

말뚝성게, *Hemicentrotus pulcherrimus* 정자의 냉장보존에 미치는 희석액의 효과

고강희 · 강경호[†] · 김재민

여수대학교 양식학과

Effect of Diluents on the Cold Storage of Sperm in Sea Urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*

Kang-Hee Kho, Kyoung Ho Kang[†] and Jae-Min Kim

Dept. of Aquaculture, Yosue National University, Yosue-si Jeonnam 550-749, Korea

ABSTRACT : A series of experiments were conducted to compare the effects of various diluents in cold storage on the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus* sperm.

Various diluents of glucose solutions, artificial sea water(ASW) and 50% ASW were used to store the sperm at 4°C. The storage effect was evaluated using sperm activity index(SAI), survival rate of sperm and fertilization rate to egg. ASW and 1.2 M glucose were found to be better diluents which maintained high motility and survival rate of sperm for a storage period of 30 days. Optimal pH of diluent to store the sperm at 4°C is 7.0~8.0. In order to keep high SAI and survival rate of sperm, addition of 400 ppm neomycin into the diluent revealed the best storage results.

Key words : Sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*, Sperm, Cold storage, Diluent.

요약 : 말뚝성게 정자의 냉장보존을 위한 여러 가지 희석액의 보존 효과를 비교하였다.

다양한 농도의 포도당 용액, 인공해수(ASW) 를 희석액으로 하여 정자를 4°C에서 보존하였다. 보존효과는 정자 활성지수(SAI), 생존율 및 말뚝성게 난에 대한 수정률로 평가하였다. ASW와 1.2 M glucose액을 희석액으로 하여 30일간 냉장보존하였을 때 가장 높은 운동성 및 생존율을 유지하였다. 정자의 냉장보존을 위한 희석액의 적정 pH는 7.0~8.0 이었다. 정자의 SAI와 생존율을 높이기 위한 항생제로는 neomycin(400 ppm)이 효과적인 것으로 나타났다.

서론

해양 무척추동물 정자의 단기 액상보존은 산업적으로 중요한 양식 대상 종의 인공 증묘 생산시 어미의 방란 방정시기와 성비의 차이에 따른 문제점을 극복할 수 있게 하며, 정액의 수송이나 조작 등을 간편하게 한다. 개체 수준 보존의 경우 고비용과 사육관리의 어려움 및 다른 종의 오염 등, 많은 문제점을 가지고 있는 반면 생식세포 수준에서의 보존법은 비용의 절감과 우량 유전자원을 효율적으로 보존할 수 있다는 잇점을 가지고 있어 새로운 품종개발시 유익한 도구로 활용될 수 있다. 이와 같이 해양동물의 정자보존 기술이 수산양식에서 차지하는 장점이 많음에도 불구하고 우리나라의

경우 이 분야에 관한 연구가 미흡한 실정이다.

지금까지 외국에서 해양동물 정자보존에 관한 연구는 주로 어류를 대상으로 많은 보고들이 있으나(Kubota, 1961; Wolf, 1963; Chao et al., 1975; Hara et al., 1982; McNiver et al., 1993; Palmer, 1994), 무척추동물 정자의 보존에 관한 연구는 Lannan (1971)이 *Crassostrea gigas*의 정자를 동결보존하였고, Asahina와 Takahashi (1979)가 말뚝성게와 북쪽말뚝성게에 관하여, Matsunaga 등 (1983)이 전복 정액을 재료로 한 예비 실험이 있으나 다른 연구결과를 찾기가 쉽지 않다.

한편 국내의 경우 실제 증묘 생산 현장에서 단기간 효과적으로 활용할 수 있는 해양 무척추동물 정자의 단기 액상보존에 관한 연구는 매우 빈약한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 산업적으로 유용한 무척추동물인 말뚝성게, *Hemicentrotus pulcherrimus*를 재료로 하여 희석액과 항생제 처리에 따른 정자의 단기 액상보존 가능성을 검토하여 무척추동물의 증묘생산 과정에 이용 가능한 정자보존 방법을 제공하고자 한다.

