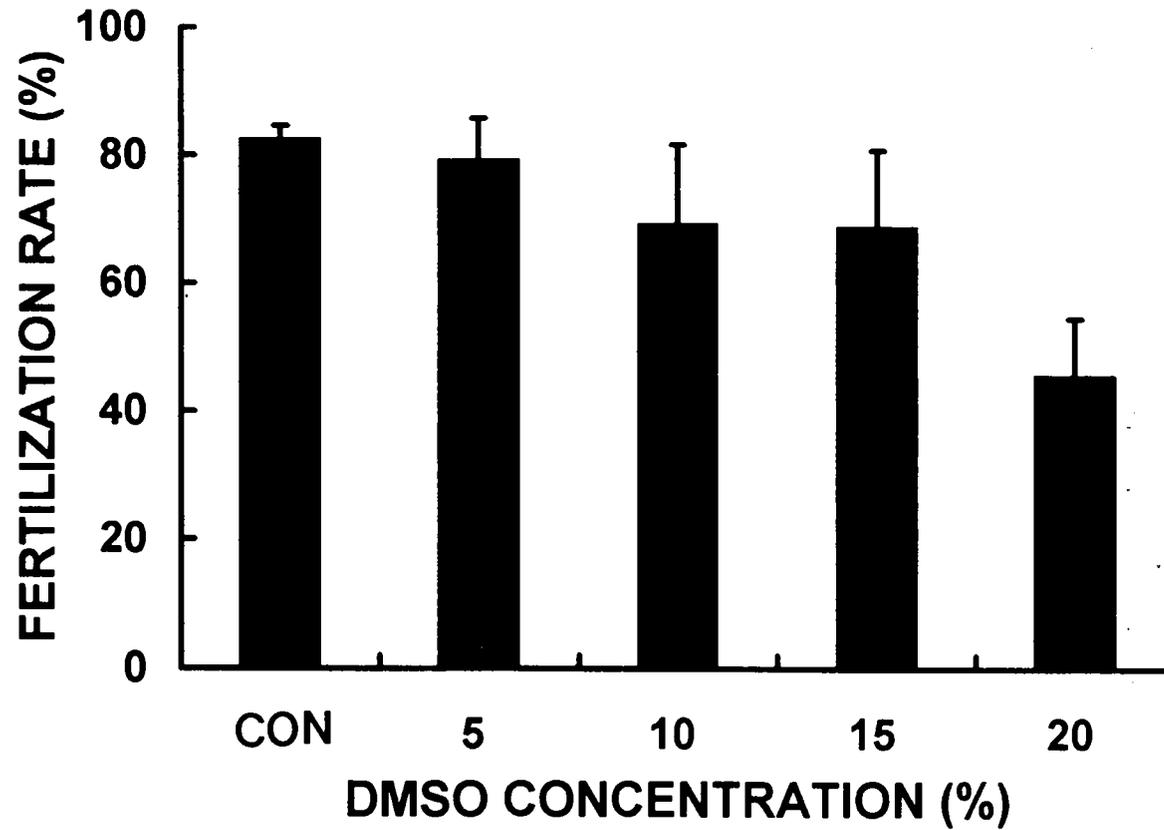


Fig. 44. Fertilization rate of eggs in river puffer by cryopreserved spermatozoa with different concentration of DMSO (dimethyl sulfoxide). CON: control.

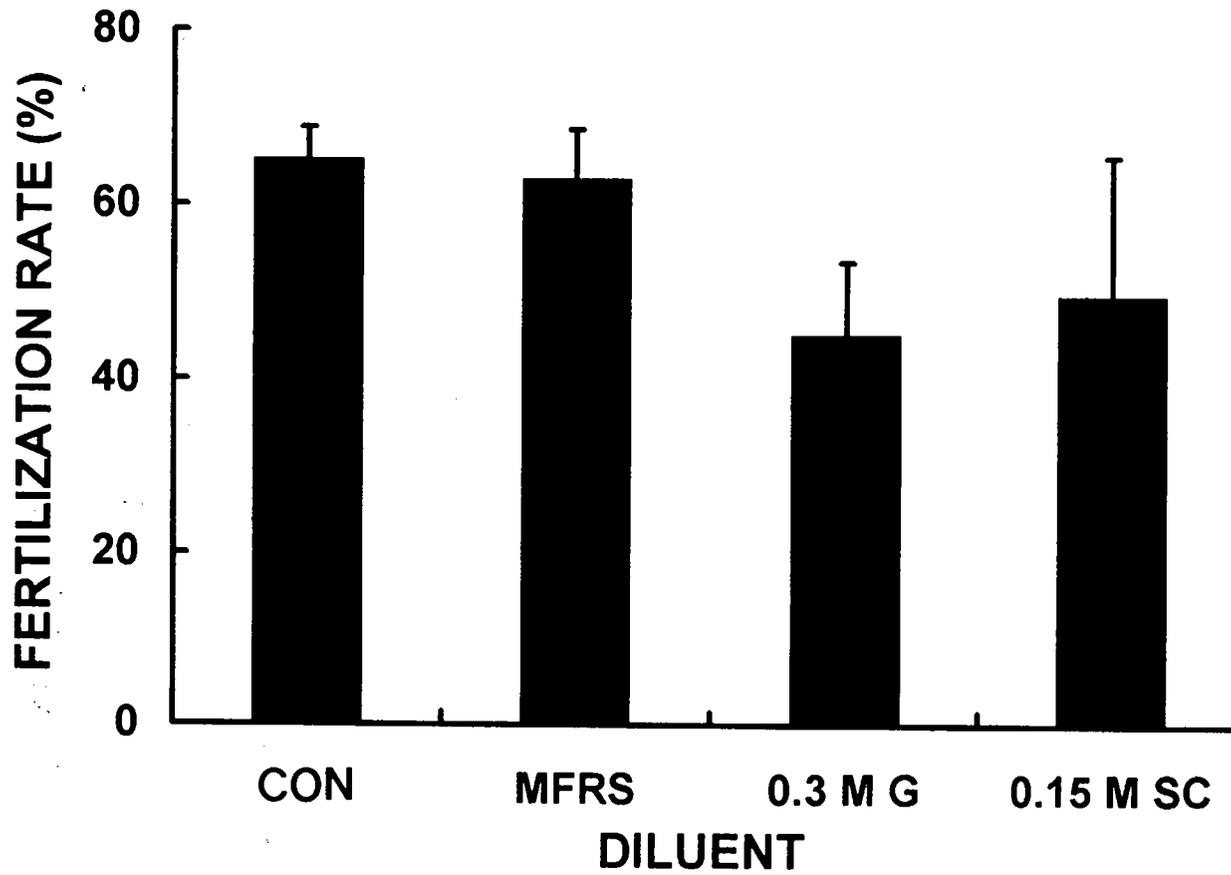


Fig. 45. Fertilization rate of eggs in grey mullet by cryopreserved spermatozoa with different diluent. CON: control, G: glucose, MFRS: marine fish ringer solution, SC: sodium citrate.

citrate 및 0.3 M glucose는 각각  $60.2 \pm 4.3\%$ ,  $55.2 \pm 6.8\%$ ,  $44.8 \pm 4.2\%$ 로 10% DMSO를 동해방지제로 사용할 때 희석액으로는 MFRS가 가장 효과가 좋았다.

냉동보존하였던 정자와 신선한 정자로 수정시켰을 때, 배 발생과정에서의 차이점은 찾아볼 수 없었으며, 냉동보존하였던 정자로 수정시킨 알에서 기형인 개체도 관찰되지 않았다(Figs. 46A, B).

