무지개 松魚의 遺傳 育種學的 硏究

Ⅶ. 凍結保存시킨 精子와 新鮮한 卵母細胞의 受精 및 微細構造的 變化

朴弘陽 · 尹鍾萬
建國大學校 畜産學科 動物 遺傳 育種學 硏究室

Studies on Genetics and Breeding in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Ⅶ. Fertilization of Fresh Egg with Cryo-Preserved Sperm and Ultrastructural Changes

Hong-Yang PARK and Jong-Man YOON
Animal Resources Research Center, Department of Animal Science, Kon-Kuk University, Seoul 133-701, Korea

This study was carried out to develop new techniques useful for cryopreservation, thawing and artificial insemination, and ultrastructural changes of cryopreserved spermatozoa in rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*). Two extenders, such as Tyrode solution and Whittingham's T_6 solution, were used to preserve rainbow trout sperm in refrigerator(-20, -40 and -70℃) or liquid nitrogen(-196℃). Hand-stripped semen was diluted to 1:16 with two extenders, an then the semen were frozen after mixing semen and each extender containing 1M or 1.5M DMSO solution to 1:1. After 60 days cryopreserved semen was thawed in a 13℃ water bath, and subsequently centrifugated. After centrifugation at 1,000 rpm for 5 min thawed semen was washed with extenders, and then fertilized with fresh eggs.

The results obtained in these experiments were summarized as follows:

After cryopreservation, over 75% of spermatozoa were appeared motile and the survival rate was high. Following cryopreservation by the addition of cryoprotectant such as DMSO, methanol and glycerol, the fertilization rate of the thawed spermatozoa appeared over 99% compared with the control having 99% of fertilization rate. There was no difference between the control and experimental groups such as -20℃, -40℃, -70℃ and -196℃ in fertilization rate.

Following cryopreservation at -196℃ by the addition of 1M DMSO of cryoprotectant, each fertilization rate following 24 hours and hatching rate following 24 days showed 96% and 8% by the addition of BSA, but showed 98% and 10% by no addition of BSA.

Following 2 months of cryopreservation by the addition of 1M DMSO of cryoprotectant, there were 10% of hatching rate at -196℃ and 10% and 35%, respectively, at -40℃ and -70℃. Following 2 months of cryopreservation by the addition of 1M methanol of cryoprotectant, there were 22% of fertilization rate at -20℃, and 28%, at -70℃.

Following 2 months of cryopreservation by the addition of 1M glycerol of cryoprotectant, there were 22% of fertilization rate at -20℃, and 33%, at -70℃. Following 2 months of

cryopreservation by the addition of 1.5M DMSO of cryoprotectant, there were 27% of fertilization rate at -20℃, an 36% and 35%, respectively, at -40℃ and -70℃. Following 2 months of cryopreservation by the addition of 1.5M glycerol of cryoprotectant, there were 34% of fertilization rate at -20℃, and 31% and 31%, respectively, at -40℃ and -70℃.

Following 2 months of cryopreservation by the addition of 1.5M methanol of cryoprotectant, there were 28% of fertilization rate at -20℃, and 29% and 28%, respectively, at -40℃ and -70℃. From 10 days and 15 days following fertilization at 13℃ and 10℃, respectively, the mortality rate of fertilized ova was markedly increased.

The middle piece of spermatozoa had two set of central doublets, nine set of outer coarse fibres, and mitochondrial sheath. Spermatozoa went through morphological changes during storage, *e.g.* winding of flagella, detachment of the nuclear envelope and the plasma membrane from the nucleus of the sperm head. There were 1% abnormal spermatozoa in fresh sperm and about 15% during storage.

緒　　論

精子를 오랜 期間동안 保存한 후 필요시에 이용할 수 있는 技術이 畜産 및 인간에서는 이미 一般化되어 選拔 育種 및 不姙 等에 활용되고 있으며, 魚類에 있어서도 많은 硏究가 이루어져 왔다.

凍結保存된 精子와 新鮮한 卵子를 受精시켰을 때 受精率에 관해서 Mounib *et al*(1968)은 대서양 대구에서 精子를 -196℃에서 60日동안 凍結保存시켰을 때 36~48%의 受精率을 얻어냈다고 하였고, Ott and Horton(1971)은 LN_2에서 7日동안 凍結시킨 chinnok salmon 및 은연어에서 38%로부터 最高 70%의 受精率을 얻었다고 報告하였다. 孵化率에 미치는 영향에 있어서 Haga(1982)는 무지개 松魚의 경우 -7℃에서 保存時 95%의 孵化率을, -12℃에 保存한 경우에는 14%의 孵化率을 각각 나타내었다고 報告하였으며, Hulata and Rothbard(1979)는 잉어의 精液을 凍結保存時, 5℃의 凍結溫度에서 45시간동안 保存시킨 후 受精 및 孵化時 受精率과 孵化率에 있어서 新鮮한 精液과 差異가 없다고 하였다. 또한 凍結時 利用되는 稀釋液에 대하여는 Truscott and Idler(1969)이 大西洋 연어, Hara *et al* (1982)이 milkfish, Larsen *et al*(1984)이 철갑상어 等에서 報告한 바 있고, Jensen and Alderdice (1984)는 chum salmon(*Oncorhynchus keta*)의 精子 및 卵子의 短期間 保存時 미치는 溫度에 관하여, 그리고 Saad *et al*(1988)은 잉어 정자를 단기간 보존시 나타나는 頭部의 核膜과 尾部의 꼬임 等의 변화를 電子顯微鏡的 방법을 통하여 관찰 보고한 바 있다.

이와같이 外國의 경우 魚類 精子를 凍結保存시키고자 하는 試圖가 많이 이루어진 반면에 國內에서는 家畜의 精子 및 卵子에 관한 보고는 많으나, 魚類에 대해서는 거의 없는 實情이다. 따라서 國內에서 商業的 附加價値가 높고, 精子 및 卵子의 취급이 容易한 무지개 송어를 대상으로 精子의 稀釋倍率, 稀釋時 使用되는 培養液, 凍害防止劑(DMSO, glycerol, methanol)의 適當한 濃度, 凍結保存 溫度, 解凍時 適當한 溫度 等과 같은 魚類精子의 凍結保存에 관한 技術을 確立하여 보급시키므로써 송어의 人工受精 및 孵化를 어느 때라도 가능케 하여 무지개 송어 수컷의 飼育頭數를 줄여 飼料費, 人件費, 施設費, 敷地 等을 節減케 할 뿐만 아니라, 遺傳·育種學的인 면에서 어류의 品種改良 및 우리나라에서 서식하지 않는 高級魚種이나 稀貴魚種에 대한 移植 및 繁植效率에 寄與하고자 本 硏究를 實施하였다.

材料 및 方法

1. 材　料

1.1. 供試精液

建國大學校 畜産大學 附設 養魚場에서 飼育中인 生殖巢熟度指數(GSI)가 平均 4.86%인 3年生 무지개 松魚 수컷으로 부터 採取된 精子의 濃度가 $10\times10^8-15\times10^8$이고, 生存率 및 生存指數가 各各 75% 및 75 以上인 條件의 精液을 使用하였다.

1.2. 稀釋液과 凍害防止劑의 調製

Table 1에서와 같이 滲透壓 300mOsmol, pH가 7.4인 Tyrode 溶液과 Whittingham's T_6를 稀釋液으로 利用하였고, DMSO(Dimethyl sulfoxide), methanol, glycerol을 凍害防止劑로 利用하였다.