[†]교신저자: 전남 여수시 둔덕동 산 96-1, 여수대학교 수산생명과학부 양식학과. (우) 550-749, (전) 061-659-3165, (팩) 061-659-3160, E-mail: mobidic@yosu.ac.kr

재료 및 방법

정액채취를 위한 말뚝성계는 난경 7.0 cm 전후의 성숙한 개체로 전라남도 여수시 돌산 앞바다에서 채집된 것을 실험실로 운반하여 사용하였다. 정액의 채취는 0.5 M KCl 용액을 생식공 주위에 주사하여 방정을 유도하였으며 채취된 정액은 시험관에 넣어 밀봉한 후에 실험에 사용될 때까지 얼음을 채운 용기에서 보관하였다. 말뚝성계 정액의 냉장보존에 적합한 희석액을 찾기 위하여 0.1 M, 0.3 M, 0.6 M, 1.2 M glucose와 100% 인공해수(ASW : NaCl 2.7g+KCl 0.07g+CaCl₂ 0.12g+MgCl₂ 0.46g+NaHCO₃ 0.05g+distilled water 100ml), 50 % 인공해수를 각각 0.1 M Hepes buffer를 사용하여 pH 7.4 로 하였고, 정액과 5 : 1의 비율로 섞은 후 1.5ml vial에 분주하였다. 희석액의 최적 pH를 조사하기 위하여 희석액 조성에 따른 액상보존 실험에서 가장 좋은 성적을 나타냈던 ASW에 HCl과 NaOH를 첨가하여 pH 5, 6, 7, 8 및 9로 조절하였으며 이후 ASW와 정액의 비율을 5 : 1로 희석하여 1.5ml vial에 분주하였다. 냉장보존시 항생제의 첨가에 따른 보존효과를 평가하기 위하여 인공해수를 5 : 1의 비율로 정액과 섞은 후, neomycin 및 gentamycin 의 최종농도가 200, 400, 600, 800 ppm이 되도록 첨가하였다. 각 실험에서 분주된 vial들은 4°C 의 냉장고에서 30일간 보관하면서 3일 간격으로 정자의 운동성과 생존율을 조사하였다. 액상보존의 각 실험별 정액의 처리조건에 따른 운동성을 평가하기 위하여 앞의 방법에 따라 보존한 희석정액을 인공해수와 1 : 5의 비율로 섞은 다음, 광학현미경으로 관찰된 운동지수에 따라 점수를 부여하였고 (Table 1), Strussmann 등 (1994)의 방법을 변형한 Table 1에 따라 정자활성지수(sperm activity index, SAI : SAI=점수×운동정자의 비율(%)/100)를 계산하였으며 각 실험에 대한 정자활성지수는 3회 측정하여 평균을 구하였다.

냉장보존한 정자의 생존 여부는 정자를 5% eosin-10% nigrosin (Blom, 1950; Fribourgh, 1966)에 염색한 다음, 정자의

염색정도에 따라 판별하였으며, 광학현미경(×1000) 아래에서 5회 측정하여, 전체 정자수에 대한 살아 있는 정자수의 비율로 생존율을 구하였다. 냉장보존된 정자로 알에 대한 수정률 조사는 3회 실시하였으며, 수정후 초기낭배기로 발생이 진행된 배의 수를 계수하여 수정률을 구하였다.

실험결과에 대한 통계처리는 일원분산분석(one-way ANOVA)과 Tukey test(Zar, 1984)로 검정하였다.

결 과

채취 직후의 정액을 희석액별로 혼합하여 4°C로 유지한 다음, 보존기간에 따른 SAI와 정자의 생존율을 조사한 결과는 Fig. 1 및 Fig. 2와 같다. 정자의 냉장보존시 희석액별 보존 1일후 SAI는 원정액과 1.2 M glucose와 인공해수에서 각각 3.2, 3.3, 3.15로 활발한 운동성을 보였고, 0.6 M glucose에서 1.4로 운동성이 가장 저조하였다. 보존시간이 경과 함에 따라 급속히 SAI가 떨어지는 실험군과는 달리 인공해수와 1.2 M