#### 라. 감성돔

여러 가지 희석액에 혼합한 정액을 액체질소에서 20일 동안 냉동보존하여 해동 직후의 SAI, 정자의 생존율 및 감성돔 알에 대한 수정률을 조사한 결과는 Table 18과 같다. 해동 직후의 SAI는 3% sodium citrate에서 1.07로 가장 높았고, 다음으로 MFRS에서는 0.92였다. Alserver's solution에서 SAI는 0.22로 가장 낮았다. 정자의 생존율은 3% sodium citrate를 사용하였을 때  $80.6 \pm 1.4\%$ 로 가장 높았고,

Table 18. Effects of various diluents for the cryopreservation of black seabream sperm

| Diluent             | Days of storage | SAI  | Survival rate (%) <sup>1</sup> | Fertilization rate (%) <sup>2</sup> |
|---------------------|-----------------|------|--------------------------------|-------------------------------------|
| Fresh milt          | 0               | 2.40 | $95.5 \pm 2.2^a$               | $78.3 \pm 8.3^a$                    |
| 0.3 M glucose       | 20              | 0.28 | $46.4 \pm 7.4^b$               | $63.4 \pm 4.4^b$                    |
| MFRS*               | 20              | 0.92 | $54.4 \pm 5.2^b$               | $45.9 \pm 8.5^c$                    |
| 3% sodium citrate   | 20              | 1.07 | $80.6 \pm 1.4^a$               | $50.6 \pm 4.8^c$                    |
| 2.8% sucrose        | 20              | 0.25 | $54.7 \pm 11.6^b$              | $24.4 \pm 7.7^d$                    |
| Alserver's solution | 20              | 0.22 | $46.4 \pm 10.7^b$              | $16.7 \pm 6.0^d$                    |

\* marine fish ringer solution. SAI : sperm activity index.

<sup>1, 2</sup> values within the same column with different letters are significantly different ( $P < 0.01$ ).

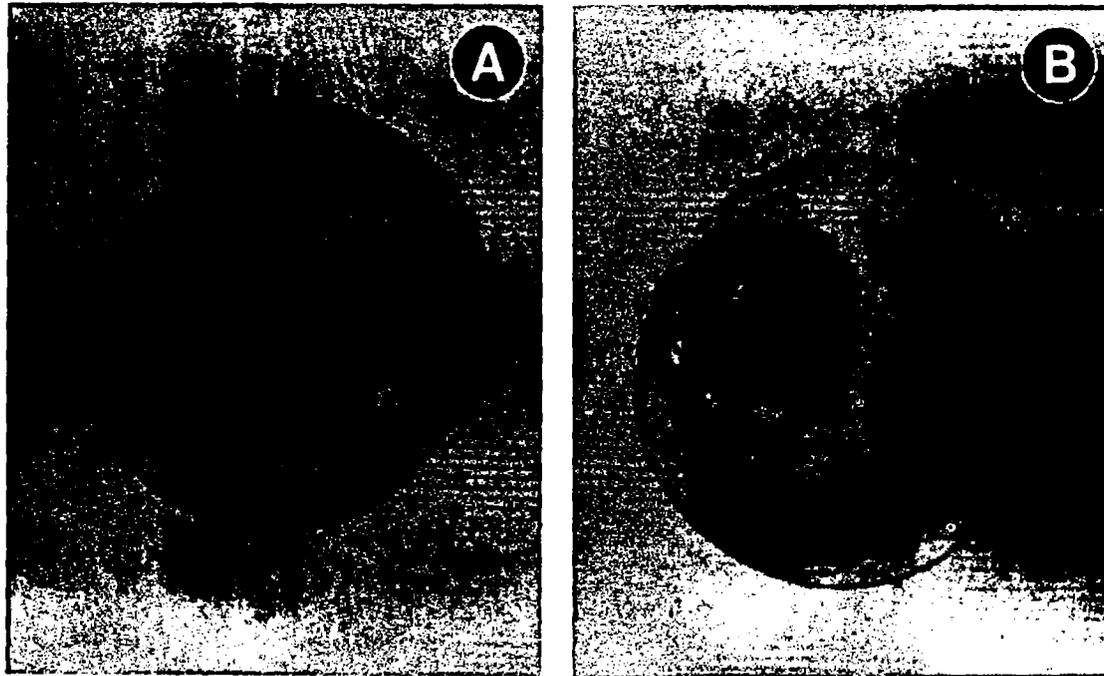


Fig. 46. Embryos of grey mullet fertilized with fresh (A) and cryopreserved (B) sperm

0.3 M glucose와 Alserver's solution에서 각각  $46.4 \pm 7.4\%$ 와  $46.4 \pm 10.7\%$ 로 가장 낮았다. 그러나 수정률은 0.3 M glucose에서  $63.4 \pm 4.4\%$ 로 가장 높았고, 다음이 3% sodium citrate로  $50.6 \pm 4.8\%$ 였다. 희석액중 수정률이 가장 낮았던 것은 SAI와 생존율이 가장 낮았던 Alserver's solution으로  $16.7 \pm 6.0\%$ 였다.

5% glucose를 희석액으로 사용하여 20일 동안 냉동보존하였을 때, 동해방지제인 glycerol과 DMSO의 농도별 냉동보존 효과는 Table 19와 같다. 동해방지제로 5% glycerol을 사용하였을 때, 수정률이  $69.4 \pm 7.4\%$ 로 신선한 정액의  $78.3 \pm 8.3\%$  보다는 다소 낮았지만 동해방지제를 첨가하지 않았을 때의  $38.6 \pm 4.3\%$  보다는 월등히 높았다. 생존율도 수정률이 가장 높았던 5% glycerol에서  $59.3 \pm 8.2\%$ 로 가장 높았으며, 수정률에서와 같은 경향으로 glycerol의 농도 증가에 반비례하여 감소하였다. SAI는 5~15% glycerol에서 1.16~1.73으로 비교적 높았으나, glycerol 농도 20% 부터는 급격하게 감소하였다. DMSO 농도를 달리했을 때 해동정자의 수정률은 15% DMSO에서  $63.4 \pm 4.4\%$ 로 가장 높았고, SAI와 생존율은 20% DMSO에서 0.67과  $56.0 \pm 6.7\%$ 로 가장 높았다. SAI, 정자의 생존율 및 수정률을 근거로 동해방지제인 glycerol과 DMSO를 서로 비교하면, 감성돔 정자의 냉동보존을 위한 동해방지제로는 glycerol이 DMSO 보다 좋은 결과를 보였다.

희석액으로 5% glucose와 DMSO를 동해방지제로 사용하였을 때, 평형시간별 해동 직후 SAI와 감성돔 알에 대한 수정률은 Table 20과 같다. SAI는 평형시간 5분에서 0.45였던 것이 평형시간을 늘릴수록 점점 감소하여 80분에서 0.35가 되었다. 정자의 생존율은 최저  $55.9 \pm 5.0\%$ , 최고  $63.1 \pm 5.5\%$ 로 평형시간별로 유의한 차이를 인정할 수 없었다( $P > 0.01$ ). 수정률은 평형시간 10분에서  $55.0 \pm 8.4\%$ 로 가장 높았고, 다음이 5분으로  $47.9 \pm 3.5\%$ 였다.