1.3. 解凍後 精子의 運動性 確認

Table 1. Ingredients of extenders used in present study for cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm

COMPONENTS	EXTENDER I	EXTENDER II
NaCl(*g*)	8.00	5.719
KCl(*g*)	0.20	0.106
$NaHCO_3$(*g*)	1.00	2.101
$CaCl_2$(*g*)	0.20	0.262
$MgCl_2$	0.10	0.096
NaH_2PO_4	0.05	
Glucose(*g*)	1.00	1.000
BSA(*g*)	3.00	
Na_2HPO_4		0.0511
Na-Pyruvate(*g*)		0.052
Na-Lactate(*g*)		2.791
Streptomycin(*g*)		0.050
Phenol red		0.005
mOsmol	300	300
pH	7.4	7.4

EXTENDER I : Tyrode's solution,
EXTENDER II : Whittingham's T_6

Fig. 1과 같은 前處理 과정을 거친 精液을 解凍後, 稀釋液인 Tyrode 溶液을 1:2倍로 稀釋시킨다음 光學顯微鏡下에서 精子의 運動性을 調査하였다.

2. 方 法

2.1. 稀釋 方法

精液의 稀釋方法으로 두가지 方法을 사용하였는데, 첫번째 方法으로 똥이나 血液 等 異物質이 除去된 純粹한 精液을 凍結保存劑인 1M DMSO가 混合된 Tyrode나 Whittingham's T_6 培養液을 利用하여 1:1의 比率로 천천히 흔들어서 稀釋시킨 다음, cryo-tube에 1*ml*씩 넣어 -196℃의 冷凍窒素 탱크에 2個月동안 凍結시켰고, 두번째 방법은 위에서와 마찬가지로 똥이나 血液 等 異物質이 除去된 純粹하고 成熟된 精液과 Tyrode 培養液을 각각 1:1의 比率로 천천히 흔들어서 稀釋, 混合시킨 다음 凍結保存劑인 1M DMSO, 1M glycerol, 1M methanol과 1.5 M DMSO, 1.5M glycerol, 1.5M methanol이 混合된 15*ml* 試驗管에 13*ml*씩 넣어 각각 -20℃, -40℃, -70℃의 冷凍室에서 1年 혹은 2個月동안 凍結시켰다.

2.2. 精液의 凍結 및 解凍 方法

Fig. 1과 2는 각각 PLANER BIOMED(KRYO 10 SERIES, U.S.A, autoseeder Model AS-1D, controller Model 10~20, chamber Model 10~17)를 使用하여 精液을 -196℃까지 빠른 時間內에 단계별로 急速凍結시키는 方法과 常溫狀態의 精液을 -20℃, -40℃, -70℃인 冷藏庫의 冷凍室에 直接 넣어 凍結시키는 方法이고, Fig. 3과 4는 -196℃와 -20℃, -40℃, -70℃에 각각 凍結된 精液을 解凍시키는 過程을 나타낸 것으로서 解氷 速度는 모두 遲延 方法이 利用되었다.

2.3. 正常的인 卵子와 凍結保存시킨 精子의 人工受精에 따른 受精率 및 孵化率

本 大學 養魚場에서 飼育되고 있는 3年生 무지개 松魚 암컷으로 부터 卵子를 採取한 후 冷凍保存後 13℃에서 解凍시킨 精子와 人工受精시킨 다음 10分이 經過한 後의 受精卵의 異狀有無로서 受精率을, 24日 以後에 孵化된 個體數를 把握함으로서 孵化

Collection of semen from sexual rainbow trout male.
▼
Dilute semen with media containing cryoprotectant 1M DMSO sol.
▼
Semen temperature reduce 5℃ per minute down to 4℃
▼
Holding for 5 minutes at 4℃.
▼
Reduce 1℃ per minute down to -30℃.
▼
Reduce 2℃ per minute down to -60℃.
▼
Immediately cryopreserve in -196℃ aqueous nitrogen tank for 2 months.

Fig. 1. Process of cryopreservation of rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*) semen in -196℃ aqueous nitrogen tank by PLANER BIOMED.

Collection of semen from sexual rainbow trout male.

▼

Dilute semen with media containing cryoprotectant 1M or 1.5M DMSO sol.

▼

Slowly shaking for 10 minutes at room temperature.

▼

Immediately cryopreserve in -20℃, -40℃, -70℃ refrigerator for 2 months.

Fig. 2. Process of cryopreservation of rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*) semen in -20℃, -40℃ and -70℃ refrigerator for 2 months.

After taking from -196℃ aqueous nitrogen tank.

▼

Immediately thawing in 13℃ water bath for 2 hours.

▼

Centrifugate for 5 min. at 1,000 rpm.

▼

After decanting supernatant, washing 2−3 round by media.

▼

Recentrifugate for 5 min. at 1,000 rpm.

▼

After decanting supernatant, washing 2−3 round by media.

▼

Dilution to 5 times by media.

▼

Fertilization of fresh eggs with cryopreserved sperm.

Fig. 3. Process of thawing of -196℃-cryopreserved semen by 13℃-coldwater in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

After taking from -20℃, -40℃ an -70℃ refrigerator.

▼

Immediately thawing in 13℃ water bath for 1 hours.

▼

Centrifugate for 20 min. at 1,000 rpm.

▼

After decanting supernatant, washing 2−3 round by media.

▼

Recentrifugate for 5 min. at 1,000 rpm.

▼

After decanting supernatant, washing 2−3 round by media.

▼

Dilution to 5 times by media.

▼

Fertilization of fresh eggs with cryopreserved sperm.

Fig. 4. Process of thawing of -20℃, -40℃, -70℃-cryopreserved semen by 13℃-coldwater in rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*).

率을 각각 計算, 確認하였다.

2.4. 透過電子 顯微鏡(TEM)에 의한 觀察

精漿이 제거된 精子를 pH 7.3인 0.1M phosphate buffer가 包含된 3% glutaraldehyde 溶液에 固定시키고, 2時間동안 1% osmium 溶液으로 後固定시킨 다음, 1時間동안 여러가지 濃度의 ethanol 溶液으로 계속해서 脫水시켰다. 그리고 Epon 812로 봉매(embedding)하여, ultramicrotome(No. 2088, LKB, BROMMA, Sweden)으로 50nm로 얇게 잘라서, uranyl acetate와 lead citrate로 染色시킨다음 電子顯微鏡(ISI-LEM 2000, Japan)으로 70kv의 電壓에서 檢鏡하였다.

結果 및 考察

1. 精巢, 精液 및 精子의 特性

Table 2에 나타난 바와 같이 GSI가 평균 4.86%이고, 外形的으로 진한 우유빛을 띤 긴 막대기 形態의 精巢에서 採精된 精液은 마찬가지로 진한 우유빛 색깔을 띠었고, 10억~15억마리 정도의 精子密度를 나타내었으며, 滲透壓은 平均 300mOsmol이었고, 75%의 運動性을 지니고 있었다.