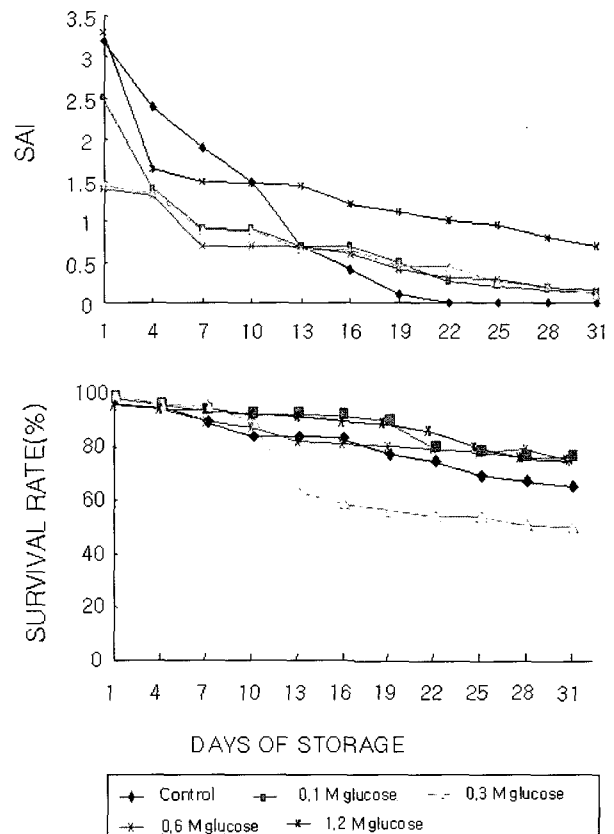


Fig. 1. Variation of sperm activity index (SAI, A) and survival rate (B) in sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus* sperm stored at 4°C with different glucose concentrations.

Table 1. Numerical index for the evaluation of sperm motility

Index	Score	Motility characteristics
I	4	Sperm display forward movement rapidly
II	3	Sperm display forward movement slowly
III	2	Sperm display forward movement slowly and vibrating movement moderately
IV	1	Sperm display vibrating movement slowly
V	0	Immobile sperm

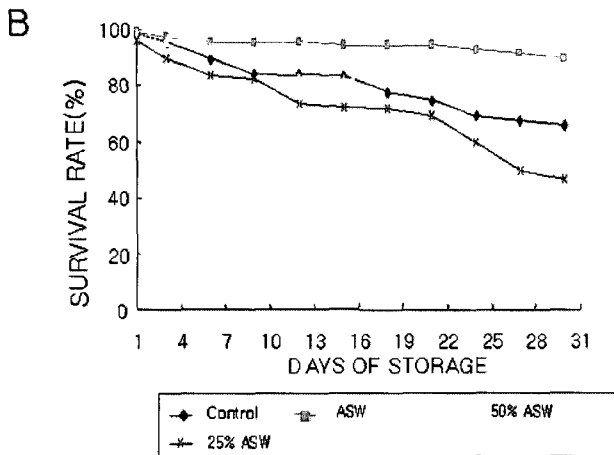
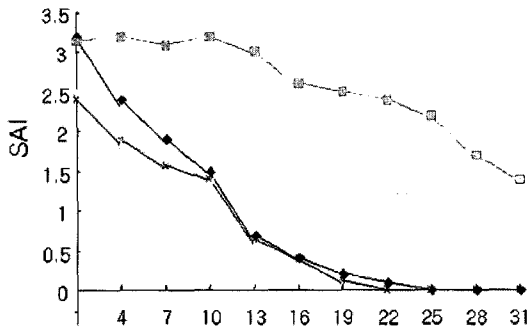


Fig. 2. Variation of sperm activity index (SAI) (A) and survival rate (B) in sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus* sperm stored at 4°C with different ASW concentrations.

glucose에서는 완만히 감소되어 보존효과가 가장 좋았다. 희석액별 정자의 생존율에서는 SAI와 달리 전실험군에서 비교적 완만히 생존율이 감소하였으며, 인공해수와 1.2 M glucose에서 가장 생존율이 높게 유지되었다.

희석액별로 10일동안 냉장보존한 정자의 수정률은 Fig. 3과 같과 같은데, 대조군인 비보존 정액의 정자는 평균 65.4±5.5%였던 반면, 희석액별로 보존한 정자의 수정률은 인공해수와 50% 인공해수 및 1.2 M glucose에서 각각 61±6.4%, 45.3±4.1%, 54±10.1%였다. 정자의 생존률과 수정률이 가장 높았던 인공해수를 희석액으로 하여, 희석액의 pH를 달리한 후 보존하였을 때의 SAI는 보존 30일째까지 pH 7.0과 8.0에서 높았다. 특히 pH 5.0과 6.0의 산성 희석액에서는 희석 직후부터 급격히 SAI가 감소하여 보존 13일과 19일째에 SAI가 0이 됨으로써, pH 7.0~8.0에서 보존효과가 좋았다(Fig. 4). 인공해수에 2종의 항생제를 농도별로 첨가하여 4°C에서 보존하였을 때, 보존기간에 따른 SAI를 조사한 결과는 Fig. 5에서

