

희석액별 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 정자의 냉장보존 효과

임한규* · 안철민 · 손맹현 · 박민우 · 박윤정
국립수산과학원 양식관리팀

Effect of Diluents for Cold Storage of Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*) Sperm

Han Kyu LIM*, Cheul Min AN, Maeng Hyun SON, Min-Woo PARK
and Yun Jung PARK
Aquaculture Management Team, National Fisheries Research and
Development Institute, Busan 619-902, Korea

The effects of diluents composition on cold storage for olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm were examined in terms of the swimming speed of sperm, the percentage of mobile sperm, and fertilization rates. The following results indicated that cold storage methods with fresh conditions could be employed in olive flounder milt preservation. The preserved sperm of olive flounder that was diluted 1:10 with artificial seminal plasma II (ASP II) and Stein's solution (SS) at 0°C remained motile for 30 days. The most effective condition for cold storage was ASP II and SS at 0°C for the sperm, although there is no significant difference statistically. No difference in the fertilization rate was found between fresh sperm and the preserved ones with ASP I, II and SS at 10 days post-storage.

Key words: olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, sperm, sperm storage

서 론

양식산업에 많은 도움을 줄 수 있는 어류 정자의 보존 방법은 크게 단기간동안 냉장 보존하는 방법과 장기간동안 냉동보존하는 방법으로 나눌 수 있다. 냉동보존 방법은 장기간 정자를 보존 할 수 있다는 장점은 있지만 냉동과정이 복잡하고 프로그램 동결기나 액체질소탱크 등 많은 장비가 필요하다는 단점이 있다(Lim, 1998). 따라서 실제 인공종묘생산 현장에서 산란기간 동안 간편하게 사용할 수 있는 정자의 보존방법이 요구되고 있다.

어류 정자의 냉장보존은 어류의 종묘생산시 어미의 방란방정 시기와 성비의 차이에 따른 문제점들을 극복할 수 있게 하며, 정액의 수송이나 수정과정 등을 간편하게 할 수 있다. 특히 운동성의 감소나 수정능력의 저하 없이 정자를 단기간 냉장상태로 보존 할 수 있는 방법의 개발은 종묘생산 현장에서 보존정자의 상용화를 촉진시킬 수 있을 것이다(Lim et al., 1997).

지금까지 국내외에서 어류정자의 냉장보존에 관한 연구는 희석액에 따른 보존효과(Chao et al., 1975; Hara et al., 1982; McNiven et al., 1993; Lim et al., 1997; Chang et al., 1999a; Chang et al., 1999b; Chang et al., 2002; DeGraaf and Berlinsky, 2004)에 관한 연구와 그 외에 산소공급에 따른 정자의 수정능력 향상(Stoss and Holtz, 1983; DiLauro et al., 1994), 항생제

사용에 따른 보존기간 연장(Stoss et al., 1978; Saad et al., 1988; Chao et al., 1992; Brown and Mins, 1995; Chang et al., 2002) 및 희석액의 농도에 따른 수정률의 검토(Erdahl and Graham, 1987) 등 최적의 냉장보존방법을 찾기 위한 방향으로 연구가 진행되어 왔었다.

본 연구는 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 육종프로그램의 1:1 선택교배를 지원하고 우량 수컷을 이용한 인공 종묘생산기술을 보급하기 위한 연구의 일환으로 수행되었다. 그러므로 연구의 목적은 넙치 정자를 산란기간동안 간편하게 냉장보존할 수 있는 방법을 개발하기 위하여 넙치 정자의 냉장보존에 적합한 최적의 희석액을 개발하는 것이다.

재료 및 방법

정액채취를 위한 실험어로는 국립수산과학원 양식과학부의 사육시스템에서 사육한 넙치(체중 651.4±35.7 g)를 사용하였다. 정액을 얻기 위하여 실험어를 200 ppm 농도의 3-amino-benzoic acid ethyl ester에 마취시킨 다음 해수와 배설물에 오염되지 않도록 주의하며 복부를 여러번 가볍게 문질러 정액을 채취하였다. 채취된 정액은 1.5 mL 튜브에 넣어 밀봉한 후 실험에 사용될 때까지 얼음을 채운 ice box에서 보관하였고 실험 전 정자의 활성을 조사하여 활성이 높은 정자만 냉장보존 실험에 이용하였다.