2. 서로 다른 稀釋液에 凍結保存시킨 精子와 正常的인 卵子와의 受精率 및 孵化率

Table 3에서 보는 바와 같이 -196℃에서 抗凍害劑 1M DMSO를 사용하여 2個月동안 保存시킨 경우 稀釋劑를 달리했을 때 受精率은 Tyrode에서 96%, Whittingham's T_6에서 98%로서 약간의 차이는 있으나, 對照區와 비교해서 有意性이 認定되지 않았고, 또한 稀釋劑를 다르게 사용해도 受精率에는 큰 變化를 주지 않은 것을 알 수 있었다. 그러나 孵化率에 있어서는 각각 8%와 10%로서 稀釋劑간에는 큰 차이가 없지마는 90% 以上을 나타낸 對照區와 比較해 볼 때 커다란 差異를 나타내었다. 이러한 결과는 왕연어(*Oncorhynchus tshawytscha*)와 은연어(*O. kisutch*)의 정액을 7일동안 -196℃의 액체질소에 냉동보존시, 수정율이 각각 38%와 79%라고 보고한 Ott and Horton(1971)의 결과와 비교해 볼 때, 본 실험의 보존기간이 다소 긴 차이에도 불구하고 수정율이 높았으며, -196℃에서 60일동안 냉동보존시킨 대서양 대구(*Gadus morhua*)의 정자와 신선한 난자와의 수정율이 36%라고 보고한 Munib *et al*(1968)의 결과와 비교해 볼 때 수정율에 있어서 상당한 차이를 나타내었다. 그리고 해산어종인 가자미(*Pleuronectes platessa*)의 정액을 -

Table 2. Summary of properties of testis, milt and sperm of rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*)

TESTIS			MILT		SPERM	
GSI	APPEARANCE	SHAPE	DENSITY (sperms ml^{-})	OSMOLALITY (mOsmol kg^{-1})	LENGTH OF HEAD (μm)	MOTILITY
4.86	Milky white	Long tubular	$10-15\times10^{8}$	246~323	1.8~2.2	75%

Table 3. Procedures followed in the cryopreservation of milt and insemination of ova of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the results obtained during hatching trials

PREPARATION OF MILT SAMPLE							DETAILS ON OVA	
EXTENDER	CRYO-PROTECTANT	DILUTION RATIO	FREEZING RATE PROFILE	FREEZING RATE S.T.	STORAGE TIME	THAWING TEMP.	FERTILIZED EGGS(%)	HATCHED EGGS(%)
I	Fresh milt not cryopreserved						Over 99	Over 90
I[a]	1M DMSO	10	Fig. 1	-196℃	2 Months	13℃	Over 96	8
II	1M DMSO	10	Fig. 1	-196℃	2 Months	13℃	Over 98	10

Extender I and II are Tyrode and Whitingham's sol, respectively.
Replications averaged 3.
Number of sperm cells averaged over 10×10^{8}.
Intervals thawing-insemination averaged 20 min.
S.T.: Storage temperature
[a] Including of BSA(bovine serum albumin)

196℃에서 315일동안 냉동보존시 20~39%의 수정율을 나타내었다고 보고한 Pullin(1972)의 결과와 비교해 볼 때도 본 실험의 것이 상당히 높은 수정율을 나타낸 것이다.

3. 서로 다른 貯藏溫度에 凍結保存시킨 精子와 正常的인 卵子와의 受精率 및 孵化率

Table 4에서 보는 바와 같이 1M DMSO를 抗凍害劑로 사용하여 1年동안 保存시켰을 경우 受精率은 -20℃ 및 -40℃에서 99% 以上을 나타내어 이러한 結果는 對照區와 거의 差異가 없는 것으로 나타났으나, 孵化率에 있어서는 각각 12%와 10%로서 對照區에 비하여 현저히 낮은 率을 보인 것이지만 1년 동안 冷凍室에 凍結 保存시켜도 生存할 수 있다는 가능성이 本 硏究에서 처음으로 제시되었다. 이러한 결과는 whitefish(*Coregonus muksun* Pallas)의 정액을 1년동안 -196℃에서 냉동보존시켰을 때 60.6~90.2%의 수정율을 얻었다고 보고한 Piironen(1987)의 결과와 비교해 볼 때 본 연구의 결과가 다소 양호한 受精率을 보인 것이라 하겠다.

또한 1M DMSO를 抗凍害劑로 使用하여 2個月동안 保存시킨 경우에도 受精率은 -20℃, -40℃ 및 -70℃에서 모두 99% 以上으로 나타났는 데, 이러한 結果는 對照區의 受精率은 큰 차이가 없는 것으로 나타났고, 保存溫度를 달리해도 受精率과 차이가 없는 것으로 나타났다. 그러나 孵化率에 있어서는 25%~35%를 나타내어 對照區에 비해 상당히 낮은 水準이었으나, 1年동안 凍結保存시킨 경우보다 다소 높은 水準을 나타내었다. 이러한 變化는 보존기간이 짧을수록 受精率에는 그다지 영향을 끼치지는 않으나 孵化率에는 영향을 미치는 것으로 思料된다. 그리고 受精率은 凍結溫度에 관계없이 일정한 수준(99% 이상)을 나타내었으나, 孵化率은 일정한 경향없이 변화되었다.

Table 5에서 보는 바와 같이 抗凍害劑 1.5M DMSO를 사용해서 2個月동안 保存시켰을 때 受精率은 -20℃, -40℃ 및 -70℃에서 모두 99% 以上으로 나타났는 데, 이러한 結果는 對照區와 큰 차이가 없는 것으로, Table 4에서와 마찬가지로 保存溫度를 달리해도 受精率에 있어서는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 그러나 孵化率에 있어서는 각각 27%, 36%, 35%로서 이 數値는 對照區에 비해서는 상당히 낮은 수준이나, 1M의 DMSO를 사용해서 2個月동안 보존시킨 경우와 비교해 볼 때 거의 類

Table 4. Procedures followed in the cryopreservation of milt and insemination of ova of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the results obtained during hatching trials

PREPARATION OF MILT SAMPLE							DETAILS ON OVA	
EXTENDER	CRYO-PROTECTANT	DILUTION RATIO	FREEZING RATE PROFILE	FREEZING RATE S.T.	STORAGE TIME	THAWING TEMP.	FERTILIZED EGGS(%)	HATCHED EGGS(%)
I	Fresh milt not cryopreserved						Over 99	Over 90
I	1M DMSO		Fig. 2	-20℃	1 Year		Over 99	12
I	1M DMSO	1 Part	Fig. 2	-40℃	1 Year	13℃	Over 99	10
I	1M DMSO	sperm:	Fig. 2	-20℃	2 Months	in all	Over 99	25
I	1M Glycerol	1 Part	Fig. 2	-20℃	2 Months	cases	Over 99	22
I	1M Methanol	extender	Fig. 2	-20℃	2 Months		Over 99	22
I	1M DMSO	in all	Fig. 2	-40℃	2 Months		Over 99	34
I	1M DMSO	cases	Fig. 2	-70℃	2 Months		Over 99	35
I	1M Glycerol		Fig. 2	-70℃	2 Months		Over 99	33
I	1M Methanol		Fig. 2	-70℃	2 Months		Over 98	28
I	1.5M DMSO		Fig. 2	-20℃	2 Months		Over 99	27
I	1.5M Glycerol		Fig. 2	-40℃	2 Months		Over 99	31
I	1.5M Methanol		Fig. 2	-70℃	2 Months		Over 99	28

Extender I is Tyrode sol.
Replications averaged .
Number of sperm cells averaged over 10×10^8.
Intervals thawing-insemination averaged 20 min.
S.T.: Storage temperature

似한 水準을 나타내었다. 따라서 DMSO를 使用時 그 濃度에는 커다란 影響을 받지 않는 것으로 思料된다.