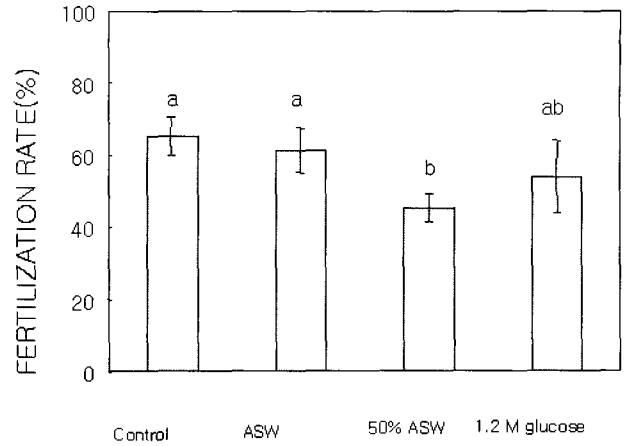


Fig. 3. Effects of diluents on fertilization rate of *Hemicentrotus pulcherrimus* sperm stored at 4°C. Different letters on the bars are significantly different (p<0.05).

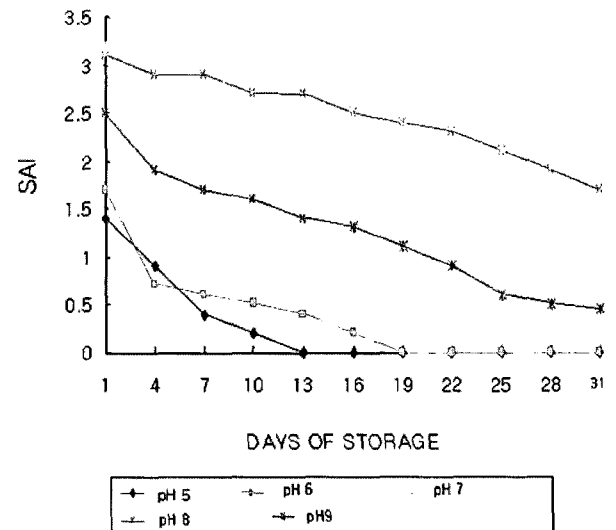


Fig. 4. Variation of sperm activity index (SAI) (A) and survival rate (B) in sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus* sperm stored at 4°C with several pH conditions.

보는 바와 같이 보존 20일 전후까지의 SAI는 항생제를 처리하지 않은 대조군과 항생제를 처리한 실험군에서 별다른 차이를 보이지 않았으나, 20일 이후에는 항생제를 처리한 실험군이 대조군에 비해 다소 약간 높은 SAI를 나타냈다. 이상의 조건에서 2종의 항생제를 농도별로 30일 동안 보존하였을 때 정자의 생존율에 있어서 약제에 따른 특이성은 나타나지 않았으나 농도별로 정자의 생존율에 차이를 보여 neomycine 400 ppm 처리군에서 82%로 가장 높았으며, gentamycin은 200 ppm에서 77%의 생존율을 나타내었다(Fig. 6).