냉장보존 실험 전, 넙치 정자의 보존에 적합한 인공정장용 제조하기 위하여 27마리의 넙치로부터 정액을 채취하여 정액

*Corresponding author: limhk@nfrdi.re.kr

의 pH, 삼투질농도 및 정자수를 각각 pH meter (istek Model 735P, Korea), osmometer (The Advanced™, USA) 및 혈구계산판을 이용하여 측정하였다. Spermocrit는 microhematocrit법을 변형하여 측정하였으며 원심분리 후 정장의 생화학적 조성은 생화학분석기(Fuji Dri-Chem 3500, Japan)로 분석하였다. 각각의 분석결과를 토대로 넙치 정자의 냉장보존용 인공정장(artificial seminal plasma, ASP) 2가지를 만들었으며 냉장보존에는 인공정장 외에도 해산어류생리식염수(marine fish Ringer's solution, MFR)와 Stein's solution (SS)을 희석액으로 사용하였고, 희석하지 않은 원정액(undiluted milt, UM)을 대조구로 사용하였다(Table 1). 온도에 따른 냉장보존 효과를 파악하기 위하여 정액은 각 희석액과 1:10의 비율로 혼합한 후 0, 2, 4°C로 설정된 인큐베이터에 보존하면서 5일 간격으로 운동성을 파악하였다.

Table 1. Constituents of diluents used in cold storage

	ASP I	ASP II	SS	MFR
KCl (g/L)	1.55	0.87	0.40	0.60
NaCl (g/L)	6.52	8.24	7.50	13.50
CaCl ₂ (g/L)	0.4	0.54	-	0.35
MgCl (g/L)	2.12	0.13	-	0.02
Glucose (g/L)	0.24	0.02	1.00	-
NaHCO ₃ (g/L)	-	-	2.00	0.03
pH	7.9	7.79	8.21	7.70
Osmolality (mOsm/kg)	295	293	291	444

ASP I, artificial seminal plasma I; ASP II, artificial seminal plasma II; MFR, marine fish Ringer's solution; SS, Stein's solution.

정자의 운동성을 평가하기 위하여 보존된 정액을 인공해수에 300배 희석하여 정자운동성 관찰용 slide glass (Teflon Printed Glass Slide; 21 wells; diameter of each well, 4 mm; Funakoshi Co., Japan) 위에 4μL씩을 분주하여 cover slide 없이 운동성을 관찰하였다. 운동성은 현미경(Axioskop 2 plus ZEISS, Germany)에 부착되어 있는 video camera와 video-timer가 있는 VHS video-recorder로 기록하였다. Video-timer는 정자의 희석과 함께 동시에 가동하여, 정자 운동이 종료할 때까지 video tape에 녹화하였다. 녹화된 tape를 모니터상에서 재생하면서 정자의 움직임은 속도와 비율을 조사하였다. 모든 실험은 3반복으로 실시하였으며, 한 시료 당 3회 측정하여 평균을 이용하였다. 보존한 정자의 수정률을 평가하기 위하여 3마리의 암컷 어미로부터 복부 압박법으로 채취한 알들을 10일간 보존한 정자로 실온(18±1°C)에서 수정시켰다. 수정률의 판정은 4 cells 이상으로 발생한 알들만 수정된 것으로 간주하였고, 전체적으로 수정률이 낮았기 때문에 수정률의 표현은 보존하지 않은 신선한 정액과 수정시킨 것을 100%로 간주한 후 그에 대한 비율로 환산하였다.

각 실험 결과로부터 얻어진 모든 측정값들은 평균 ± 표준오차로 표시하였으며, 측정값들 사이의 유의차 유무는 SPSS-통계 패키지(version 9.0)를 사용하여 95%의 신뢰수준에서 ANOVA와 Tukey's multiple range test로 검정하였다.

결 과

넙치의 인공정장을 제조하기 위하여 넙치 정액과 정장의 특성 및 화학적 성분을 분석한 결과, 정자의 농도는 mL당 $1.30 \pm 0.17 \times 10^9$ 마리였으며, 정장의 pH와 삼투질농도는 각각 7.79 ± 0.09 과 295 ± 2 mOsm/kg이었다. Spermocrit는 91 ± 2 였으며, 정장의 K⁺, Na⁺, Cl⁻ 및 glucose 농도는 각각 11.6 ± 0.3 , 141 ± 3 , 123 ± 1 mmol/L 및 2.4 ± 0.2 mg/100 mL이었다(Table 2).