4. 서로 다른 貯藏期間에 따른 凍結保存된 精子와 正常的인 卵子와의 受精率 및 孵化率

Table 4에서 보는 바와 같이 1M DMSO를 抗凍害劑로 사용하여 -20℃에서 保存시켰을 경우 受精率이 1年 保存期間에서 99%, 2個月期間에서 99% 以上으로 나타났는 데, 이러한 結果는 對照區의 受精率과 거의 차이가 없어서 保存期間의 長短에 크게 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 그러나 孵化率에서는 각각 12%와 25%로서 신선한 精子를 사용시 90% 以上의 發眼卵이 발생한 것과 비교해 볼 때 差異가 있지만, 이런 결과를 통해서 무지개 松魚의 精子를 장기간 凍結保存시킬 수 있다는 가능성을 알 수 있었다. 또한 1M DMSO를 抗凍害劑로 사용하여 -40℃에서 保存시켰을 경우 受精率은 1年保存期間에서 99%, 2個月期間에서도 99% 以上으로 나타났는 데, 이러한 結果는 對照區의 受精率과 거의 차이가 없는 것이고, 서로 다른 保存期間에서도 差異가 없는 것으로 나타났다. 孵化率에 있어서는 각각 10%와 34%로서 마찬가지로 보존기간이 짧을수록 孵化率이 다소 높게 나타났으나, 90% 以上의 對照區에 비해서는 상당히 낮은 水準을 나타내었다.

5. 서로 다른 抗凍害劑에 冷凍保存시킨 精子와 正常的인 卵子와의 受精率 및 孵化率

Table 4에서와 같이 -70℃에서 2個月동안 保存시켰을 경우 1M DMSO에서 99%, 1M glycerol에서 99%, 1M methanol에서 98% 以上의 受精率이 나타났는 데, 이러한 結果는 對照區의 受精率과 큰 차이가 없는 것으로 나타났으나, 孵化率에 있어서는 각각 35%, 33%, 28%로서 -70℃에서 2個月동안 保存시켰을 경우가 -20℃에서 2個月동안 保存시켰을 경우보다 다소 높은 孵化率을 나타내었다. 이러한 差異는 保存溫度가 孵化率에 影響을 미치는 것으로 思料된다.

Table 5에서 보면 -70℃에서 2個月동안 保存시켰을 때 1.5M DMSO이나 1.5M glycerol에서 99%, 1.5 M methanol에서 모두 99% 以上의 受精率을 나타내었고, 對照區의 受精率 99%와도 차이를 보이지 않아서 서로 다른 抗凍害劑를 사용하여도 受精率에는 차이가 없는 것으로 나타났다. 孵化率에 있어서도 각각 35%, 31%, 28%로서 90% 以上의 對照區에 비해서는 현저한 差異를 나타내었지만, 각 實驗群에서는 큰 差異없이 약간의 변화만 있을 뿐이었다. 그리고 Table 4와 5에서 보는 바와 같이 methanol을 이용했을 때 일반적으로 낮은 수정율을

Table 5. Procedures followed in the cryopreservation of milt and insemination of ova of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the results obtained during hatching trials

PREPARATION OF MILT SAMPLE							DETAILS ON OVA	
EXTENDER	CRYO-PROTECTANT	DILUTION RATIO	FREEZING RATE PROFILE	FREEZING RATE S.T.	STORAGE TIME	THAWING TEMP.	FERTILIZED EGGS(%)	HATCHED EGGS(%)
I	Fresh milt not cryopreserved						Over 99	Over 90
I	1.5M DMSO		Fig. 2	-20℃	2 Months		Over 99	27
I	1.5M DMSO	1 Part	Fig. 2	-40℃	2 Months	13℃	Over 99	36
I	1.5M DMSO	sperm:	Fig. 2	-70℃	2 Months	in all	Over 99	35
I	1.5M Glycerol	1 Part	Fig. 2	-20℃	2 Months	cases	Over 99	34
I	1.5M Methanol	extender	Fig. 2	-20℃	2 Months		Over 99	28
I	1.5M Glycerol		Fig. 2	-40℃	2 Months		Over 99	31
I	1.5M Methanol		Fig. 2	-40℃	2 Months		Over 99	29
I	1.5M Glycerol		Fig. 2	-70℃	2 Months		Over 99	31
I	1.5M Methanol		Fig. 2	-70℃	2 Months		Over 99	28

Extender I is Tyrode sol.
Replications averaged 3.
Number of sperm cells averaged over 10×10^8.
Intervals thawing-insemination averaged 20 min.
S.T.: Storage temperature

나타내었는 데, 이러한 결과는 methanol이 적절하지 못한 抗凍害劑라고 주장한 Leung(1987)과 Steyn and Van Vuren(1987)의 결과와 일치하였다.

6. 서로 다른 抗凍害劑 濃度에 冷凍保存시킨 精子와 正常的인 卵子와의 受精率 및 孵化率

Table 4에서와 같이 -20℃에서 2個月동안 保存시켰을 경우 1M DMSO에서 99%, 1.5M DMSO에서 99% 以上의 受精率이 나타났는 데, 이러한 結果는 對照區의 受精率 99%와 차이가 없는 것으로 抗凍害劑의 濃度가 다르더라도 受精率에는 영향을 미치지 않는다는 것을 알 수 있다. 孵化率에 있어서도 각각 25%, 27%로서 濃度간에 큰 차이가 없었다. 이러한 결과는 대서양 대구(*Gadus morhua*) 정자의 냉동보존시, 17%보다 24%의 glycerol을 抗凍害劑로 이용한 경우에 더 높은 수정율을 얻어냈다는 Mounib *et al*(1968)의 결과와 유사하게 나타났다. -70℃에서 2個月동안 保存시켰을 경우 1M methanol에서 98%, 1.5M methanol에서 99% 以上의 受精率로서 對照區의 受精率 99%와 차이가 없는 것으로 서로 다른 濃度에서도 受精率에는 큰 차이가 없는 結果를 나타내었다. 孵化率에 있어서도 28%로서 거의 類似한 경향을 나타내었다.

7. 光學 및 透過電子顯微鏡에 의한 觀察

Fig. 5-A, B는 광학현미경하에서 11월과 1월에 무지개 송어의 정소를 관찰한 사진으로서 B의 精巢는 주로 성숙된 精子로 충만되어 있으며, A의 정소도 상당히 많은 精子가 있어서 성숙된 난자만 있으면 10월 및 11월에도 수정이 가능할 것으로 사료되었다.

Fig. 6-A, B는 超薄切器(ultramicrotome)로 자른 다음 電子顯微鏡에서 69.00倍率로 觀察한 것인데, 6-A는 성숙된 個體로 부터 採取된 신선한 정상적인 精子이고, 6-B는 -70℃에서 冷凍保存시킨후 解凍된 精子의 형태로서 작은 화살표가 가리키는 精子는 損傷을 입은 상태를 나타내고 있기 때문에 신선한 정자에 비해서 전반적으로 핵막의 이탈(▼)과 내용물의 누출(↓)이 심한 상태를 나타내고 있다.

Fig. 7-A, B에서 보는 바와 같이 透過電子顯微鏡에 의한 무지개 松魚의 신선한 精子는 核膜(nuclear envelope)이 이탈되지 않았고, 核 周邊에 隣接해 있었으며, 頭部의 길이는 1.8~2.2 μm, 全長의 길이는 약 18~21 μm를 나타내었다. 尾部를 살펴보면 Fig. 7-A의 경우 頸部가 관찰되었으나, Fig. 7-B에서는 頭部와 中片部를 연결하는 頸部가 관찰되지 않았다. 이것은 超薄切器로 切斷時 절단 방향에 따라 나타나는 영향이라 생각된다. Fig. 7-B에서는 2本의 central doublet와 이것의 주변을 放射狀으로 둘러싸고 있는 9本의 外側粗大纖維를 볼 수 있는 데, 인간과 가축의 정자에서 볼 수 있는 尾部를 둘러싸고 있으면서 에너지를 생성하는 탄력있는 미토콘드리아초가 존재하지 않는 것으로 나타났다. 이것이 인간이나 일반 가축의 精子와 가장 큰 차이를 나타내는 것으로서 이 미토콘드리아초가 미부 및 頭部부위에 근접해서도 존재하지 않는 까닭으로 말미암아 포유동물의 정자에 비해서 무지개 송어의 정자가 물속에서 오래 생존하지 못하는 것으로 사료된다. 그러나 미꾸리나 메기 및 잉어의 정자는 이러한 미토콘드리아초가 미부에는 존재하지 않으나 頭部부위에 근접해서 존재하기 때문에 무지개 송어나 산천어에 비해서 물속에서 더 오래동안 생존하는 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서 수행된 무지개 송어보다 미꾸리, 메기, 잉어에서 더 높은 孵化率이 기대되며, 앞으로 이에 대한 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

Fig. 8-A, B는 희석액을 사용하여 -70℃에서 보존시킨 후 13℃에서 解凍시킨 精子로서 頭部의 核膜 일부가 이탈되어 內容物이 누출되었으며, 尾部의 확인이 어려웠다.

