

## 감성돔 (*Acanthopagrus schlegeli*) 정자의 냉동보존에 미치는 희석액과 동해방지제의 영향

임한규 · 장영진

부경대학교 수산과학대학 양식학과

## Effects of Diluents and Cryoprotectants on Cryopreservation of Black Seabream (*Acanthopagrus schlegeli*) Sperm

Han Kyu Lim and Young Jin Chang

Department of Aquaculture, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

Experiments were performed to obtain cryopreservation techniques of black seabream (*Acanthopagrus schlegeli*) sperm. For sperm collection, brood stock reared in recirculating seawater system and fed with the commercial feed during experimental period.

The results indicated that following cryopreservation method in black seabream sperm could be employed. Post-thaw survival rate of sperm revealed the highest value ( $80.6 \pm 1.4\%$ ) in 3% sodium citrate as a diluent for the cryopreservation. Cryopreserved sperm diluted with 5.4% glucose showed the highest fertilization rate to the ovulated eggs. Glycerol was a better cryoprotectant than dimethyl sulfoxide in sperm cryopreservation : survival rate and fertilizing capacity of cryopreserved sperm were decreased according to increase of glycerol concentration and varied in ranges of 0.8~59.3% and 32.5~69.4% with 5~30% glycerol, respectively.

A few of cryopreserved spermatozoa showed the enlarged head with granulated chromatin and ruptured plasma membrane by freezing and thawing injuries compared with unfrozen normal spermatozoa.

---

**Key words :** Black seabream, *Acanthopagrus schlegeli*, Sperm, Diluent, Cryoprotectant, Cryopreservation

### 서 론

어류의 정자를 산 채로 냉장·냉동 보존하는 기술은 양식어류의 종묘생산에 있어 어미의 방란 방정 시기가 불일치하거나 성비가 고르지 못할 때 발생하는 채란·채정의 비동시화 문제를 해결할 수 있게 하며, 자성선숙(protogyny) 및 음성선숙(protandry) 어종의 인공수정을 용이하게 한다. 그리고 수컷 어미의 사육관리에 소요되는 노력과 경비를 절약할 수 있게 할 뿐만아니라, 우량종의 선택교배를 가능하게 하고 우량종이나 재래종의

보존을 간편하게 한다(장 등, 1997a).

어류정자의 냉동보존에 관한 연구는 Blaxter (1953)의 연구를 효시로 많은 연구결과들이 보고된 바 있으며, 아직도 활발한 연구가 전개되고 있다. 그러나 냉동보존에 관한 지금까지의 연구에서는 주로 담수어류(黑倉, 1984 ; Kurokura et al., 1984)와 연어과 어류(Baynes and Scott, 1987 ; Ott and Horton, 1971 ; Stoss and Holtz, 1983 ; Yamamoto, 1976)를 대상으로 정액의 성상과 냉동보존 방법이 구명되어 왔다. 이와 같이 이미 세계의 여러 국가에서 어류정자에 대한 냉

동보존 기술의 개발에 박차를 가하고 있는 데 비해, 우리나라에서는 이 분야에 관한 기초연구가갓 시작된 상태에 있다(Chang, 1997 ; 장 등, 1997 a ; 1997b). 그러므로 의학이나 축산학 분야에서 보존정자가 활용되고 있는 것처럼, 어류정자의 보존을 위한 정자의 생리활성에 관한 기초연구와 종묘생산시 효과적으로 활용할 수 있는 실용적 기술의 개발은 매우 중요한 과제라 할 수 있다. 더욱이 해수어류의 양식이 활발하게 전개되고 있는 국내외 정황으로 볼 때, 기존의 담수어류 위주로 개발된 정자보존 기술의 성과를 바탕으로 해수어류를 포함한 다양한 어종에 대한 비교 연구가 필요하다.

본 연구에서는 해수어류의 인공 종묘생산시 활용할 수 있는 정자의 냉동보존 기술을 확보하고자, 산업적으로 유용한 어류인 감성돔(*Acanthopagrus schlegeli*)을 대상으로 정자의 냉동보존을 위한 적정 희석액과 동해방지제를 구명하였다.