Table 19. Effects of concentration of the cryoprotectant on fertilization rate of black seabream spermatozoa

| Cryoprotectant | Concentration (%) | Days of storage | SAI  | Survival rate (%) <sup>1</sup> | Fertilization rate (%) <sup>2</sup> |
|----------------|-------------------|-----------------|------|--------------------------------|-------------------------------------|
| Fresh milt     |                   | 0               | 2.40 | 95.5 ± 2.2 <sup>a</sup>        | 78.3 ± 8.3 <sup>a</sup>             |
| None           | 0                 | 20              | 0.20 | 3.0 ± 2.4 <sup>f</sup>         | 38.6 ± 4.3 <sup>de</sup>            |
| DMSO           | 5                 | 20              | 0    | 18.1 ± 2.9 <sup>de</sup>       | 29.8 ± 6.3 <sup>e</sup>             |
|                | 10                | 20              | 0    | 45.0 ± 7.3 <sup>c</sup>        | 35.3 ± 9.1 <sup>de</sup>            |
|                | 15                | 20              | 0.28 | 46.4 ± 7.4 <sup>bc</sup>       | 63.4 ± 4.4 <sup>abc</sup>           |
|                | 20                | 20              | 0.67 | 56.0 ± 6.7 <sup>bc</sup>       | 45.8 ± 9.3 <sup>cde</sup>           |
|                | 25                | 20              | 0.17 | 47.0 ± 1.2 <sup>bc</sup>       | 35.1 ± 4.4 <sup>de</sup>            |
|                | 30                | 20              | 0    | 17.7 ± 2.5 <sup>de</sup>       | 40.0 ± 3.0 <sup>de</sup>            |
| Glycerol       | 5                 | 20              | 1.16 | 59.3 ± 8.2 <sup>b</sup>        | 69.4 ± 7.4 <sup>ab</sup>            |
|                | 10                | 20              | 1.68 | 57.5 ± 10.7 <sup>bc</sup>      | 50.1 ± 6.4 <sup>cd</sup>            |
|                | 15                | 20              | 1.73 | 44.1 ± 4.9 <sup>c</sup>        | 57.0 ± 7.7 <sup>bc</sup>            |
|                | 20                | 20              | 0.43 | 18.7 ± 4.6 <sup>d</sup>        | 46.8 ± 6.3 <sup>cde</sup>           |
|                | 25                | 20              | 0.05 | 0.8 ± 0.3 <sup>f</sup>         | 32.5 ± 4.0 <sup>de</sup>            |
|                | 30                | 20              | 0.05 | 4.2 ± 1.0 <sup>ef</sup>        | 36.1 ± 5.1 <sup>de</sup>            |

<sup>1, 2</sup> values within the same column with different letters are significantly different (P < 0.01). SAI : sperm activity index.

Table 20. Effects of various equilibration time for the cryopreservation of black seabream sperm

| Equilibration time (min.) | Days of storage | SAI  | Survival rate (%) <sup>1</sup> | Fertilization rate (%) <sup>2</sup> |
|---------------------------|-----------------|------|--------------------------------|-------------------------------------|
| 5                         | 20              | 0.45 | 61.7 ± 8.5                     | 47.9 ± 3.5 <sup>ab</sup>            |
| 10                        | 20              | 0.42 | 58.2 ± 11.9                    | 55.0 ± 8.4 <sup>a</sup>             |
| 20                        | 20              | 0.42 | 55.9 ± 5.0                     | 40.3 ± 6.4 <sup>ab</sup>            |
| 40                        | 20              | 0.37 | 59.3 ± 7.0                     | 39.2 ± 1.6 <sup>b</sup>             |
| 80                        | 20              | 0.35 | 63.1 ± 5.5                     | 44.1 ± 7.3 <sup>ab</sup>            |

<sup>1</sup> values within the same column with different letters are not significantly different (P > 0.01).

<sup>2</sup> values within the same column with different letters are significantly different (P < 0.01).

SAI : sperm activity index.

### 3. 해동온도

희석액으로 Alsever's solution을, 동해방지제로 15% ethylene glycol을 사용하여 평형시간을 최소로 하면서 냉동시킨 자주복 정자의 해동직후 SAI와 생존율은 Table 21과 같다. 해동온도가 높을수록 SAI와 정자의 수정률이 증가하여 30℃에서 각각 1.5, 71.7±3.5%로 다른 온도에 비해 유의하게 높았으며(P<0.05), 30℃ 이상에서는 SAI와 정자의 생존율이 다시 감소하였다. 따라서 straw법으로 냉동한 자주복 정자를 해동시키는 데에는 30℃ 전후의 온도에서 빨리 해동시키는 것이 효과적이었다.

Table 21. SAI and survival rate of tiger puffer spermatozoa thawed with various temperature

| Temperature (°C) | SAI | Survival rate (%)     |
|------------------|-----|-----------------------|
| 10               | 0.3 | 32.5±2.9 <sup>d</sup> |
| 20               | 0.5 | 43.8±2.5 <sup>c</sup> |
| 30               | 1.5 | 71.7±3.5 <sup>a</sup> |
| 40               | 0.7 | 57.7±3.6 <sup>b</sup> |
| 50               | 0.6 | 33.7±3.3 <sup>d</sup> |

Values within the same column with different letters are significantly different(P<0.05). SAI : sperm activity index.

## 제4절 고찰

정자의 냉동보존 효과에 영향을 미치는 중요한 요인으로는 희석액, 동해방지제, 평형시간 및 해동온도 등이 있다. 정자를 냉동보존하기 위한 첫 과정은 적정 희

석액의 선택이라 할 수 있다. 지금까지 어류정자의 냉동보존을 위해 많은 종류의 희석액이 이용되고 있다(Babiak et al. 1995; Bolla et al. 1987; Chao et al. 1975; Gwo 1994; Gwo et al. 1991; Piironen 1993). 어류정자의 보존에 있어 희석액으로는 희석시 정자가 삼투질농도 차이에 따른 자극에 의해 활성화되는 것을 방지하고(Jamieson 1991), 정장의 삼투질농도와 유사한 유기 화합물이나 염류를 사용하며, 그 조성은 매우 다양하다. 이 연구에서 자주복 정자를 냉동보존하기 위하여 희석액과 섞은 직후 정자가 운동을 개시한 희석액으로 1일간 냉장보존 하였을 경우, 보존효과가 떨어지는 것이 관찰되었다. Gwo et al.(1991)은 Atlantic croaker, *Micropogonias undulatus* 정자의 냉동보존에서 sodium chloride, glucose 및 sucrose와 같은 간단한 조성의 희석액이 유리하다고 보고하였고, Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*에서는 Mounib's solution과 MFRS를 사용하였을 때 보존효과가 좋은 것으로 나타났다(Bolla et al. 1987). 이와 같이 어종에 따른 적정 희석액의 종류는 종특이적인 경향을 보이며, 자주복에서는 Alsever's solution, 황복과 송어에서는 MFRS 그리고 감성돔에서는 0.3 M glucose가 적합한 것으로 나타났다. 일반적으로 해산어류의 정자를 보존하는 데는 간단한 조성의 희석액을 주로 많이 이용하나, 연어과 어류의 정자는 희석액의 조성에 대해 매우 민감하게 반응하는 것으로 알려져 있다(Kurokura and Hirano 1980). 당질(glucose, sucrose)을 포함한 희석액은 Atlantic croaker(Gwo et al. 1991), 복섬(Gwo et al. 1993) 및 연어과 어류(Piironen 1993) 등에서 우수한 보존효과를 나타낸다. 일반적으로 sucrose나 trehalose와 같은 당류는 정자의 냉동과정 중 세포막의 인지질을 안정시키는 것으로 알려져 있다(Gwo 1994). 이 연구에서 자주복과 감성돔의 경우 0.3 M glucose와 glucose를 포함한 Alsever's solution이 염류만 가진 MFRS에 비해 보존효과가 높은 것으로 나타났고, 송어와 황복은 Atlantic halibut, *Hippoglossus*

*hippoglossus*(Bolla et al. 1987)에서와 같이 MFRS를 사용하였을 때 보존효과가 좋았다.