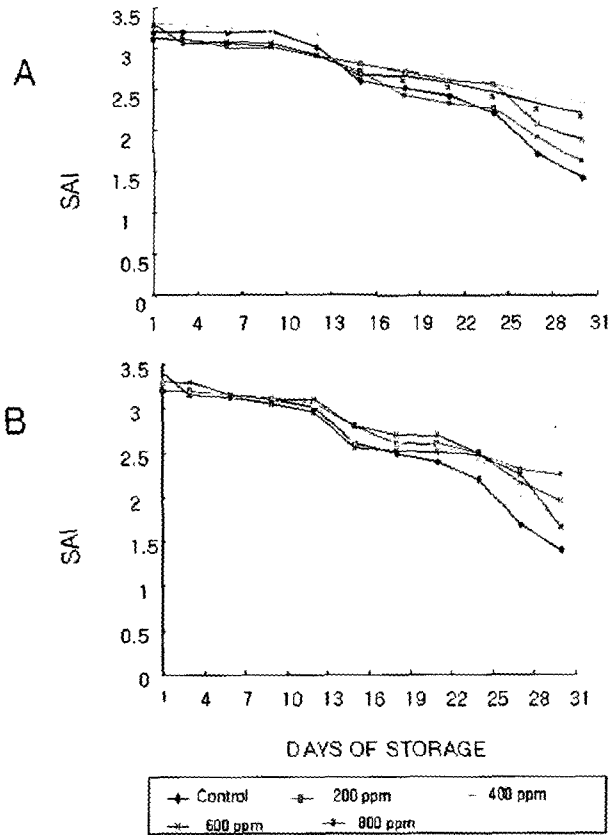


Fig. 5. Variation of sperm activity index (SAI) and survival rate in sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus* sperm at 4°C with two antibiotics. A: neomycin, B: gentamycin.

고찰

Blaxter (1953)가 청어 정자를 대상으로 한 실험에서 희석액으로 해수를 사용한 이래, 어류 정자의 보존에 많은 희석액들이 이용되어 왔다(Kubota, 1961; Wolf, 1963; Chao et al., 1975; Hara et al., 1982; Palmer, 1994). 말뚝성게 정자를 30일 동안 냉장보존한 본 연구에서는 1.2 M glucose, 인공해수와 같은 비교적 단순한 조성의 용액에서 보존효과가 가장 좋았다. 이것은 송어 정자를 6%, 10% 및 12%의 sodium citrate와 같은 단순한 조성의 용액을 보존액으로 사용하여 5°C에서 보존하였을 때 보존효과가 좋았다는 보고(Chao et al., 1987)와 유사한 결과를 보였다. 반면, Milkfish, *Chanos chanos*의 경우 동종의 혈청을 사용하여 냉장보존하였을 때 가장 보존효과가 뛰어난 것(Hara et al., 1982)으로 나타나, 본 연구와 차이를 보였는데 앞으로 보다 세밀한 연구를 통해 적정 희석액을 찾아야 할 것이다.

말뚝성게 정자보존시 적절한 pH를 찾기 위하여 희석액의 pH를 각기 달리하여 보존한 결과 pH 5.0와 6.0에서 보존한

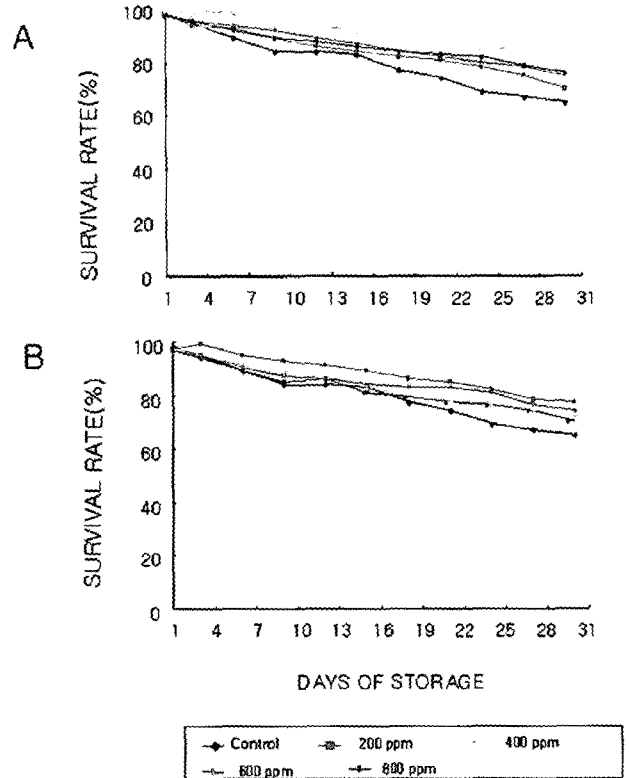


Fig. 6. Variation of survival rate in sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus* sperm stored at 4°C with two antibiotics. A: neomycin, B: gentamycin.

정자의 경우 각각 보존 13일과 18일부터 운동성이 완전히 소실된 반면에 pH 7.0와 8.0에서 보존한 정자는 보존 31일에도 각각 0.9, 1.7의 운동성을 유지하여 보존액의 적절한 pH는 7.0~8.0인 것으로 확인되었으며, 이것은 틸라피아, *Epinephelus malabaricus*의 정자가 pH는 7.5~8.0(Chao et al., 1987)에서 운동성이 높게 나타난 결과와 일치하였다.