## 재료 및 방법

실험어로는 부경대학교 양식생리학연구실의 순환여과 사육시스템에서 사육한 전장  $25.9 \pm 1.7$  cm, 체중  $292.8 \pm 53.7$  g의 감성돔 10마리를 사용하였다. 실험어의 배정기간은 4월 11일부터 6월 4일까지였으며, 배정중기에 채취된 정액을 실험에 이용하였다. 실험기간중 사육수의 수온은  $17.5 \sim 23.0^{\circ}\text{C}$ (평균  $20.7 \pm 1.2^{\circ}\text{C}$ ), 비중은  $1.0227 \pm 1.0263$ (평균  $1.0246 \pm 0.0011$ ) 범위였으며, 넙치용 부상사료를 1일 어체중의 1% 내외로 실험어에게 공급하였다.

정액을 채취하기 위하여 개체별로 표지된 실험어를 3-aminobenzoic acid ethyl ester (MS 222) 200 ppm에 마취시킨 다음, 비뇨생식공 주

위를 가볍게 눌러 오줌과 배설물을 미리 제거하였다. 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.

희석액에 따른 정자의 냉동보존 효과를 조사하기 위하여 5.4% glucose, 3% sodium citrate, 2.8% sucrose, Alserver's solution<sup>1</sup> 및 해수어류 생리식염수(MFRS)<sup>2</sup>를 희석액으로 사용하였고, 동해방지제로는 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 사용하였다. 정액 : 희석액 : DMSO는 0.20 : 0.65 : 0.15의 비율로 혼합하고, 1분 이내의 평형시간을 둔 다음 냉동하였다.

동해방지제의 종류와 농도별 실험에서는 5% glucose의 희석액에 DMSO와 glycerol의 최종농도가 각각 5, 10, 15, 20, 25 및 30% 되도록 첨가하고, 1분 이내의 평형시간을 둔 다음 냉동하였다.

실험별로 정자를 냉동시키기 위하여 희석정액이 주입된 0.5 ml 용량의 소 정자보존용 straw를 액체질소 증기( $-76^{\circ}\text{C}$ )에 의해 천천히 1차 냉동한 다음, 곧 바로 액체질소( $-196^{\circ}\text{C}$ )에 넣어 2차 냉동하였다(奥村・廣瀬, 1991). 냉동된 정자는 액체질소 텅크에 보관하면서 조사시마다  $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 항온수조에서 30초 이내에 해동시켜 운동성, 생존율 및 수정률을 평가하였다.

실험별 정액의 처리조건에 따른 운동성을 평가하기 위하여, 전술한 방법에 따라 해동시킨 희석정액을 인공해수<sup>3</sup>에 1 : 3의 비율로 섞은 다음, 광학현미경으로 관찰된 운동지수에 따라 점수를 부여하고, 이 점수를 이용하여 정자활성지수(sperm activity index, SAI)를 계산하였다(임 등, 1997).

<sup>1</sup>Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.8 g + glucose 2.05 g + NaCl 0.4 g + 증류수 100 ml

<sup>2</sup>NaCl 1.35 g + KCl 0.06 g + CaCl<sub>2</sub> 0.025 g + MgCl<sub>2</sub> 0.035 g + NaHCO<sub>3</sub> 0.002 g + 증류수 100 ml

<sup>3</sup>NaCl 2.7 g + KCl 0.07 g + CaCl<sub>2</sub> 0.12 g + MgCl<sub>2</sub> 0.46 g + NaHCO<sub>3</sub> 0.05 g + 증류수 100 ml

냉동보존 실험에서 해동후 정자의 생사여부는 정자를 5% eosin-10% nigrosin (Blom, 1950; Fribourgh, 1966) 용액으로 염색한 다음 염색정도에 따라 판별하였으며, 광학현미경( $\times 1000$ ) 아래에서 5회 측정하여 전체 정자수에 대한 살아있는 정자수의 비율로 생존율을 구하였다.

냉동보존후 해동시킨 정자의 감성돔 알에 대한 수정은 전식법으로 3회 실시하였으며, 수정후 12시간째에 발생이 진행된 배(embryo)를 계수하여 수정률을 구하였다.

냉동보존 전후의 정자에 대한 미세구조를 비교하기 위하여, 신선한 정액과 냉동한 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 tetroxide로 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°C에서 각각 12, 12 및 48시간씩 중합시킨 다음, Epon 812에 포매하였다. 포매된 정자의 시료는 ultramicrotome (LKB, Nova, Sweden)에 의해 두께 0.5 μm로 박절(薄切)한 다음, toluidine blue로 염색하여 관찰할 부위를 결정하였다. 관찰부위가 정해진 포매시료는 다시 70 nm 두께로 초박절(超薄切)한 다음, uranylacetate와 lead citrate 용액으로 이중염색하여 투과형 전자현미경(JEM 1200 E-XII, 60~80 Kv, JEOL, Japan)에 의해 냉동보존 전후의 정자 머리와 미토콘드리아의 크기, 핵질, 세포막, 미토콘드리아 및 편모의 구조변화를 관찰하였다.