냉동보존을 위해 필요한 여러 가지 요인 중 가장 중요한 것은 정자가 동해를 입는 것을 방지해 주는 동해방지제라 할 수 있다. 이러한 동해방지제는 친수성이어야 하고 세포막에 대한 투과성이 높아야 하며, 정자에 대한 독성이 낮아야 한다(Jamieson 1991). 지금까지 DMSO, ethylene glycol, glycerol 및 methanol이 주로 사용되고 있으나, 동해방지제는 종특이적인 경향이 상당히 강하기 때문에 모든 어류에서 획일적으로 사용될 수 있는 것은 아직 구명된 바 없다(Table 22). 자주복에서는 희석액으로 Alsever's solution을 사용하고 동해방지제로 15% ethylene glycol을 사용하였을 때, SAI와 정자의 생존율이 각각 2.0,  $72.0 \pm 2.9\%$ 로 가장 좋았다. 황복과 승어에서는 MFRS를 희석액으로 사용하고 동해방지제로 각각 5%와 10% DMSO를 사용하였을 때 가장 좋은 효과를 보였고, 감성돔에서는 5% glucose와 5% glycerol을 사용했을 때 가장 효과적이었다. 자주복 정자의 냉동보존에 사용된 ethylene glycol은 DMSO나 glycerol에 비해 동해방지제로 널리 사용되고 있지는 않으나, Atlantic croaker에서는 다른 동해방지제에 비해 보존효과가 높다(Gwo et al. 1991). Ethylene glycol은 분자량이 적어 세포내의 각 구조물에 침투하는 속도가 매우 빠르므로 정자에 미치는 독성을 최소화할 수 있고, 그 결과로 정자가 받는 삼투압 충격도 감소시킬 수 있다(Gwo 1994). 자주복 정자의 냉동보존에서 methanol은 ethylene glycol에 비해서는 보존효과가 낮았으나 DMSO나 glycerol에 비해 대체적으로 좋은 결과를 나타냈다. 특히 zebra fish, *Brachydanio rerio*와 틸라피아, *O. mossambicus*에서는 동해방지 효과가 다른 동해방지제에 비해 탁월한 것으로 밝혀져 있다(Chao et al. 1987; Harvey 1983; Rana

Table 22. Effects of diluent and cryoprotectant in cryopreservation of fish sperm

| Species            | Diluent         | Cryoprotectant | Fertilization rate (%) | Reference                |
|--------------------|-----------------|----------------|------------------------|--------------------------|
| Atlantic cod       | Sodium chloride | Glycerol       | 36                     | Mounib et al. 1968       |
| Atlantic croaker   | 1% NaCl         | 15% DMSO       | ca. 57                 | Gwo et al. 1991          |
| Atlantic halibut   | NaCl            | Glycerol       | 86                     | Bolla et al. 1987        |
| Puffer             | 5.6% glucose    | 12% DMSO       | 47                     | Gwo et al. 1993          |
| Rainbow trout      | V2              | 7.5% DMSO      | 82                     | Stein and Bayrle 1978    |
| Coho salmon        | Extender 141    | 6.4% DMSO      | 77                     | Ott and Horton 1971      |
| Arctic charr       | 0.3 M glucose   | 20% glycerol   | ca. 75*                | Piironen 1993            |
| Whitefish          | 0.3 M glucose   | 20% glycerol   | 85.9                   | Piironen 1987            |
| Tilapia            | Fish ringer     | 5% methanol    | 93.4                   | Chao et al. 1987         |
| Sharptooth catfish | Extender 4      | 11% glycerol   | 51.2                   | Steyn and Van Vuren 1987 |
| Carp               | Fish ringer     | 15% DMSO       | 68.6                   | Kurokura et al. 1984     |

\* expression as percentages of the control.

and McAndrew 1989). Glycerol은 연어과 어류와 grouper 정자에 독성을 나타내는 것으로 알려져 있는데(Chao et al. 1992; Ott and Horton 1971; Scott and Baynes 1980; Stoss and Holtz 1983b), 자주복 정자에서는 사용된 4가지 동해방지제 중 glycerol이 가장 낮은 결과를 보여 자주복 정자에서도 독성을 나타내는 것으로 생각된다. 그러나 이 실험의 감성돔 정자에서는 효과가 좋았으며, yellowfin seabream, *Acanthopagurus australis*(Thorogood and Blackshaw 1992), Atlantic halibut(Bolla et al. 1987) 및 sharptooth catfish, *Clarias gariepinus*(Steyn and Van Vuren 1987), 감성돔(Chao et al. 1986) 등의 어종에서는 효율적인 동해방지제인 것으로 보고되어 있다. Erdahl et al.(1984)은 glycerol 첨가에 의해 정자가 받는 삼투압 충격을 최소화하고 생존율을 증가시키기 위해, 단계적인 glycerol의 첨가를 권장하였다. 송어와 황복 정자에 사용했을 때, 높은 수정률을 보였던 DMSO는 자주복의 경우에는 효과가 저조하였으나, 대부분의 해산어류에서 가장 널리 이용되고 있는 동해방지제이기도 하다(Chao et al. 1975; Gwo et al. 1991; Stoss and Holtz 1983c; Erdahl et al. 1984; Gwo et al. 1993; 黒倉 1984; Gwo 1994). 그러나 온수성 담수어종의 정자를 냉동보존할 때 DMSO는 동해방지제로 부적합한 것으로 알려져 있다(Harvey 1983). 자주복 정자의 냉동보존시 동해방지제로 DMSO, ethylene glycol, glycerol, methanol을 사용하였을 때, 평형시간이 짧을수록 해동 후 SAI와 생존율이 높았다. 이와 같은 결과는 감성돔 정자의 경우, DMSO를 사용하였을 때에도 평형시간이 짧을수록 해동후 정자의 활성이 높았다. 이것은 yellowfin seabream에서 동해방지제로 DMSO, glycerol, propylene glycerol, ethylene glycol, methanol을 사용하고 평형시간을 달리하였을 경우, 평형시간이 길어질수록 4가지의 동해방지제 모두에서 운동성이 낮아졌다는 Gwo(1994)의 연구 결과와 부합된다. 어류의 정자는 크기가 매우 작으므로 동해방지제가 세포내

로 빠르게 침투한다(Morisawa 1985). 따라서 동해방지제의 독성을 최소화하기 위해 평형시간을 가급적 짧게 하는 것이 일반화되어 있다(Gwo 1994). Harvey(1983)는 평형시간의 연장이 정자에게 치명적인 영향을 미치므로, 보존효과를 높이기 위해서는 정액과 희석액을 혼합한 즉시 냉동시키는 것이 안전하다고 보고하였다.

이 연구에서 자주복의 냉동정자를 30℃에서 해동하였을 때 SAI와 생존율이 가장 높은 것으로 나타나, cobia, *Rachycentron canadum* (Caylor et al. 1994)의 냉동정자를 28~37℃에서 해동하였을 때 가장 좋은 효과를 보였다는 결과와 일치하였다. 해동온도가 너무 낮을 경우, 세포내에 recrystallization이 일어나고, 반대로 너무 높을 경우에는 세포가 탈수된 물을 재흡수할 수 있는 시간을 충분히 갖지 못함으로 인해 동해를 입게 되며, 이에 따라 해동후의 정자활력이 감소한다(Jamieson 1991). BSA, lecithin, 단백질 및 계란난황 등의 유기물을 포함한 희석액은 냉동보존시 저온충격으로부터 정자를 보호하는 것으로 알려져 있으며, 연어과 어류 정자의 냉동보존에 널리 이용되고 있다(Gwo et al. 1991). 동해방지제로서의 효과를 나타내는 계란난황내의 lipoprotein은 소 정자의 세포막에 단단하게 결합하여 냉동과정 중에 발생하는 세포의 상해를 방지하는 것으로 알려져 있다(Baynes and Scott 1987; Babiak et al. 1995). 그러나 이러한 계란난황이나 BSA의 동해방지 효과는 어종, 정자 및 희석액의 구성에 따라 다르게 나타난다(Piironen 1993). Atlantic croaker에서는 sodium chloride에 BSA나 skim milk powder를 첨가하였으나 수정률을 상승시키지 못했고(Gwo et al. 1991), 계란난황의 동해방지 효과가 개체별 정액에 따라 다른 것으로 나타났다(Baynes and Scott 1987). 또한 Babiak(1995)은 northern pike, *Esox lucius* 정자의 냉동보존에서 Stoss and Holtz의 희석액과 Erdahl and Graham의 희석액에 계란난황을 첨가하였을 때, 각각 상반되는 효과가 나타났다고 보고하였다. 자주복에서도 각기 다른 4가지 희석액에

BSA와 계란난황을 첨가하였을 때, Cortland medium에서는 좋은 효과가 인정되었으나 Alsever's solution에서는 역효과가 나타났다.