Table 2. Properties of milt and seminal plasma of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) (Mean±SE)

Properties	Values
Spermatozoa concentration ($\times 10^9$ /mL)	1.30 ± 0.17
Spermocrit	91 ± 2
K ⁺ (mmol/L)	11.6 ± 0.3
Na ⁺ (mmol/L)	141 ± 3
Cl ⁻ (mmol/L)	123 ± 1
Ca (mg/100 mL)	9.7 ± 0.4
Mg (mg/100 mL)	3.3 ± 0.3
Glucose (mg/100 mL)	2.4 ± 0.2
pH	7.79 ± 0.09
Osmolality (mOsm/kg)	295 ± 2

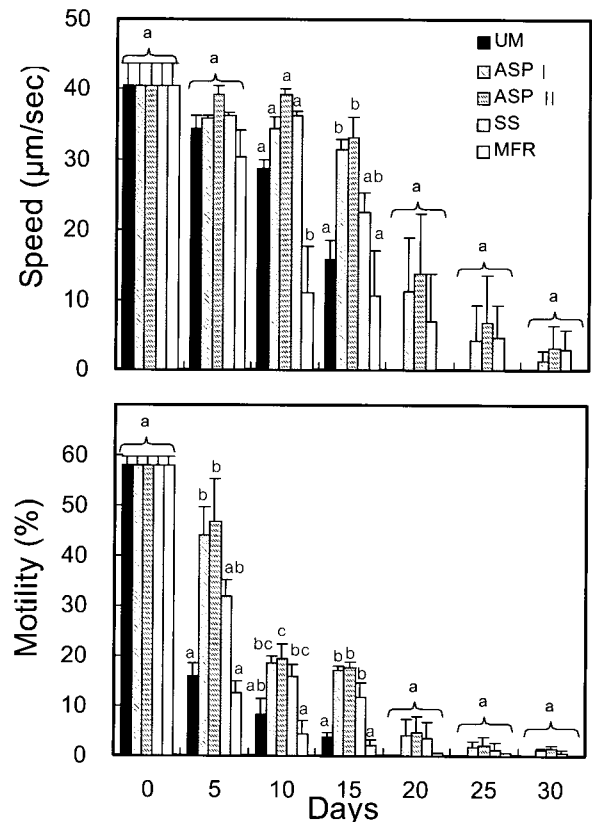


Fig. 1. Changes of swimming speed and mobile sperm percentage of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm stored at 0°C with four diluents. ASP I, artificial seminal plasma I; ASP II, artificial seminal plasma II; MFR, marine fish Ringer's solution; SS, Stein's solution; UM, undiluted milt. Different superscripts indicate significant differences between sampling times ($P < 0.05$).

0°C에서 정자를 냉장보존한 결과는 Fig. 1과 같았다. 5일째까지 희석액별로 정자의 운동속도는 유의적인 차이가 없었으나 10일째부터 MFR은 다른 희석액과 비교하여 현저하게 낮아졌으며 UM은 15일째부터 ASP보다 낮아졌다. ASP II를 희석액으로 이용하여 보존한 경우, 정액을 채취한 직후(0일) 정자의 운동속도는 40.5 μm/sec였고, 보존 15일 후에도 32.1 μm/sec로 비교적 좋은 운동성을 보였으며, 30일째에도 9.6 μm/sec의 속도로 운동하였다. 움직이는 정자의 비율은 보존 5일째부터 원정액과 MFR이 다른 희석액과 비교하여 유의적으로 낮아졌다. 2°C에서 보존한 정자의 운동속도는 10일째부터 희석액별로 차이를 보였으며, ASP I과 ASP II가 다른 희석액 보다 보존효과가 좋았고, 움직이는 정자의 비율도 ASP I, ASP II 및 SS가 UM이나 MFR보다 높았다(Fig. 2). 4°C의 보존 온도는 2°C나 0°C보다 보존효과가 떨어졌으며 25일째까지만 정자의 운동성을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