실험동물의 정액채취시 배설물이나 환경수에 의한 박테리아 감염을 피하기 힘들기 때문에 액상보존에서 항생제 사용은 필수적인 과정이다(Stoss & Refstie, 1983). 희석액에 항생제 첨가는 정자의 생존을뿐만 아니라 수정률의 감소도 막아 줌으로써(Saad et al., 1987), 액상보존시 보존효과를 높일 수 있는 효과적인 방법이다. 그러나 Stoss 등 (1978)은 항생제가 박테리아의 증식을 억제시켰지만, 항생제의 농도가 증가하면 역효과를 낸다고 하여 적절한 농도의 항생제 사용이 중요함을 시사하였다. 또한, Chao 등 (1987)은 틸라피아 정자의 보존시 chloramphenicol, chlortetracycline 및 gentamycin에 비해 400~500 ppm의 neomycin sulphate에서 보존효과가 가장 좋게 나타났다고 하여, 항생제의 농도뿐만 아니라 종류에 따라서도 보존효과에 차이가 있음을 강조하였다. 본 연구에서

는 neomycin과 gentamycin 사이에 약제에 따른 보존효과의 차이는 나타나지 않았으나, 항생제의 농도에 따라서 정자의 생존율과 SAI의 차이를 보였다. 따라서 앞으로 채취한 정액의 세균동정, 그에 따른 적절한 약제선택, 보다 세밀한 적정 농도, 보존온도, 가스교환 등 보다 세부적인 연구가 이루어져야 할 것이다.

인용문헌

- Asahina E, Takahashi T (1979) Cryopreservation of sea urchin embryos and sperm. *Dev Growth and Differ* 21:423-430.
- Blaxter JHS (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 stained by means of eosin-nigrosin. *Fertil Steril* 1:176-177.
- Chao NH, Chen H, Chen P, Liao IC (1975) Study on cryogenic preservation of grey mullet sperm. *Aquaculture* 5:389-406.
- Chao NH, Chao WC, Chao K, Liu C, Liao IC (1987) The properties of tilapia sperm and its cryopreservation. *J Fish Biol* 30:107-118.
- Fribourgh JH (1966) The application of a differential staining method to low-temperature studies on goldfish spermatozoa. *Prog Fish-Cult* 28:227-231.
- Hara S, Canto JT, Almendras JME (1982) A comparative study of various extenders for milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal), sperm preservation. *Aquaculture* 28:339-346.
- Kubota Z (1961) Foundation studies in the culturing of the Japanese loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. III. Storing of spermatozoon. *J Shimonoseki Coll Fish* 11:247-269.
- Lannan JE (1971) Experimental self-fertilization of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), utilizing cryopreserved sperm. *Genetics* 68:599-601.
- Matsunaga H, Nakahiro I, Hisashi K, Reijiro H (1983) A preliminary Study about Cryopreservation of Abalone Sperm. *J Fac Appl Biol Sci (Hiroshima Univ.)* 22: 135-139.
- McNiven MA, Gallant RK, Richardson GF (1993) Fresh storage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen using a non-aqueous medium. *Aquaculture* 109:71-82.
- Palmer PJ (1994) Chilled storage of pike bream, *Acanthopagrus berda*, sperm and activation in different salinities. *Asia Fish Sci* 7:35-40.
- Saad AR, Billard M, Theron C, Hollebecq MG (1987) Short-term preservation of Carp (*Cyprinus carpio*) semen. *Aquaculture* 71:133-150.
- Stoss J, Buyukhatipoglu S, Holtz W (1978) Short-term and cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. *Ann Biol Anim Biochem Biophys* 18: 1077-1082.
- Stoss J, Refstie T (1983) Short-term storage and cryopreservation of milt from atlantic salmon and sea trout. *Aquaculture* 30:229-236.
- Strussmann CA, Renard P, Ling H, Takashima F (1994) Motility of pejerrey *Odontesthes bonariensis* spermatozoa. *Fish Sci* 60:9-13.
- Wolf B (1963) Physiological salines for fresh-water teleosts. *Prog Fish-Cult* 25:135-140.
- Zar JH (1984) *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs NJ, pp. 620.