모든 실험결과는 일원 분산분석과 Tukey test로 검정하였다(Zar, 1984).

## 결 과

여러가지 희석액에 혼합한 정액을 액체질소에서

20일 동안 냉동보존한 다음, 해동 직후의 SAI, 정자의 생존율 및 감성돔 알에 대한 수정률을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 해동 직후의 SAI는 3% sodium citrate에서 1.07로 가장 높았고, MFRS 0.92, Alserver's solution 0.22의 순이었다. 정자의 생존율은 3% sodium citrate를 사용하였을 때  $80.6 \pm 1.4\%$ 로 가장 높았고, 5.4% glucose와 Alserver's solution에서는 각각  $46.4 \pm 7.4\%$ 와  $46.4 \pm 10.7\%$ 로 낮았다. 그러나 해동정자의 감성돔 알에 대한 수정률은 5.4% glucose에서  $63.4 \pm 4.4\%$ 로 가장 높았고, 3% sodium citrate에서는  $50.6 \pm 4.8\%$ 였다. 가장 낮은 SAI

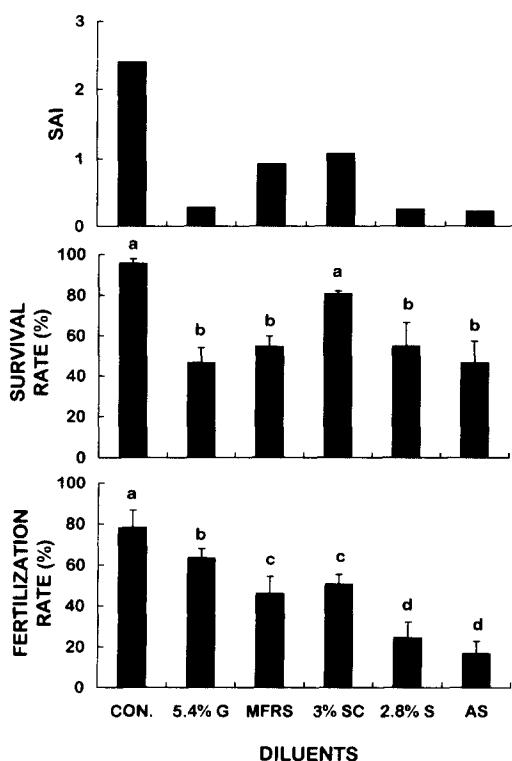


Fig. 1. Effects of various diluents on sperm activity index (SAI), survival rate and fertilization rate in cryopreservation of black seabream sperm. Different superscripts on the bars within a figure are significantly different ( $P < 0.01$ ). AS : Alserver's solution, CON. : control, G : glucose, MFRS : marine fish Ringer's solution, S : sucrose, SC : sodium citrate.

와 생존율을 보였던 Alserver's solution에서의 수정률은  $16.7 \pm 6.0\%$ 로 가장 낮았다.

회석액을 5% glucose로 고정하고 동해방지제인 DMSO와 glycerol의 농도를 달리 섞은 정액을 20일간 냉동보존한 결과는 Fig. 2 및 Fig. 3과 같다. DMSO의 농도별 SAI와 생존율은 20% DMSO에서 각각  $0.67, 56.0 \pm 6.7\%$ 로 가장 높았고, 감성돔 알에 대한 수정률은 15% DMSO에서  $63.4 \pm 4.4\%$ 로 가장 높았다. Glycerol에서의 SAI는 5~15%에서 1.16~1.73으로 비교적 높았으나 20%부터는 급격하게 감소하였고, 생존율은 5% glycerol에서  $59.3 \pm 8.2\%$ 로 가장 높았다. 수정률은 생존율이 가장 높았던 5% glycerol에서  $69.4 \pm 7.4\%$ 로 냉동하지 않은 정액의  $78.3 \pm 8.3\%$ 보다는 약간 낮았지만, 동해방지제를 첨가하지 않