냉동보존한 다음 해동한 대부분의 자주복과 황복 정자는 신선한 정자의 구조에 비해 별다른 차이를 보이지는 않았지만, 일부의 정자에서 세포막의 이탈을 관찰할 수 있었다. 송어와 감성돔의 정자에서는 복어류에 비해 좀 더 많은 정자가 손상을 받고 있었으며 손상되는 형태는 세포막의 이탈이나 염색질의 변화 등이 대부분이었다. Gwo et al.(1992)은 정자의 해동시 편모의 응축, 9+2 구조의 축사꼬임, 미토콘드리아 및 세포막 파괴 등은 해동후 운동성을 감소시키는 주원인이라고 밝혔다. 냉동에 의한 정자의 물리적 손상정도는 희석액의 조성, 동해방지제의 종류 및 농도, 냉동속도 및 해동온도 등에 의해 영향을 받는다. 따라서 앞으로는 정자가 받는 동해를 최소화시키기 위해 이러한 조건들에 대한 보다 심도있는 연구가 진행되어야 할 것이다.

여 백

## 제5장 결 론

해산어류 정자의 생리활성과 장·단기보존에 관한 연구결과를 어종별로 종합 정리하면 다음과 같다.

연구 재료였던 4종 어류에 있어서 정자농도는 광염성 어류인 송어와 담수에서 산란하는 황복에서 다른 두 어종에 비해 낮았으며, 자주복에서 가장 높았다. Spermocrit는 황복이 가장 낮아 담수에서 산란하는 어종의 특성을 보였으며, 삼투질농도에서도 역시 황복이 가장 낮았다. 정장의 pH는 4 어종 모두 pH 8 전후의 약 알칼리성을 나타냈다(Table 23).

Table 23. Properties of milt or seminal fluid in tiger puffer, river puffer, grey mullet, black seabream

| Properties  | Tiger puffer    | River puffer    | Grey mullet     | Black seabream   |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| Sperm concentration<br>( $\times 10^{10}/\text{ml}$ ) | $9.81 \pm 0.34$ | $1.13 \pm 0.27$ | $1.11 \pm 0.36$ | $2.88 \pm 0.92$  |
| Spermocrit  | $97.8 \pm 0.8$  | $64.8 \pm 1.3$  | $96.7 \pm 2.6$  | $97.4 \pm 2.1$   |
| pH*   | $8.2 \pm 0.2$   | -               | -               | $8.3 \pm 0.1$    |
| Osmolality*<br>(mOsm/kg)                              | $383.4 \pm 2.1$ | $266.0 \pm 2.0$ | -               | $382.0 \pm 70.0$ |
| seminal fluid   |                 |                 |                 |                  |

따라서 정자보존을 위한 희석액의 제조시 pH 및 삼투질농도와 같은 요인을 대상 어종의 정장과 비슷한 수준을 유지하는 일이 필수적이라고 생각된다. 정자의 활성 실험에서도 정장과 비슷한 희석액의 삼투질농도에서 정자의 초기 운동성은

낮았지만 운동 지속시간이 길게 나타나, 희석액의 삼투질농도가 정자보존에 있어 중요한 요인임을 알 수 있었다.

정자와 정장의 화학적 조성을 종합하여 보면, 4종 모두에서 총 단백질 함량은 서로 비슷한 수준이었으나, 복어류 정장만이 총 단백질 함량이 약간 낮았다. 정자의 총 지질 함량은 감성돔에서 높게 나타났으며, 정장에서는 송어가 높게 나타났다. 정자와 정장의 화학적 조성중 특이한 것은 자주복과 황복의 정자와 황복의 정장에서는 glucose가 거의 검출되지 않았다는 점이다. 따라서 앞으로는 복어류 정자와 정장에 존재하는 다당류의 검색과 복어류 정자의 당대사에 관한 세밀한 연구가 요구된다. Na 함량은 정자에서는 송어가, 정장에서는 황복이 높게 나타났고, K 함량은 정자에서는 자주복과 황복 및 감성돔이 비슷하였고, 정장에서는 황복이 다소 낮았다(Tables 24, 25).

Table 24. Chemical properties of spermatozoa in tiger puffer, river puffer, grey mullet and black seabream

| Properties              | Tiger puffer    | River puffer        | Grey mullet         | Black seabream      |
|-------------------------|-----------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Total protein (g/100ml) | 1.4<br>(1.4)    | 1.3~1.9<br>(1.6)    | 1.7<br>(1.7)        | 0.6~1.2<br>(1.2)    |
| Total lipid (mg/100ml)  | 27~33<br>(30.0) | 23~77<br>(41.8)     | 35~41<br>(38)       | 110~214<br>(161.9)  |
| Glucose (mg/100ml)      | ND              | ND                  | 1<br>(1)            | 1~10<br>(4.2)       |
| Na (mEq/ l)             | 48~49<br>(48.3) | 41~44<br>(42)       | 71.4~90.4<br>(82.8) | 33~42<br>(37.6)     |
| K (mEq/ l)              | 47~48<br>(47.3) | 43.8~45.5<br>(44.6) | -                   | 48.1~53.1<br>(49.6) |
| Ca (mEq/ l)             | -               | 0~0.4<br>(0.08)     | 4.1<br>(4.1)        | -                   |
| Mg (mEq/ l)             | -               | 5.5~17<br>(10.6)    | 12.4~22.0<br>(17.2) | -                   |

ND : not detectable

Table 25. Chemical properties of seminal fluid in tiger puffer, river puffer, grey mullet and black seabream

| Properties              | Tiger puffer     | River puffer       | Grey mullet           | Black seabream      |
|-------------------------|------------------|--------------------|-----------------------|---------------------|
| Total protein (g/100ml) | 0.1~0.2<br>(0.1) | 0.1<br>(0.1)       | 0.5~1.5<br>(0.9)      | 0.3~1.2<br>(0.89)   |
| Total lipid (mg/100ml)  | 82~89<br>(85.5)  | 13~40<br>(32.2)    | 123~352<br>(225.7)    | 37~67<br>(53.9)     |
| Glucose (mg/100ml)      | ND               | 0~2<br>(0.4)       | 0~5<br>(2)            | 1~30<br>(13.7)      |
| Na (mEq/ ℓ)             | 49~57<br>(50.0)  | 124~146<br>(130.7) | 93.5~114.6<br>(103.3) | 43~73<br>(56.9)     |
| K (mEq/ ℓ)              | 50~51<br>(50.3)  | 9.9~14.5<br>(12.3) | 38.5~76.7<br>(58.3)   | 33.7~49.8<br>(45.3) |
| Ca (mEq/ ℓ)             | -                | 0.5~4.2<br>(2.9)   | 8.5~16.5<br>(13.5)    | -                   |
| Mg (mEq/ ℓ)             | -                | 2.1~5.0<br>(3.2)   | 2.2~3.1<br>(2.7)      | -                   |

ND : not detectable

냉장(단기)보존 실험결과에서는 어종별 적정 희석액이 각기 다르게 밝혀짐으로써 종특이성을 나타냈다. 복어류의 경우 MFRS가 효과적이었으며, 송어와 갑성돔은 자체종의 혈청이 냉장보존을 위한 희석액으로 좋은 결과를 보였다. 이러한 결과는 희석액으로 사용된 MFRS나 혈청이 정자의 삼투질농도나 pH와 비슷한 수준이었기 때문이라고 생각된다. 즉 희석 후, 정장과 비슷한 삼투질농도나 pH에 의해 정자가 활성화 되지 않았으며, 보존중에도 삼투압이나 pH 차이에 의한 피해를 받지않았기 때문으로 보인다(Table 26).