Fig. 9-A, B는 희석액을 사용하지 않고, 精漿이 존재하는 상태로 -70℃에서 2개월동안 凍結保存한 후 解凍된 精子로서 頭部의 형태를 살펴볼 때 核膜의 이탈이 거의 없는 상태를 나타내었다. 그리고 central doublet가 切斷時 나타나지 않은 경우도 관찰되었는 데, 이러한 現象은 鞭毛가 곧게 뻗어있는 상태가 아니라 鞭毛가 核膜이 없이 核주변에 꼬여져 있는 상태로 存在하거나 본 실험에서와 같이 冷凍保存時 약한 頸部가 절단되기 때문이라 사료된다.

이와 같이 2個月동안 凍結保存時 나타나는 여러가지 老化過程(ageing process)은 受精能力을 低下시키고, 形態學的인 變化에 영향을 끼치는 것으로 思料된다. 이것은 잉어(*Cyprinus carpio*)의 精子를 短期間동안 凍結保存시켰을 때 鞭毛가 核膜없이 核주변에 꼬여져 있고, 鞭毛의 central doublet가 損失된 상태로 存在한다고 報告한 Saad *et al*(1987)의 結果와 類似한 結果를 나타내었다.

Fig. 10-A, B는 8월과 9월경의 미성숙된 난모세포의 전자현미경 사진을 나타내고 있다. Fig. 10-A에서 보면 아직까지 난황과립이 적고 Yolk vesicle

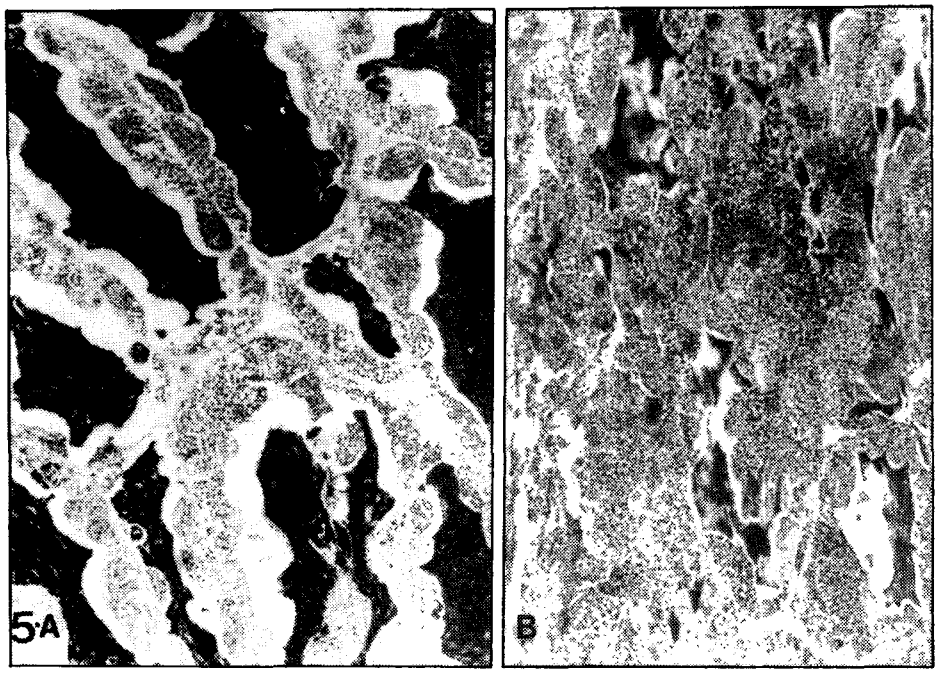

Fig. 5. Light-microscophs of testis of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, Bouin's fluid-fixed, paraffin-embedded, and haematoxylin-eosin stained preparations.
A: Testis of male rainbow trout in immature times, November.
T: Testis. ×125.
B: Testis of male rainbow trout in mature times, January.
T: Testis. ×50.

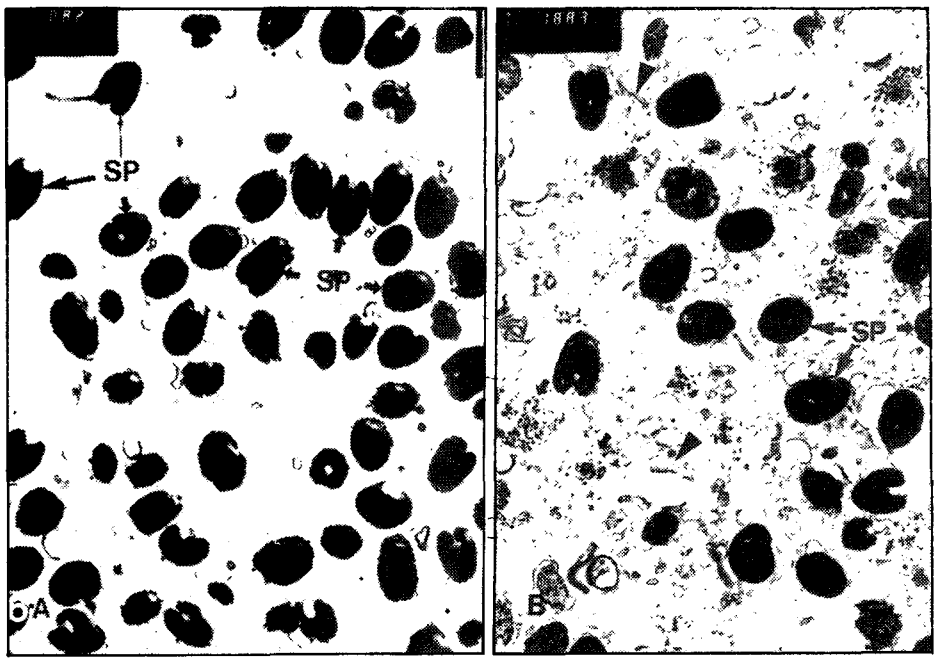

Fig. 6. Morphological changes in rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. Examination by transmission electron microscopy(TEM).
A: Fresh spermatozoa. SP: Spermatozoa. ×6,900. B: Spermatozoa during 2 months of storage at -70℃. The arrows showed the spermatozoa damaged during storage at -70℃. SP: Spermatozoa. ×6,900.