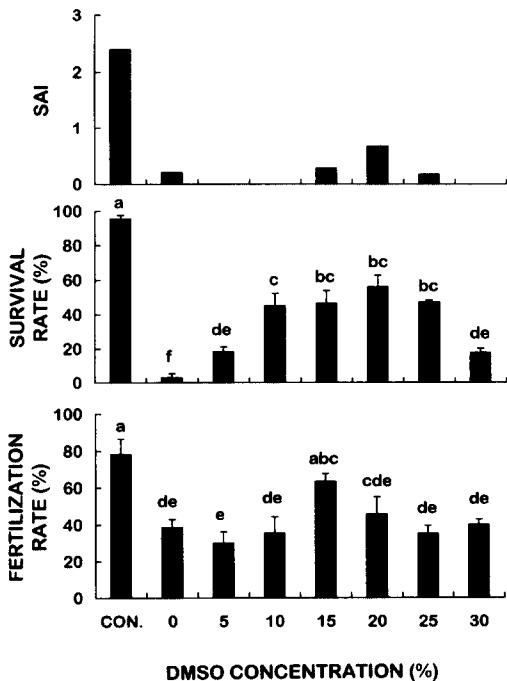


Fig. 2. Effects of DMSO concentration on sperm activity index (SAI), survival rate and fertilization rate in cryopreservation of black seabream sperm. Different superscripts on the bars within a figure are significantly different ( $P < 0.01$ ). CON. : control.

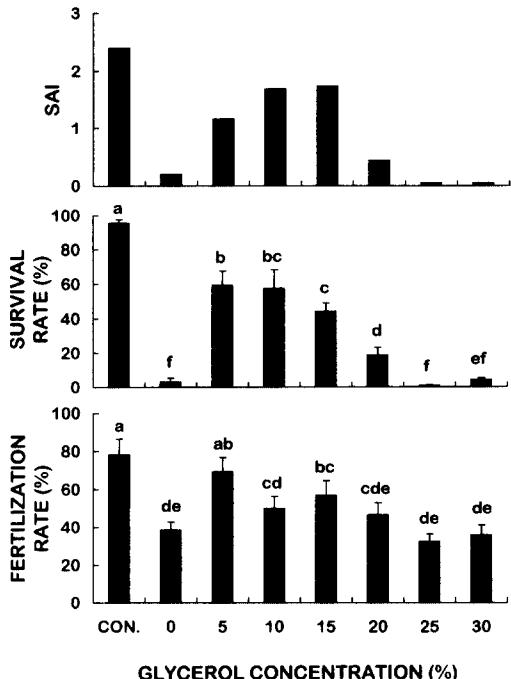


Fig. 3. Effects of glycerol concentration on sperm activity index (SAI), survival rate and fertilization rate in cryopreservation of black seabream sperm. Different superscripts on the bars within a figure are significantly different ( $P < 0.01$ ). CON. : control.

았을 때의  $38.6 \pm 4.3\%$ 보다는 월등히 높았다. Glycerol 농도 5~30%에서 해동정자의 생존율과 알에 대한 수정률은 각각 0.8~59.3%, 32.5~69.4%로 glycerol의 농도가 높아질수록 낮아지는 경향을 보였다. 이상의 냉동정자에 대하여 평가된 SAI, 정자의 생존율 및 수정률을 근거로 비교해 보면, 감성돔 정자의 냉동보존을 위한 동해방지제로는 glycerol이 DMSO 보다 나은 편이었다.

냉동전의 감성돔 정자는 머리, 중편 및 꼬리로 구성되어 있었다. 머리는 구형으로 직경이 1.4~1.6  $\mu\text{m}$ (평균  $1.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$ )였고, 머리의 길이는 1.2~1.4  $\mu\text{m}$ (평균  $1.3 \pm 0.1 \mu\text{m}$ )였다. 치밀한 핵질로 충만한 머리는 그 끝에 첨체구조를 가지고 있지 않았다(Fig. 4A). 두개의 중심소체는 머리 뒤쪽의 함입한 곳에 서로 직각으로 배치되어 있

었고, 중심소체의 뒷 부분은 편모와 연결되어 있었다(Figs. 4A, 4B). 미토콘드리아는 직경 0.5  $\mu\text{m}$  전후의 구형으로 2개가 관찰되었으며, 편모는 전형적인 9+2 구조를 나타냈다(Fig. 4C). 보존 후 해동된 정자는 대부분이 냉동하지 않은 정자와 같은 정상적인 구조를 보인 반면, 소수의 정자(10 % 이하)에서는 염색질이 과립상으로 변하거나 균질화되지 않았다(Fig. 5A). 머리의 크기도 냉동전의 정자와 비교할 때 다소 커졌으며, 세포막은 정자 머리로부터 이탈되고, 중편부와 편모도 약간 변형되어 있었다(Fig. 5B).