냉장보존한 넙치 정자의 수정능력을 평가하기 위하여 정자의 활력이 비교적 높게 유지되었던 10일째에 보존 정자를 사용한 수정률 결과는 Fig. 4와 같다. 0°C의 경우 MFR에 보존한 정자를 제외한 다른 실험구에서 신선한 정액과 유의적인

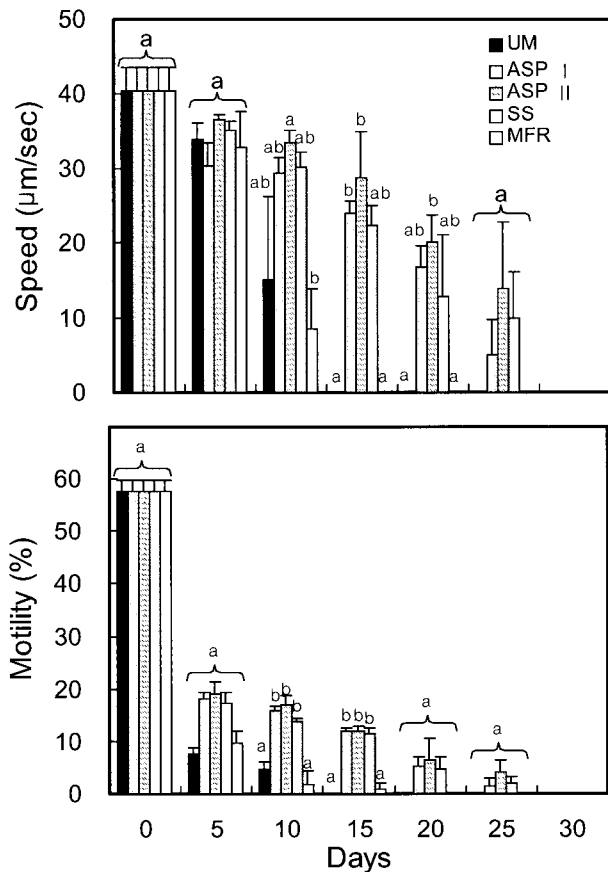


Fig. 2. Changes of swimming speed and mobile sperm percentage of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm stored at 2°C with four diluents. Other details as for Fig. 1.

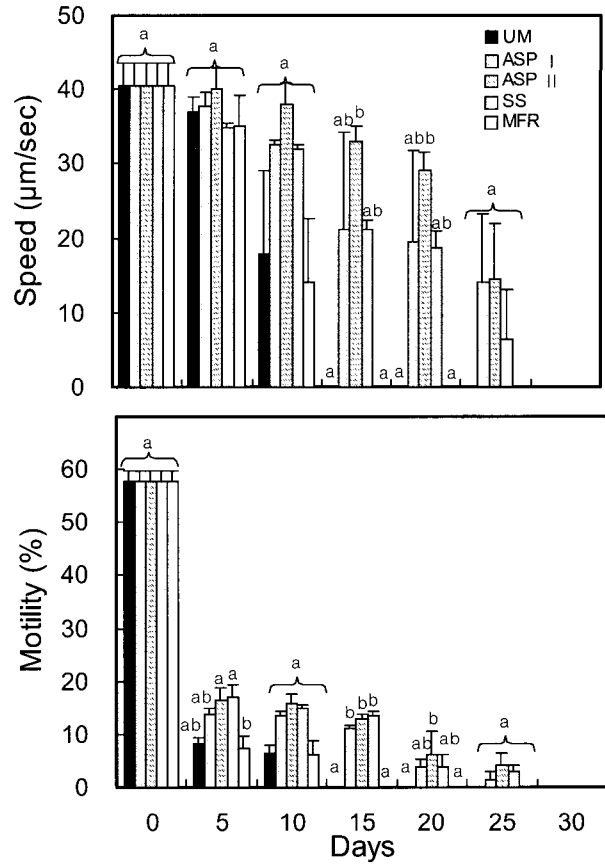


Fig. 3. Changes of swimming speed and mobile sperm percentage of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm stored at 4°C with four diluents. Other details as for Fig. 1.