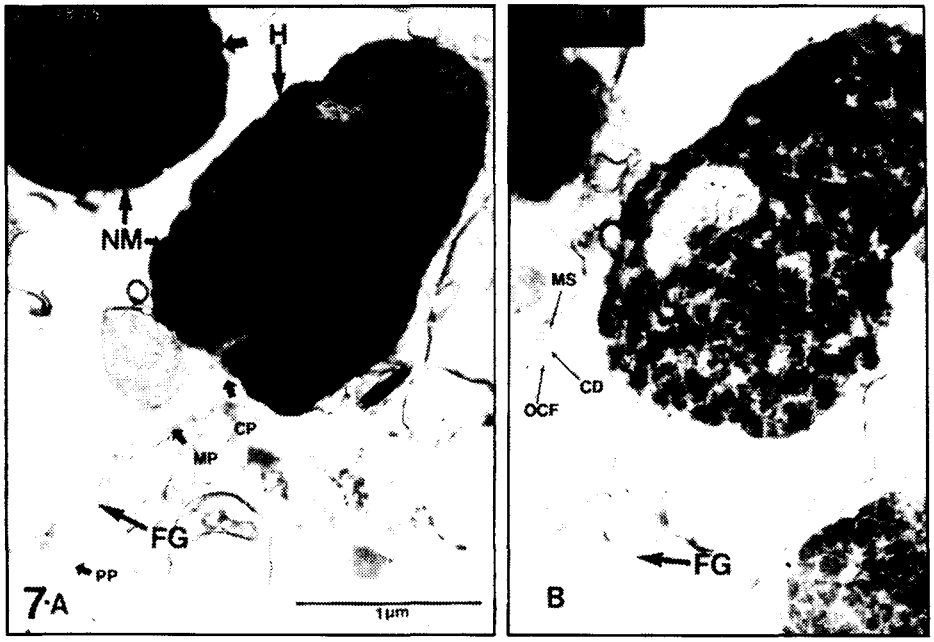

Fig. 7. Sections of the freshly collected rainbow trout spermatozoa.
A: The sperm head is smooth. The nuclear envelope and the plasma membrane are slightly wrinkled and attached to the nucleus. The flagellum is straight and inserted into the sperm head. CP: Connecting pieces or neck. FG: Flagellum. H: Head. MP: Middle piece. NM: Nuclear materials. PP: Principal piece. ×46,000. B: The two centrioles are separate and 9 sets of filaments envelop around the central doublets. CD: Central doublet. MS: Mitochondrial sheath. OCF: Outer coarse fibre. ×46,000.

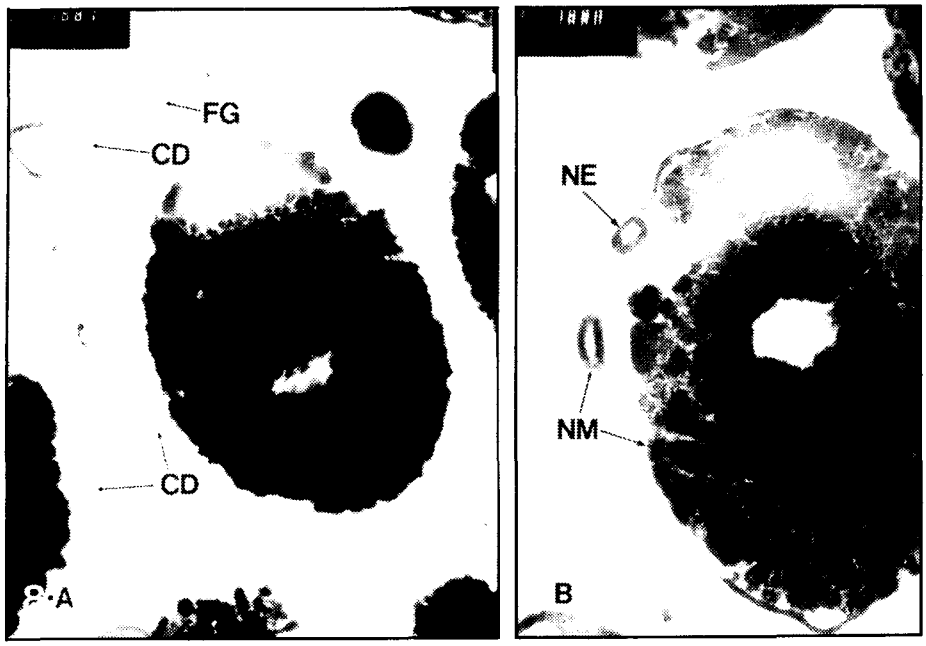

Fig. 8. Sections of rainbow trout spermatozoa cryopreserved at -70℃ for 2 months in the absence of seminal plasma.
A: The sperm head is smooth, but the flagellum is cut. CD: Central doublet. FG: Flagellum. ×46,000, B: The sperm head appears rough and flagellum contained central doublet and is coiled around the nucleus. The nuclear envelope becomes detached from the dense nuclear material and the nuclear materials dispersed from sperm head. NM: Nuclear materials. ×57,500.

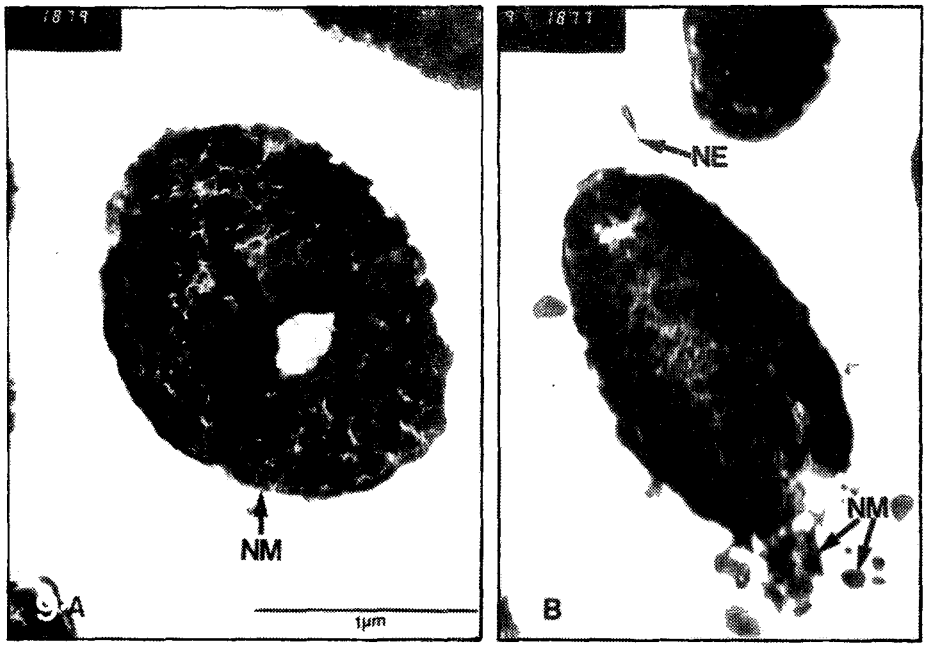

Fig. 9. Sections of rainbow trout spermatozoa cryopreserved at -70℃ for 2 months in the presence of seminal plasma.
A: The sperm head is smooth, but the flagellum is cut. NM: Nuclear materials. ×57,500. B: The sperm head appears rough and flagellum is cut. The nuclear envelope becomes detached from the dense nuclear material. The nuclear materials dispersed from sperm head. NE: Nuclear envelope. NM: Nuclear materials. ×46,000.