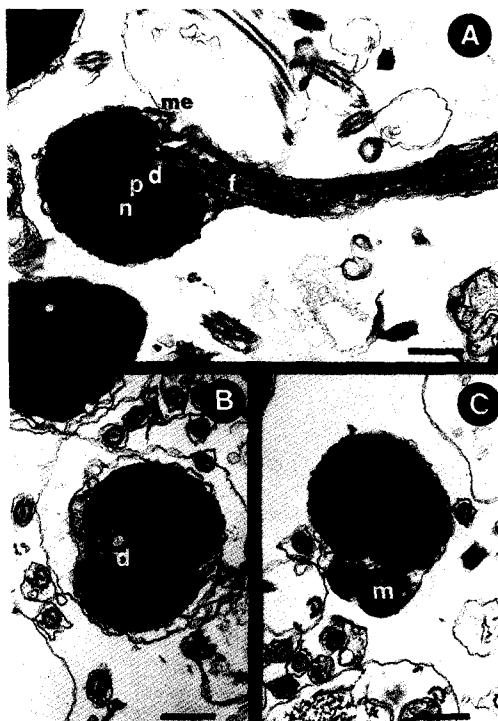


Fig. 4. Structure of unfrozen spermatozoa in black seabream. A : Sagittal section of a spermatozoon. Note head showing compact chromatin, centriole and flagellum. B : Cross section of head showing distal centriole. C : Sagittal section of head showing mitochondria. Note the 9+2 pattern of flagellum (an arrow). d : distal centriole, f : flagellum, m : mitochondrion, me : plasma membrane, n : nucleus, p : proximal centriole. Bar=0.5  $\mu\text{m}$ .

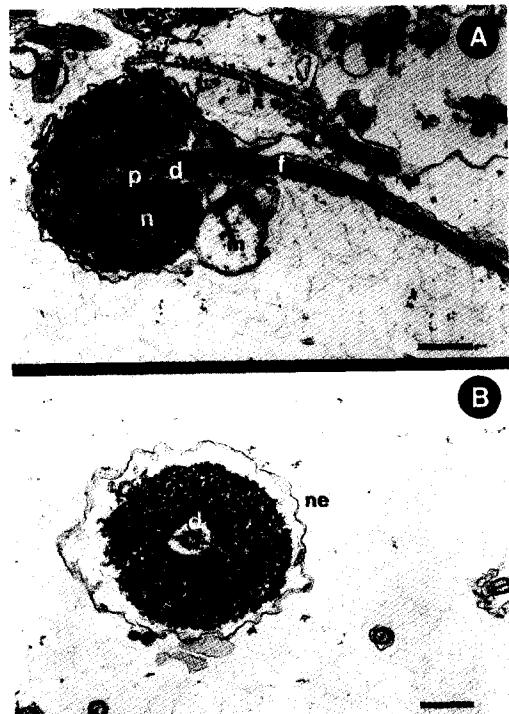


Fig. 5. Structure of cryopreserved spermatozoa in black seabream. A : Sagittal section of a spermatozoon. Note head showing granulated chromatin and empty mitochondrion. B : Cross section of head containing distal centriole and granulated chromatin. Note head showing detachment of the nuclear envelope. d : distal centriole, f : flagellum, m : mitochondrion, n : nucleus, ne : nuclear envelope, p : proximal centriole. Bar=0.5  $\mu\text{m}$ .