Table 26. Results of cold storage in tiger puffer, river puffer, grey mullet, black seabream

| Species        | Diluent | Storing condition | SAI | Survival rate (%) | Fertilization rate (%) |
|----------------|---------|-------------------|-----|-------------------|------------------------|
| Tiger puffer   | MFRS    | 0±0.5°C, 7 days   | 1.7 | 59.0±1.5          | -                      |
| River puffer   | MFRS    | 0±1.0°C, 16 days  | 0.1 | -                 | 0.7±0.8                |
| Grey mullet    | Serum   | 0±1.0°C, 10 days  | 0.9 | -                 | -                      |
| Black seabream | Serum   | 0±1.0°C, 7 days   | 0.9 | 59.0±0.9          | 47.7±8.3               |

MFRS : marine fish ringer solution. SAI : sperm activity index.

냉동(장기)보존 결과, 자주복에서는 희석액으로 Alsever's solution을 사용하고 동해방지제로 15% ethylene glycol을 사용할 때 효과적이었으며, 황복과 송어에서는 희석액으로 MFRS를 사용하고 동해방지제로 DMSO를 사용할 때 보존 성적이 좋았다. 송어의 경우 냉동보존한 정자를 이용하여 인공수정시킨 후 배 발생을 관찰하였을 때, 신선한 정자에 의해 수정된 알의 배 발생과정과 차이를 나타내지 않았다. 감성돔에서는 희석액으로 5% glucose를 사용하고 동해방지제로 5% glycerol을 사용할 때 높은 수정률을 보였다(Table 27).

이 사업의 연구에서는 자연산란이 어려워 현장에서 어획되는 어미 어류에서 나타나는 암수간 성비의 불균형에 따른 채란과 채정의 어려움을 극복하고, 산란·방정 시기가 서로 일치하지 않을 때 애로를 겪는 인공수정 작업을 가능하게 하는데 중점을 두었다.

이 사업에서 얻어진 연구결과를 활용하면, 국·공립수산종묘배양장과 사립종묘배양장에서 자연채란이 어려운 복어류, 송어 및 감성돔의 종묘생산시 보다 효과적인 인공수정이 가능해 질 것이다. 앞으로 다른 유용 수산동물 정자까지 대량보

존 방법이 확립된다면, 우수한 형질을 가진 어미의 정자를 대량 보존하여 필요로 하는 양식가에게 분양해 줄 수 있는 시스템을 구축할 수 있다.

이 연구의 결과를 토대로 현재 자주복과 황복, 숭어, 감성돔, 능성어 및 넙치 등 6종 어류의 정액을 확보하여 냉동(장기)보존하고 있다(Table 28).

Table 27. Desirable method in sperm of cryopreservation of tiger puffer, river puffer, grey mullet and black seabream

| Species        | Diluent            | Cryoprotectant      | SAI | Survival rate (%) | Fertilization rate (%) |
|----------------|--------------------|---------------------|-----|-------------------|------------------------|
| Tiger puffer   | Alsever's solution | 15% ethylene glycol | 2.7 | 59.0±0.9          | -                      |
| River puffer   | MFRS               | 5% DMSO             | -   | -                 | 79.3±6.5               |
| Grey mullet    | MFRS               | 10% DMSO            | -   | -                 | 60.2±4.3               |
| Black seabream | 5% glucose         | 5% glycerol         | 1.2 | 59.3±8.2          | 69.4±7.4               |

MFRS : marine fish ringer solution. SAI : sperm activity index.

Table 28. Cryopreserved milt volumes in six marine fishes

| Freezing method  | Fish     | Tiger puffer       | River puffer | Grey mullet | Black seabream | Grouper     | Flounder |
|------------------|----------|--------------------|--------------|-------------|----------------|-------------|----------|
|                  | Diluent  | Alsever's solution | MFRS         | MFRS        | 5% glucose     | MFRS        | MFRS     |
| Cryoprotectant   | 15% EG   | 5% DMSO            | 10% DMSO     | 5% glycerol | 10% DMSO       | 10% DMSO    |          |
| Milt volume (ml) | 25       | 70                 | 185          | 70          | 4              | 8           |          |
| Origin breeder   | Cultured | Natural            | Natural      | Cultured    | Cultured       | Pseudo-male |          |

MFRS : marine fish ringer solution, EG : ethylene glycol, DMSO : dimethyl sulfoxide

냉동보존중인 정액은 액체질소의 보충에 의해 영구보관이 가능하므로 수년간 장기보존하면서 앞으로 종묘생산업에 종사하는 사업자의 요구가 있을 경우, 무상으로 제공할 것이며 장기보존 효과를 검토하는 데에 이용할 계획이다. 이 연구에서 냉동보존 방법이 확립된 어종들은 종묘생산 현장에서 이용할 수 있도록 지속적으로 정액을 채취하여 대량보존할 계획이며, 이 방법을 현재까지 자연산란이나 친어의 구입이 어려운 다른 어종의 정액까지도 확대하여 보존하고자 한다.

앞으로는 송어와 복어류 외에 현재 양식되거나 양식 가능한 넙치, 가자미류, 돔류 및 농어 등에서도 적합한 정자보존 방법을 쉽게 구명할 수 있을 것이다. 특히 최근에는 환경오염으로 인한 국내 담수어의 많은 종이 멸종 위기에 처해있으며, 해산어의 경우 연안역의 오염이나 남획으로 인하여 자연 자원량이 급격히 감소하고 있는 실정이다. 따라서 절멸 위기에 처한 어종의 종 보존 뿐만 아니라 재래종과 우량종의 종 보존이 시급한 실정이다. 이와 같이 열악한 어류자원의 보전을 위하여 본 연구에서 개발된 정자보존 기법을 토대로 한 어류자원의 생산증대와 종 보존을 위한 「어류 정자은행」의 구축에 관한 후속 연구 사업과제가 발굴·시행되도록 별도의 조치를 건의한다.

그리고 장기적인 안목에서 유용 수산생물의 수정란 보존에 관한 기초 연구도 이루어져야할 시점이 되었다. 앞으로는 양식동물의 배우자 보존기술의 개발로 연중 어느 때나 종묘생산이 가능하도록 하는 연구에 재정과 인력의 꾸준한 뒷받침이 있어야 할 것이다.

## 제6장 참고문헌

- Aas, G.H., T. Refstie and B. Gjerde. 1991. Evaluation of milt quality of Atlantic salmon. *Aquaculture* 95, 125~132.
- Babiak, I., J. Glogowski, M.J. Luczynski, D. Kucharczyk and M. Luczynski. 1995. Cryopreservation of the milt of the northern pike. *J. Fish Biol.* 46, 819~828.
- Barrett, I. 1950. Fertility of salmonid eggs and sperm after storage. *J. Fish. Res. Board. Can.* 8, 125~133.
- Baynes, S.M. and A.P. Scott. 1987. Cryopreservation of rainbow trout spermatozoa : the influence of sperm quality, egg quality and extender composition on post-thaw fertility. *Aquaculture* 66, 53~67.
- Blaxter, J.H.S. 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.
- Bolla, S., I. Holmefjord and T. Refstie. 1987. Cryogenic preservation of Atlantic halibut sperm. *Aquaculture* 65, 371~374.
- Bouck, G.R. and J. Jacobson. 1976. Estimation of salmonid sperm concentration by microhematocrit technique. *Trans. Am. Fish. Soc.* 105, 534~535.
- Buyukhatipoglu, S. and W. Holtz. 1984. Sperm output in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) - Effect of age, timing and frequency of stripping and presence of females. *Aquaculture* 37, 63~71.
- Caylor, R.E., P.M. Biesiot and J.S. Franks. 1994. Culture of cobia (*Rachycentron canadum*) : cryopreservation of sperm and induced spawning. *Aquaculture*

125, 81~92.

Chao, N.H., W.C. Chao, K.C. Liu and I.C. Liao. 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.

Chao, N.H., W.C. Chao, K.C. Liu and I.C. Liao. 1987. The properties of tilapia sperm and its cryopreservation. J. Fish Biol., 30, 107~118.