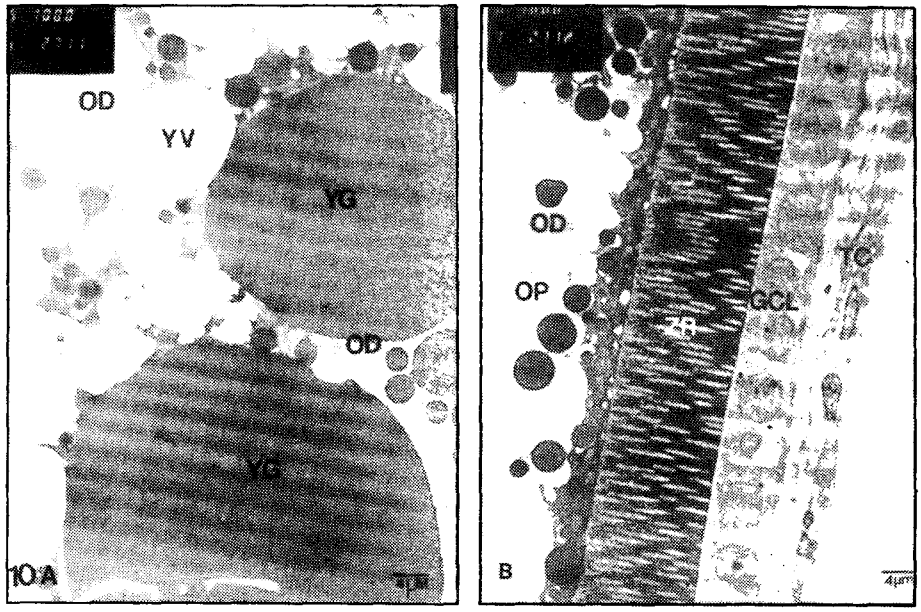

Fig. 10. Sections of ovarian follicles containing Stage II or III oocytes(about 1,000~1,500 μm in diameter.)
A: Oocyte shows massive yolk vesicles, yolk granules and oil droplets. ×2,300. B: Oocyte surrounded by a very thick follicular epithelium consisting of flattened granulosa(GCL) and thecal cell layers(TC) which are separated by a basement membrane(BM). The cortical cytoplasm of the oocyte is electron dense. Clusters of microprojections from the oocyte are found where adjacent granulosa cells joined by desmosomes. ×2,300.

의 數가 많은 상태를 나타내고 있다.

그러나 신선한 精子보다 움직임이 더디고, 形態的인 損傷을 입었지만 解凍精子르 난모세포가 발달하여(Fig. 11-A, B) 성숙된 무지개 송어의 신선한 卵子(Fig. 11-C)와 受精시켰을 때 Table 2, 3, 4에서와 같이 受精率이 신선항 精子와 卵子가 受精했을 때 나타난 98% 이상의 受精率보다는 낮지만 그래도 90% 以上의 상당히 높은 水準을 나타내었다. Fig. 11-D는 퇴화되는 단계의 난자를 나타내고 있다. Fig. 11-E, F는 냉동정자와 신선한 난자를 갓 수정시켰을 때 나타난 난막의 변화와 표층포의 변화를 단층 촬영한 사진으로서 무지개 송어의 경우 수정후에도 卵胞膜(Follicle)이 존재하는 것을 나타내고 있다. 또한 수정후에는 卵膜이 5가지 層으로 나타났는 데, 이는 Fig. 11-C에서 나타난 미성숙된 난자보다 더 두꺼운 卵膜層을 구성하고 있다. 이러한 변화는 卵膜이 외부로 부터의 세균의 침입을 방지하고, 난막의 硬化(hardening)가 일어난 과정의 일부로서 정상적인 수정과정과 유사하게 나타났다.

그러나 냉동보존된 精子와 신선한 卵子와의 受精率은 높게 나타났으나, 孵化率에 있어서는 90% 以上을 나타내는 對照區와 比較해 볼 때 아직도 낮은 水準이었다. 그리고 13℃에서 孵化시킬 경우 대략 24日만에 부화가 開始되었고, 또한 10℃에서 孵化시킬 경우 대략 30日만에 부화가 開始되었다. 이는 정상적인 난발생과 비교해 볼 때 큰 변동없이 순조로운 과정이었다. 그러나 凍結 處理된 精子와 신선한 卵子를 受精시킨지 10日 以前까지 卵發生이 순조롭다가 13℃에서는 15日, 10℃에서는 18日 以後부터 급격한 폐사가 나타났다. 이는 모두 1/3 時點에 공통적으로 나타나 孵化率이 급격히 떨어졌는 데, 앞으로 이러한 원인 규명이 發生遺傳學的인 측면에서 깊이 硏究되어야 할 課題로 思料된다.

要　　約

建國大學校 畜産大學 附設 養魚場에서 飼育中인 50마리의 무지개 松魚 수컷에서 採取된 精液을 각

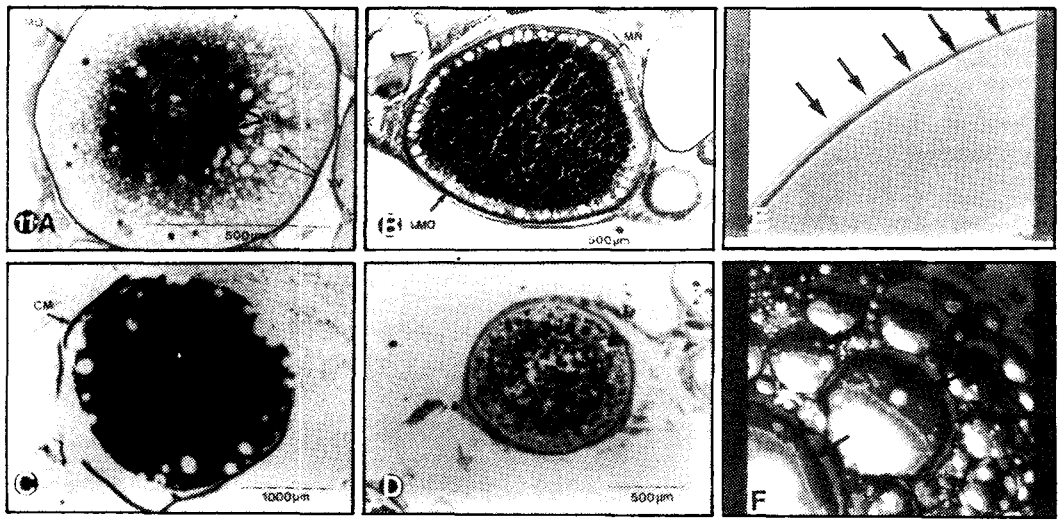

Fig. 11. A: Early maturing oocyte: Stage Ⅲ. This oocyte has acidophilic nucleus, nucleolus and cytoplasm. The major diameter of this oocyte is about 1,300~1,500 *μm*. From this stage, the number of yolk granule begins to increase. EMO: Early maturing oocyte. NU: Nucleolus, YG: Yolk granule(globule), YV: Yolk vesicle. ×125. B: Late maturing oocyte(Migratory nucleus oocyte): Stage Ⅳ. The major diameter of this oocyte is about 1,500~1,800 *μm*. This oocyte has acidophilic nucleus, nucleolus and cytoplasm. Yolk granule begins to adhere *from the stage. Nucleus migrate the pheripheral chorionic membrane.* LMO: Late *maturing oocyte*, MN: Migratory nucleus. ×125. C: Ripe ovum: Stage Ⅴ. The major diameter of this oocyte is 1,800~2,000 *μm*. This oocyte has acidophilic cytoplasm. Cytoplasm in this stage is much compacter than that of any other oocytes. This Ovum in this stage is fertilized with spermatozoa. CM: Chorionic membrane. DP: Deutoplasm. ×125. D: Over-ripe oocyte: Stage Ⅵ. The major diameter of this oocyte is about 1,500 *μm*. Yolk granule begins to degenerate from the stage, an then shrink. ×50. E: Follicular membrane of fertilized ovum taken by C. T. ×400. F: Cortical alveoli immediately after fertilization of fresh ovum with cryopreserved sperm. ×400.