## 고 찰

정자의 냉동보존 효과에 영향을 미친 주된 요인으로는 희석액, 동해방지제, 평형시간, 냉동속도 및 해동온도 등이며(Jamieson, 1991), 냉동보존의 첫 과정은 적정 희석액의 선택이라 할 수 있다. 지금까지 어류정자의 냉동보존을 위해 많은 종류의 희석액이 이용되어 왔다(Babiak et al., 1995 ; Bolla et al., 1987 ; Chao et al., 1975 ; Gwo, 1994 ; Gwo et al., 1991 ; Piironen, 1993). 어류정자의 보존을 위해 희석액이

갖추어야 할 조건은 희석시 삼투질농도 변화에 의해 정자가 활성화되는 것을 방지해야 한다(Jamieson, 1991). 따라서 정장(seminal fluid)의 삼투질농도와 유사한 유기 화합물이나 염류를 첨가하는 것이 일반적이다. Gwo et al. (1991)은 Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) 정자의 냉동보존에서 NaCl, glucose 및 sucrose와 같은 간단한 조성의 희석액이 유리하다고 하였고, Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*)에서는 Mounib's solution과 MFRS를 사용하였을 때 좋은 효과를 보인 것으로 나타났다 (Bolla et al., 1987). 이와 같이 적절한 희석액의 종류는 어종에 따라 종특이적인 경향을 보이고 있다. 일반적으로 해수어류의 정자를 보존하는 데는 간단한 조성의 희석액을 주로 이용해 왔으나, 연어과 어류의 정자는 희석액의 조성에 대해 매우 민감하게 반응하는 것으로 알려져 있다(Kurokura and Hirano, 1984). 본 연구에서 감성돔 정자는 염류만 들어있는 MFRS에 비해 당질을 함유한 glucose에서 보존성이 높은 것으로 나타났다. Glucose, sucrose와 같은 당질을 포함한 희석액은 Atlantic croaker (Gwo et al., 1991), 복선(Gwo et al., 1993) 및 연어과 어류(Piironen, 1993) 등에서 우수한 보존효과를 나타냈으

며, 일반적으로 sucrose나 trehalose와 같은 당류는 정자의 냉동과정 중 세포막의 인자질을 안정시키는 것으로 알려져 있다(Gwo, 1994).

본 연구에서 희석액으로 5% glucose를, 동해방지제로 5% glycerol을 사용하여 냉동보존하였던 감성돔 정자의 알에 대한 수정률은  $69.4 \pm 7.4$ %로 가장 높았다. 이 결과는 본 연구재료와 동일어종인 감성돔을 대상으로 연구하였던 Chao et al.(1986)의 연구결과와 일치하며, yellowfin bream (*Acanthopagrus australis*) (Thorogood and Blackshaw, 1992), Atlantic halibut (Bolla et al., 1987) 및 sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*) (Steyn and van Vuren, 1987)의 정자에서 연구된 결과와도 부합되고 있다. 그러나 glycerol은 연어과 어류와 grouper (*Epinephelus malabaricus*) 정자에 독성을 나타내는 것으로 알려져 있는데(Chao et al., 1992; Ott and Horton, 1971; Scott and Baynes, 1980; Stoss and Holtz, 1983), 본 연구에서 glycerol의 농도가 높을수록 SAI나 정자의 수정능력이 약해지는 것도 glycerol 독성이 강해지기 때문인 것으로 추측된다. 그리고 glycerol 첨가에 의해 정자가 받는 삼투압 충격을 최소화하고 생존율을 증가시키기 위해, 단계적인 glycerol의 첨

Table 1. Effects of diluent and cryoprotectant on fertilizing capacity of cryopreserved fish sperm

Sperm of	Diluent	Cryoprotectant (%)	Fertilization rate (%)	Reference
Atlantic cod (M)	NaCl	Glycerol	36	Mounib et al., 1968
Atlantic croaker (M)	NaCl (1%)	DMSO (15)	57	Gwo et al., 1991
Atlantic halibut (M)	NaCl	Glycerol	86	Bolla et al., 1987
Black seabream (M)	Glucose (5%)	Gglycerol (5)	69	Present authors
Grass puffer (M)	Glucose (5.6%)	DMSO (12)	47	Gwo et al., 1993
River puffer (M)	MFRS	DMSO (5)	79	Chang et al., 1997a
Grey mullet (M)	MFRS	DMSO (10)	60	Chang et al., 1997a
Rainbow trout (F)	V2	DMSO (7.5)	82	Stein and Bayrele, 1978
Arctic charr (F)	Glucose (0.3 M)	Glycerol (20)	75*	Piironen, 1993
Whitefish (F)	Glucose (0.3 M)	Glycerol (20)	86	Piironen, 1987
Tilapia (F)	FRS	Methanol (5)	93	Chao et al., 1987
Sharptooth catfish (F)	Extender 4	Glycerol (11)	51	Steyn and van Vuren, 1987
Carp (F)	FRS	DMSO (15)	69	Kurokura et al., 1984

\*Expression as percentage to the fertilization rate of control fish sperm. F : freshwater species, M : marine species, FRS : fish Ringer's solution, MFRS : marine fish Ringer's solution.