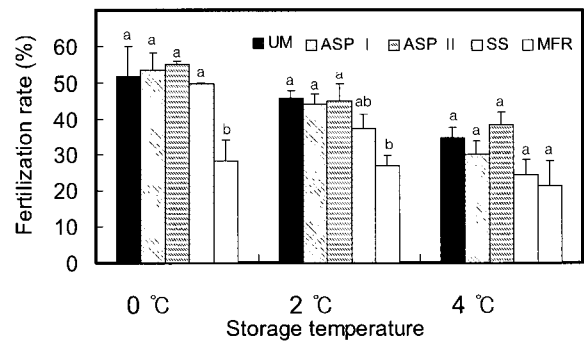


Fig. 4. Variation in fertilization rate of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm stored at different water temperature with four diluents. Other details as for Fig. 1.

차이를 보이지 않았으며, 2°C와 4°C에서도 ASP I, II 및 SS의 수정률은 신선한 정액과 유의적인 차이를 보이지 않았으나 온도가 높아짐에 따라 수정률은 모든 실험구에서 낮아지는 경향을 보였다.

고 찰

어류 정자의 냉장보존에 영향을 미치는 주요 요인으로는 희석액의 조성, 희석비율, agitation, 항생제 첨가, 산소공급 및 보존온도 등이 있다. 이 가운데 가장 중요한 요인중 하나는 보존하고자 하는 어종의 정자에 맞는 적절한 희석액을 만드는 일이다. 지금까지 많은 연구에서 어종에 따라 다양한 종류의 희석액이 이용되어왔는데(Table 3), 이런 희석액들이 갖추어야 할 가장 중요한 요건은 희석 후에도 정자가 운동하지 않도록 하여 운동에 필요한 에너지의 소비를 효과적으로 억제시키는 데에 있다(Ohta and Izawa 1996). 가자미류를 대상으로 한 이전의 연구(Chang et al., 2002)에서 넙치, 참가자미(*Limanda herzensteini*) 및 강도다리(*Platichthys stellatus*)의 경우 가장 냉장보존 효과가 좋았던 희석액은 SS였다고 보고하여, 본 연구의 결과와 비슷하였다. Chang et al. (1997)은 자주복(*Takifugu rubripes*) 정자의 냉장보존을 위한 적정 희석액을 결정하는 실험에서 MFR과 1% NaCl이 적절한 희석액이었다고 보고하였으며, 황복(*Fugu ocellatus obscurus*)에서는 0.3 M glucose가 효과가 좋았다고 하였다(Chang et al., 1999b). 그러나 감성돔(*Acanthopagrus schlegelii*) (Lim, 1998)과 송어(*Mugil cephalus*) (Chang et al., 1999a)에서는 인공적인 희석액 보다는 동일 어종의 혈청을 사용하였을 때 냉장보존 효과가 좋았으며, Hara et al. (1982)도 milkfish, (*Chanos chanos*)의 정자를 0-4°C에서 보존하였을 때, 동종의 혈청이 다른 희석액들 보다 뛰어난 보존효과를 보였다고 보고하였다. 이것은 혈장의 삼투

투질농도와 pH가 정장과 비슷하였기 때문에 정자의 냉장보존에 긍정적으로 작용하였을 것으로 예상된다. 이처럼 냉장보존에 있어 적절한 희석액의 종류는 어종에 따라 차이가 있으므로, 정자의 운동을 억제시킬 수 있고 삼투질농도나 이온조성이 정장과 유사한 희석액을 선택하여 사용함으로써 보존효과를 높일 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서도 넙치 정장의 삼투질농도, pH 및 이온조성 등을 분석하여 최대한 정장과 비슷한 ASP를 제작하여 냉장보존에 이용함으로써 좋은 결과를 얻었다. 본 연구에서 효과가 좋았던 ASP II는 삼투질농도와 pH가 넙치 정장과 거의 같았으며 이온조성도 넙치 정장의 분석자료를 기초로 하였기 때문에 넙치 정자에게 안정적인 보존환경을 제공해 주었다고 예상된다. 앞으로 이러한 ASP의 활용은 인공종묘생산 현장은 물론 인위적인 수정과정이 필요한 선택교배 등의 연구에도 많은 도움이 되리라 생각된다.