Chao, N.H., H.P. Chen and I.C. Liao. 1975. Study on cryogenic preservation of grey mullet sperm. Aquaculture 5, 389~406.

Chao, N.H., H.P. Tsai and I.C. Liao. 1992. Short- and long-term cryopreservation of sperm and sperm suspension of the grouper, *Epinephelus malabaricus* (Bloch and Schneider). Asian Fish. Sci. 5, 103~116.

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.

Craik, J.C.A. 1985. Egg quality and egg pigment content in salmonid fishes. Aquaculture 47, 61~88.

Cruea, D.D. 1969. Some chemical and physical characteristics of fish sperm. Trans. Ame. Fish. Soc. 98, 785~788.

Doi, M., T. Hoshino, Y. Taki and Y. Ogasawara. 1982. Activity of the sperm of the bluefin tuna *Thunnus thynnus* under fresh and preserved conditions. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 48(4), 495~498.

Emeljanova, N.G. and A.P. Makeeva. 1985. The ultrastructure of spermatozoa in some cyprinid fishes (Cyprinidae). Voprosy Ichtiol. 25(3), 461~468.

Erdahl, A.W., D.A. Erdahl and E.F. Graham. 1984. Some factors affecting the

- preservation of salmonid spermatozoa. *Aquaculture* 43, 341~350.
- Erdahl, A.W. and E.F. Graham. 1987. Fertility of teleost semen as affected by dilution and storage in a seminal plasma-mimicking medium. *Aquaculture* 60, 311~321.
- Fribourgh, J. H. 1966. The application of a differential staining method to low-temperature studies on goldfish spermatozoa. *Prog. Fish-Cult.* 28, 227~231.
- Gwo, J.C. 1994. Cryopreservation of yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*) spermatozoa. *Theriogenology* 41, 989~1004.
- Gwo, J.C. and C.R. Arnold. 1992. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa : Evaluation of morphological changes. *J. Exp. Zoo.* 264, 444~453.
- Gwo, J.C., H. Kurokura and R. Hirano. 1993. Cryopreservation of spermatozoa from rainbow trout, common carp, and marine puffer. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59, 777~782.
- Gwo, J.C., K. Strawn, M.T. Longnecker and R. Connie. 1991. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa. *Aquaculture* 94, 355~375.
- Hara, S., J.T. Canto and J.M.E. Almendras. 1982. A comparative study of various extenders for milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal), sperm preservation. *Aquaculture* 28, 339~346.
- Harvey, B. 1983. Cryopreservation of *Sarotherodon mossambicus* spermatozoa. *Aquaculture* 32, 313~320.
- Hwang, P.C. and D.R. Idler. 1969. A study of major cations, osmotic pressure, and pH in seminal components of Atlantic salmon. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 26, 413~419.
- Jamieson, B.G.M. 1991. Fish evolution and systematics : Evidence from

- spermatozoa. Cambridge University Press, New York, pp. 319.
- Kashiwagi, M., H. Sakaki, T. Takahashi and T. Iwai. 1987. A relationship between egg size and hatching rate in Japanese whiting *Sillago japonica*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 53, 2105~2110.
- Kruger, J.C.De W., G.L. Smit, J.H.J. Van Vuren and J.T. Ferreira. 1984. Some chemical and physical characteristics of semen of *Cyprinus carpio* L. and *Oreochromis mossambicus* (Petter). *J. Fish Biol.* 24, 263~272.
- Kurokura H. and R. Hirano. 1980. Cryopreservation of rainbow trout sperm. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 46(12), 1493~1495.
- Kurokura, H., R. Hirano, M. Tomita and M. Iwahashi. 1984. Cryopreservation of carp sperm. *Aquaculture* 37, 267~273.
- Lahnsteiner, F., R.A. Patzner and T. Weismann. 1994. The testicular main ducts and the spermatic ducts in some cyprinid fishes. II. Composition of the seminal fluid. *J. Fish Biol.* 44, 459~467.
- 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.
- Linhart, O., V. Slechta and T. Slavik. 1991. Fish sperm composition and biochemistry. *Bull. inst. zool., Academia Sinica, Monograph* 16, 285~311.
- McNiven, M.A., R. K. Gallant and G. F. Richardson. 1993. Fresh storage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen using a non-aqueous medium. *Aquaculture* 109, 71~82.
- Morisawa, M. 1985. Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleosts. *Zool. Sci.* 2, 605~615.
- Mounib, M.S., P.C. Hwang and D.R. Idler. 1968. Cryogenic preservation of

- Atlantic cod (*Gadus morhua*) sperm. J. Fish. Res. Bd. Can. 25, 2623~2632.
- Munkittrick, K., R. and R.D. Moccia. 1987. Seasonal changes in the quality of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) semen : Effect of a delay in stripping on spermatocrit, motility, volume and seminal plasma constituents. Aquaculture 64, 147~156.
- Ohta, H. and T. Izawa. 1996. Diluent for cool storage of Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. Aquaculture 142, 107~118.
- Ott, A.G. and H.F. Horton. 1971. Fertilization of steelhead trout (*Salmo salar*) egg with cryo-preserved sperm. J. Fish. Res. Bd. Can. 28. 1915~1918.
- Piironen, J. 1985. Variation in the properties of milt from the finfish landlocked salmon (*Salmo salar m. sebago* Girard) during a spawning season. Aquaculture 48, 337~350.
- Piironen, J. 1987. Factors affecting fertilization rate with cryopreserved sperm of whitefish (*Coregonus muksun* Pallas) during a spawning season. Aquaculture 66, 347~357.
- Piironen, J. 1993. Cryopreservation of sperm from brown trout (*Salmo trutta m. lacustris* L.) and arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). Aquaculture 48, 337~350.
- Rana, K.J. and B.J. McAndrew. 1989. The viability of cryopreserved tilapia spermatozoa. Aquaculture 76, 335~345.
- Saad. A., R. Billard, M.C. Theron and M.G. Hollebecq. 1988. Short-term preservation of carp (*Cyprinus carpio*) semen. Aquaculture 71, 133~150.
- Scott, A.P. and S.M. Baynes. 1980. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. J. Fish Biol. 17, 707~739.
- Steyn, G.J. and J.H.J. Van Vuren. 1987. The fertilizing capacity of

- cryopreserved sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*) sperm. *Aquaculture* 63, 187~193.
- Stoss, J., S. Buyukhatipoglu and W. Holtz. 1978. Short-term and cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) sperm. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* 18, 1077~1082.
- Stoss, J. and T. Refstie. 1983. Short-term storage and cryopreservation of milt from Atlantic salmon and sea trout. *Aquaculture* 30, 229~236.
- Stoss, J. and W. Holtz. 1983a. Successful storage of chilled rainbow trout (*Salmo gairdneri*) spermatozoa for up to 34 days. *Aquaculture* 31, 269~274.
- Stoss, J. and W. Holtz. 1983b. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. III. Effect of proteins in the diluent, sperm from different males and interval between sperm collection and freezing. *Aquaculture* 31, 275~282.
- Stoss, J. and W. Holtz. 1983c. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. IV. The effect of DMSO concentration and equilibration time on sperm survival, sucrose and KCl as extender components and the osmolarity of the thawing solution. *Aquaculture* 32, 321~330.
- Strussmann, C.A., P. Renard, H. Ling and F. Takashima. 1994. Motility of pejerrey, *Odontesthes bonariensis* spermatozoa. *Fish. Sci.* 60, 9~13.
- Suquet, M., G. Dorange, M.H. Omnes, Y. Normant, A. LeRoux and C. Jauvel. 1993. Composition of the seminal fluid and ultrastructure of the spermatozoa of turbot (*Scophthalmus maximus*). *J. Fish Biol.* 42, 509~516.
- Suquet, M., M.H. Omnes, Y. Normant and C. Fauvel. 1992. Assessment of sperm concentration and motility in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*. 101, 177~185.
- Thorogood, J. and A. Blackshaw. 1992. Factors affecting the activation, motility

and cryopreservation of the spermatozoa of the yellowfin bream, *Acanthopagrus australis* (Gunther). *Aquacult. Fish. Manag.* 23. 337~344.