가가 필요하다(Erdahl et al., 1984).

정자는 냉동과 해동과정중 많은 손상을 입을 수 있기 때문에 이를 방지하기 위하여 동해방지제를 사용한다. 동해방지제는 중성으로 친수성이어야 하며, 정자의 세포막 투과성이 높아야 한다. 뿐만 아니라 정자에 대한 독성도 약한 것이어야 한다(Jamieson, 1991). 지금까지 동해방지제로서 DMSO, glycerol 및 methanol 등이 주로 사용되어 왔으나, 이것들은 Table 1에서 보는 바와 같이 어종별로 종특이성을 나타내기 때문에, 모든 어류에 적용될 수 있는 단일한 동해방지제는 아직 없는 것으로 보인다.

지금까지 어류정자의 냉동보존에 관한 연구는 많았지만, 냉동부터 해동에 이르기 까지의 과정중에서 일어날 수 있는 정자의 형태변화에 관하여 관찰한 사례는 거의 찾아 볼 수 없다. 따라서 냉동보존한 정자가 신선한 정자에 비하여 낮은 운동성과 수정률을 나타내는 원인을 밝히기 위하여, 냉동보존 과정중에서 일어날 수 있는 정자의 손상기구를 파악해야 한다. 본 연구에서 냉동하지 않은 감성돔 정자의 머리 크기는  $1.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$ 로 Atlantic croaker (Gwo and Arnold, 1992)의  $1.5 \mu\text{m}$  및 turbot (Suquet et al., 1993)의  $1.7 \mu\text{m}$ 과 비슷한 크기였으나, 무지개송어( $1.6 \sim 2.2 \mu\text{m}$ )와 잉어( $1.8 \sim 2.2 \mu\text{m}$ ) (Gwo et al., 1993)보다는 작았다. 그러나 일부의 냉동보존 정자는 냉동과 해동 과정에서 형태적 손상을 입었으며, 머리의 직경도  $1.7 \pm 0.0 \mu\text{m}$ 로 다소 부풀어 있었다. Gwo et al. (1993)은 이러한 형태적 손상이 물리적 압력에 대한 정자 자체의 내성부족 때문에 일어난다고 하였다. 한편, Atlantic croaker (Gwo and Arnold, 1992)에서는 정자를 냉동 보존할 때 동해방지제로 DMSO를 사용함으로써 정자의 물리적 손상을 줄일 수 있었다고 한다. 그러나 냉동에 의한 정자의 물리적 손상은 동해방지제의 첨가 유무 뿐만이 아니라 희석액의 조성, 냉동속도, 해동속도 등으로부터도 영향을 받을 수 있으므로, 이러한 요인들에 관하여 깊이있게 연구 할 필요가 있다.

## 요 약

감성돔 (*Acanthopagrus schlegeli*) 정자의 냉동보존시 정자의 생리활성과 보존효과를 비교하기 위하여, 순환여과 사육시스템에서 사육한 전장  $25.9 \pm 1.7 \text{ cm}$ , 체중  $292.8 \pm 53.7 \text{ g}$ 의 성어로부터 얻은 정액을 재료로 하여 희석액별, 동해방지제별 해동 후 정자의 활성, 생존율 및 알에 대한 수정능력을 평가하였다.

희석액별 냉동보존에서 해동정자의 생존율은 3% sodium citrate에서  $80.6 \pm 1.4\%$ 로 가장 높았으나, 수정률은 5.4% glucose에서  $63.4 \pm 4.4\%$ 로 가장 높았다. 동해방지제별 냉동보존에서 해동정자의 수정률은 5~15% glycerol을 동해방지제로 사용하였을 때,  $50.1 \sim 69.4\%$ 로 DMSO 보다 나은 효과를 보였다. 감성돔 정자의 냉동보존을 위한 적정 희석액과 동해방지제는 5% glucose와 5% glycerol이었다. 냉동하지 않은 감성돔 정자의 머리는 구형으로 직경  $1.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$ , 길이  $1.3 \pm 0.1 \mu\text{m}$ 였으며, 치밀한 핵질로 채워져 있었다. 편모는 전형적인 9+2 구조를 나타냈다. 그러나 냉동후 해동시킨 정자중에서는 염색질의 과립화, 세포막의 이탈에 의해 그 용적이 커지는 구조변화를 보였다.