각 1989年 12月부터 1990年 12月까지 -20℃와 -40℃에서 1年 1989年 12月부터 2月까지 2個月동안 -196℃인 液體窒素탱크내에서 그리고 1990年 12月부터 2月까지 -20℃, -40℃, -70℃에서 2개월동안 凍結保存後, 13℃인 冷水에 解凍시켜 20分間 遠心分離器에서 精子를 分離시킨 다음 Tyrode 溶液으로 50倍 정도 稀釋시킨 후의 精子의 生存率 및 運動性과 新鮮한 卵子와 人工受精시킨 후의 受精率 및 孵化率을 調査한 結果는 다음과 같다.

凍結保存前과 解凍後의 精子의 生存率을 비교해 볼 때 全般的으로 生存前과 큰 차이없이 生存率이 높게 나타났다. 3가지의 抗凍害劑로 凍結保存시킨 후 解凍된 精子가 포함된 稀釋液으로 人工受精시킨 후의 受精率은 모두 99% 以上으로서 이러한 數値는 99% 以上을 나타내는 對照區와 차이가 없었고, -20℃, -40℃, -70℃, -196℃와 같이 서로 다른 溫度에서도 受精率은 對照區와 큰 차이없이 나타났다.

1M의 DMSO의 抗凍害劑로 -196℃에서 2個月동안 凍結保存시킨 후 解凍된 精子가 포함된 稀釋液으로 人工受精시킨지 24日 以後의 受精率 및 孵化率은 BSA가 포함된 稀釋液이 각각 96% 및 8%이고, 포함되지 않은 稀釋液은 각각 98%, 10%로서 BSA가 포함되지 않은 경우에서 孵化率이 약간 높게 나타났다.

1M DMSO의 抗凍害劑로 2個月동안 凍結保存시킨 후 解凍된 精子가 포함된 稀釋液으로 人工受精시킨지 24日 以後의 孵化率은 각각 -196℃에서 10%, -40℃에서 34%, -70℃에서 35%로 나타났다. 1M의 methanol의 抗凍害劑로 凍結保存시킨 후 解凍된 精子가 포함된 稀釋液으로 人工受精시킨지 24日 以後의 孵化率은 각각 -20℃에서 22%, -70℃에서 28%로 나타났다. 1M glycerol의 抗凍害劑로 凍結保存시킨 후 解凍된 精子가 포함된 稀釋液으로 人工受精시킨지 24日 以後의 孵化率은 각각 -20℃에서 22%, -70℃에서 33%로 나타났다.

1.5M DMSO의 抗凍害劑로 2個月동안 凍結保存시킨 후 解凍된 精子가 포함된 稀釋液으로 人工受精시킨지 24日 以後의 孵化率은 각각 -20℃에서 27%, -40℃에서 36%, -70℃에서 35%로 나타났다. 1.5M glycerol의 抗凍害劑로 2個月동안 凍結保存시킨 후 解凍된 精子가 포함된 稀釋液으로 人工受精시킨지 24日 以後의 孵化率은 각각 -20℃에서 34%, -40℃에서 31%, -70℃에서 31%로 나타났다. 1.5M methanol의 抗凍害劑로 2個月동안 凍結保存시킨 후 解凍된 精子가 포함된 稀釋液으로 人工受精시킨지 24日 以後의 孵化率은 각각 -20℃에서 28%, -40℃에서 29%, -70℃에서 28%로 나타났다.

신선한 精子의 중편부는 2本의 중앙섬유소, 9本의 외측조대섬유, 미토콘드리아초로 구성되어 있다. 凍結保存時 精子는 鞭毛의 구부러짐, 精子頸部의 核膜의 이탈, 核內容物이 유출되는 손상을 입었다.

謝 辭

本 硏究는 韓國科學財團의 韓日共同硏究(1991~1993) 지원금의 支援에 의해서 수행되었습니다.

參 考 文 獻

Baynes, S. M. and 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.

Graybill, J. R. and H. F. Horton. 1969. Limited fertilization of steelhead trout eggs with cryo-preserved sperm. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 26, 1400~1404.

Haga, Y. 1982. On the subzero temperature preservation of fertilized eggs of rainbow trout. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.* 48(11), 1569~1572.

Hara, S., J. T. Canto, Jr and J. M. E. Almendras. 1982. A comparative study of various extenders for milkfish, *Chanos chanos*(Forsskal) sperm preservation. *Aquaculture* 28, 229~346.

Horton, H. F. and A. G. Ott. 1976. Cryopreservation of fish spermatozoa and ova. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 333, 995~1000.

Hulata, G. and S. Rothbard. 1979. Cold storage of carp semen for short periods. *Aquaculture* 16, 267~269.

Jensen, J. O. T. and D. F. Alderdice. 1984. Effect of temperature on short-term storage of eggs and sperm of chum salmon(*Oncorhynchus keta*). *Aquaculture* 37, 251~265.

Kim, G. Y. 1991. Studies on serum hormone, serum components levels, genotype frequency and histological changes in reproductive cycles of

rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss.* Thesis of doctor degree. Kon-Kuk Univ., pp. 1~100.

Kurokura, H. and R. Hirano. 1980. Cryopreservation of rainbow trout sperm. *Bull. Japan 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.

Larsen, R. E., P. T. Cardeilhac and T. Lane. 1984. Semen extenders for artificial insemination in the Americal alligator. *Aquaculture* 42, 141~149.

Lee, Jae-Hyun, Jong-Man Yoon and Hong-Yang Park. 1989. Histological changes of oocytes development and hormone levels in the Israeli carp(*Cyprinus carpio*) from February to May. *J. Aqua.* 2(1), 21~31.

Leung, L. -P. 1987. Cryopreservation of spermatozoa of the barramundi, *Lates calcarifer*(Teleostei: Centropomidae). *Aquaculture* 64, 243~247.

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, 26 23~2632.

Ohta, H., Y. Shinriki and M. Honma. 1986. Sperm motility of masu salmon *Oncorhynchus masou* in the isotonic solution for egg rinsing, *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.* 52(4), 609~611.

Ott, A. G. and H. F. Horton. 1971. Fertilization of chinook and coho salmon eggs with cryo-preserved sperm, *J. Fish. Res. Bd. Canada* 28, 745~748.

Piironen, J. 1987. Factors affecting fertilization rate with cryopreserved sperm of whitefish(*Coregonus muksun* Palla). Aquaculture 66, 347~357.

Pullin, R. S. V. 1972. The storage of plaice(*Pleuronectes platessa*) sperm at low temperatures, *Aquaculture* 1, 279~283.

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 fertilization capacity of cryopreserved sharptooth catfish(*Clarias gariepinus*) sperm. *Aquaculture* 63, 187~193.

Stoss, J. and W. Holtz. 1983. Cryopreservation of rainbow trout(*Salmo gairdneri*) sperm. Ⅳ. The effectn of DMSO concentration and equilibration time on sperm survival, sucrose and KCl as extender components and the osmolality of the thawing solution, *Aquaculture* 32, 321~330.

Truscott, B. and D. R. Idler. 1969. An improved extender for freezing Atlantic salmon spermatozoa, *J. Fish. Res. Bd. Canada* 26(12), 3254~3258.

Whittingham, D. G. and S. P. Leibo and P. Mazur. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196℃ and -269℃, Science 178, 411~414.

Yoon, J. M., S. M. Lee and H. Y. Park. 1987. Induced ovulation and histological changes of the oocytes according to HCG and trout pituitary extract in the Korean loach, *Misgurnus anguillicaudatus, Korean J. Anim. Reprod.,* 11(3), 170~180.

1991년 11월 26일 접수
1992년 3월 6일 수리