Tiersch, T.R., C.A. Goudie and G.J. Carmichael. 1994. Cryopreservation of channel catfish sperm: storage in cryoprotectants, fertilization trials, and growth of channel catfish produced with cryopreserved sperm. *Trans. Am. Fish. Soc.* 123, 580~586.

Truscott, B., D.R. Idler, R.J. Hoyle and H.C. Freeman. 1968. Sub-zero preservation of Atlantic salmon sperm. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 25. 363~372.

Wilmot, I. and C. Polge. 1977. The low temperature preservation of boar spermatozoa: The motility and morphology of boar spermatozoa frozen and thawed in diluent which contained only sugar and egg yolk. *Cryobiology* 14, 479~482.

Yamamoto, T. 1976. Fertilizing capacity of dog salmon spermatozoa in Ringer's solution, with special reference to the effect of dilution. *Jpn. J. Ichthyol.* 23, 88~92.

Zar, J.H. 1984. *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall Inc. Englewood Cliffs, N.J., pp. 620.

清野通康. 1974. 魚類の成熟と産卵. 恒星社厚生閣, 東京, 日本. 127pp.

黒倉壽. 1984. ニシキゴイ精液の長期保存. *水産増殖* 32, 148~152.

奥村重信・廣瀬慶二. 1991. 凍結保存精子によるアマダイの人工受精. *水産増殖* 39, 441~445.

由岐英剛. 1984. *生化学分析法*. 南江堂, 東京, pp. 496.

# 보도자료

1. “해산어류 정자의 생리활성과 장·단기보존”에 관한 연구결과를 보도한

1997년 12월 24일자 「부산일보」의 기사 내용

## 물고기 정자 냉동보존 기술 개발

### 장기보관 후 인공수정... 양식어류 증묘생산 '청신호'

#### 부경대 연구팀

물고기 정자를 신재로 냉동보존하는 방법이 국내 최초로 개발됐다. 부경대 양식학과 장영진교수 연구팀은 농림수산기술관리센터 특장 연구원장예로시영 일환으로 바다 물고기의 자연번식과 유전자적 증보보존을 위해 정자를 장기간 냉동보존한 뒤 인공수정시킴으로써 성공을 개발하는데 성공했다고 밝혔다. 의학이나 축산분야에서는 시험관 아기 및 우량젖소의 생산을 위해 「정자은행」이 일반화됐으나 번은 동물로 알과 정자가 물결 매개로 번식하는 물고기는 양식용 어류 증묘 생산을 위해 우량한 어미의 알과 정자가 대량으로 필요에도 최근까 지 정자보존기술이 개발되지 않아 어려움을 겪어왔다.

연구팀은 이에 따라 보존방법이 비교적 수월한 정자를 신재로 냉동 보존하였다가 수정에 이용하면 양식용 증산 문제를 해결할 수 있고 물고기의 우량형질을 보존하거나 집종을 만들 때 성숙시기의 차이점



송어등 물고기로부터 정액을 채취, 냉동보존시키는 기술이 개발됐다.

등을 쉽게 해결할 수 있는 정자냉동보존기술을 개발했다. 연구팀은 상숙한 수컷 물고기로 부터 정액을 채집, 정자에 영양을 공급해주는 희석제와 동결도 인한 손상을 없애주는 동해방지제를 섞

김쪽김이 삶아나 알과 수정할 수 있는 상태로 된다고 밝혔다. 이번 정자냉동보존기술은 환경오염으로 멸종되고있는 산천어 열목어 등 희귀한 물고기의 증보보존에도 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

한편 지금까지 자연산어미로부터 알과 정자를 채취하여 인공수정에 이용하는 복어 송어 등과 같은 물고기는 정은 어미고기의 성비가 불균형하거나 암수의 신란·방정이 일치하지 않을 경우 인공수정조차 불가능했다. 특히 농성어의 같은 고급어종은 처음에 모두 암컷이었던 것이 7년 이상 양식장에서 키워야 수컷으로 성전환하기 때문에 수컷어미를 구하기 어려워 양식용 증묘생산기술이 개발되지 못했다.

장교수는 '앞으로 물고기 정자은행을 설치, 수산양식업계가 필요할 때 수시로 분양할 수 있는 체제를 세우겠다'며 '물고기 수정란의 냉동보존방법 개발연구도 최우선과제'라고 밝혔다. <이병렬기자>

## 2. “해산어류 정자의 생리활성과 장·단기보존”에 관한 연구결과를 보도한

1997년 12월 30일자 「동아일보」의 기사 내용



### 캠퍼스 신책

#### 부산지역 대학 통기타 동아리 연합콘서트

○...부산지역 대학 통기타 음악동아리들이 내년 1월 3, 4일 남구 대연동 가람아트홀에서 연합콘서트를 연다.

부산여대 하늬비, 동의대 무드, 부경대 송웨이브, 인제대 안단체, 경성대 여운, 동아대 F.G.C, 해양대 파도소리, 고신대 하안들꽃, 부산외대 미네르바 등 9개 동아리들은 이날 가요와 팝송 연주곡 등을 라디오 음악프로 진행방식으로 선보인다.

#### 유기농배추 장점 발표

○...부산대 식품영양학과 박건영교수 연구팀은 29일 농약과 화학비료를 사용하지 않고 재배한 유기배추로 김치를 담그면 일반 배추로 담갔을 때보다 맛과 저장기간에 큰 이점이 있다는 것을 과학적으로 입증했다고 발표.

#### 물고기정자 냉동보존

○...부경대 양식학과 정영진교수 연구팀은 최근 물고기 정자를 산채로 냉동보존하는 방법을 국내 최초로 개발.

장교수팀은 성숙한 수컷 물고기로부터 정액을 채집, 정자에 영양을 공급해주는 희석제와 동결로 인한 손상을 없애주는 동해방지제를 섞어 1차로 완만하게 동결한 뒤 영하 1백96도의 액체 질소에 투입해 급속동결하면 정자의 파괴가 거의 없다고 밝혔다.

동결된 정액은 40도 정도의 온수에 녹이면 사용이 가능해 환경오염으로 멸종되고 있는 산천어 열목어 등 희귀한 물고기의 종보

존에도 유용하게 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

#### 내년 대학등록금 동결

○...경남대는 최근 간부회의를 열고 학부모들의 경제적 부담을 덜어주기 위해 98학년도 등록금을 올리지 않기로 하는 한편 경제위기에 교직원들도 동참한다는 취지에 따라 내년도 급여를 전면 동결키로 결정.

이와 함께 내년 예산을 초긴축으로 편성하고 물자절약과 경비절감 운동을 지속적으로 전개할 계획.

#### 특별전형 경쟁률 2.63:1

○...남해전문대가 자격증소지자 등을 대상으로 신입생을 뽑는 「독자기준 특별전형」의 원서를 접수한 결과 76명 모집에 2백명이 지원, 평균 2.63대 1의 경쟁률을 기록.

#### 특수대학원 모집 요강

○...울산대(총장 구본호)가 29일 내년도 특수대학원 학생모집 요강을 발표했다.

신입생 모집대상은 경영대학원과 지역개발대학원 산업기술대학원 정보통신대학원 등 4개 대학원이며 5학기 석사과정을 이수하면 석사학위가 주어진다. 경영대학원과 산업기술대학원은 1년 수료과정도 개설된다.

원서교부는 1월 5~14일이며 전형은 16, 17일.

〈부산·창원·울산=석동빈·강정훈·정재락기자〉

3. “해산어류 정자의 생리활성과 장·단기보존”에 관한 연구결과를 방송한  
1997년 12월 24일자 KBS 뉴스네트워크 및 KBS9 뉴스 화면