## 사 사

이 논문은 1996년도 농림부 현장애로 기술개발 사업연구비의 지원에 의해 수행된 연구결과의 일부이며, 연구비 지원에 대하여 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

- 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.  
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 fer-

- tility. *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.
- Chang, Y. J., 1997. Present and future studies on the cryopreservation of fish gametes. *Suisanzoshoku*, 45 : 557–564.
- 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.
- 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.
- Erdahl, A. W., D. A. Erdahl and E. F. Graham, 1984. Some factors affecting the preservation of salmonid spermatozoa. *Aquaculture*, 43 : 341–350.
- 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. Zool.*, 264 : 444–453.
- Gwo, J. C., H. Kurokura and R. Hirano, 1993. Cryopreservation of spermatozoa from rainbow trout, common carp, and marine puf-fer. *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.
- Jamieson, B. G. M., 1991. Fish evolution and systematics : Evidence from spermatozoa. Cambridge University Press, New York, pp. 319.
- Kurokura, H., R. Hirano, M. Tomita and M. Iwahashi, 1984. Cryopreservation of carp sperm. *Aquaculture*, 37 : 267–273.
- Mounib, M. S., P. C. Hwang and D. R. Idler, 1968. Cryogenic preservation of Atlantic cod (*Gadus morhua*) sperm. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 25 : 2623–2632.
- Ott, A.G. and H.F. Horton, 1971. Fertilization of steelhead trout (*Salmo gairdneri*) egg with cryo-preserved sperm. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 28 : 1915–1918.
- Piironen, J., 1987. Factors affecting fertilization rate with cryopreserved sperm of whitingfish (*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*, 116 : 275–285.
- Scott, A. P. and S. M. Baynes, 1980. A review of the biology, handling and storaged of salmonid spermatozoa. *J. Fish Biol.*, 17 : 707–739.
- Stein, H. and H. Bayrle, 1978. Cryopreservation of the sperm of some fresh-water teleosts. *Ann. Anim. Biochem. Biophysiol.*, 18 : 1073–1074.
- Steyn, G. J. and J. H. J. van Vuren, 1987. The fertilizing capacity of cryopreserved sharp-tooth catfish (*Clarias gariepinus*) sperm. *Aquaculture*, 63 : 187–193.
- Stoss, J. and W. Holtz, 1983. 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 osmolality of the thawing solution. *Aquaculture*, 32 : 321–330.

- Suquet, M., G. Dorange, M. H. Omnes, Y. Normant, A. Le Roux and C. Fauvel, 1993. Composition of the seminal fluid and ultra-structure of the spermatozoon of turbot (*Scophthalmus maximus*). J. Fish Biol., 42 : 509–516.
- Thorogood, J. and A. Blackshaw, 1992. Factors affecting the activation, motility and cryopreservation of the spermatozoa of the yellowfin bream, *Acanthopagrus australis* (Günther). Aquacult. Fish. Manag., 23 : 337–344.
- Yamamoto, T., 1976. Fertilizing capacity of dog salmon spermatozoa in Ringer's solution, with special reference to the effect of dilution. Japan. J. Ichthyol., 23 : 88–92.
- Zar, J. H., 1984. Biostatistical Analysis. Pre-ntice-Hall Inc., Englewood Cliffs, N.J., pp. 620.
- 임한규·고강희·장영진, 1997. 회석액별 감성돔, *Acanthopagrus schlegeli* 정자의 단기보존 효과. 한국수산학회지, 30 : 211–215.
- 장영진·강용진·김승현·임한규·이정용·강덕영·고강희·장윤정·최윤희, 1997a. 해산어류 정자의 생리 활성과 장·단기 보존. 농림수산특정연구사업 최종연구보고서, 농림부, pp. 178.
- 장윤정·장영진·임한규, 1997b. 자주복 (*Takifugu rubripes*) 정자의 동결보존. 발생과 생식, 1 : 29–36.
- 奥村重信·廣瀬慶二, 1991. 凍結保存精子によるアカアマダイの人工受精. 水産増殖, 39 : 441–445.
- 黒倉壽, 1984. ニシキゴイ精液の長期保存. 水産増殖, 32 : 148–152.