예비실험에서 넙치 정자는 희석비율이 높아짐에 따라 운동성이 감소하였기 때문에 냉장보존 실험에서는 채취한 정액의 양을 고려하여 정액:희석액의 비율을 1:10으로 하였다. 희석비율이 높아질수록 정자의 활성이 급격히 낮아지는 것은 희석비율이 높으면 정자의 운동이 개시되어 보존효과가 떨어지는 "dilution effect" 때문이라고 생각된다(Erdahl and Graham 1987). 이와 같은 결과는 가자미류(Chang et al., 2002), 자주복(Chang et al., 1997) 및 bluefin tuna (Doi et al. 1982)의 정자를 낮은 비율로 희석할수록 운동성과 수정률이 높다는 결과와

Table 3. List of diluents for cold storage of fish sperms

Fish	Diluents	References
Atlantic cod	MME	DeGraaf and Berlinsky, 2004
Atlantic salmon	MCM UM	Truscott et al., 1968 Stoss and Refstie, 1983
Black sea bream	Plasma	Lim, 1998
Bluefin tuna	Mounib's medium	Doi et al., 1982
Brown sole	SS	Chang et al., 2002
Carp	UM	Billard et al., 1988
Chum salmon	UM	Jensen and Alderdice, 1984
Grey mullet	Plasma	Chang et al., 1999a
Grouper	Extender 251, 198	Withler and Lim, 1982
Haddock	MME	DeGraaf and Berlinsky, 2004
Japanese eel	Isotonic KCl	Ohta and Izawa, 1996
Marbled sole	1% NaCl	Chang et al., 2002
Milkfish	Serum	Hara et al., 1982
Olive flounder	SS	Chang et al., 2002
Paddlefish	NaCl 100-150 mM glucose, 20 mM tris	Brown and Mins, 1995 Linhart et al., 1995
Rainbow trout	Fluorocarbon UM	McNiven et al., 1993 Stoss et al., 1978
River puffer	0.3 M glucose	Chang et al., 1999b
Shovelnose sturgeon	100-150 mM glucose, 20 mM tris	Linhart et al., 1995
Starry flounder	SS	Chang et al., 2002
Tiger puffer	MFR	Chang et al., 1997
Tilapia	EC	Harvey and Kelley, 1984

EC, egg yolk-citrate with sucrose or glucose; MCM, modified Cortland medium; MFR, marine fish Ringer's solution; MME, modified Mounib's extender; SS, Stein's solution; UM, undiluted milt.

일치하였다.

보존온도는 냉장보존의 기간을 결정하는 요인 중 하나이다. 저온은 정자의 대사를 감소시켜 보존기간을 연장시키고(Stoss and Holtz, 1983) 채정시 감염된 세균의 번식을 억제시키지만 너무 낮은 온도는 정자에게 냉해를 줄 수 있다. 본 실험에서는 넙치 정자의 냉장보존을 위해 0°C가 가장 좋은 결과를 보여, 지금까지 국내에 보고된 송어(Chang et al., 1999a)나 황복(Chang et al., 1999b) 및 감성돔(Lim, 1998)과 같은 결과를 보였다.

냉장보존시 희석액에 항생제를 첨가하는 것은 채정시 혼입된 세균의 성장을 억제시켜(Stoss and Refstie, 1983), 정자의 운동성이나 생존을 뿐만 아니라 수정률을 높이는 데에 도움이 된다(Stoss et al., 1978; Saad et al., 1988; Chao et al., 1992). 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 높아진다고 하여, 항생제의 종류뿐만 아니라 항생제의 농도에 따라서도 보존효과에 차이가 있음을 강조하였다. 그러나 본 연구에서는 보존기간을 연장시키기 위하여 항생제 첨가와 0°C 이하에서의 냉장보존효과에 관해서는 조사를 하지 못했기 때문에 앞으로 냉장상태로 30일 이상 보존하기 위해서는 항생제 첨가뿐만 아니라 0°C 이하 저온에서의 보존효과도 검토할 필요가 있다.

사 사

이 연구는 국립수산물과학원의 수산시험연구과제인 「수산생물의 번식기구 연구」의 일부로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- Billard, A.S., M.C. Theron and M.G. Hollebecq. 1988. Short-term preservation of carp (*Cyprinus carpio*) semen. *Aquaculture*, 71, 133-150.
- Brown, G.G. and S.D. Mins. 1995. Storage, transportation, and fertility of undiluted and diluted paddlefish milt. *Prog. Fish-Cult.*, 57, 64-69.
- Chang, Y.J., Y.J. Chang and H.K. Lim. 1997. Short-term preservation of sperm in the tiger puffer, *Takifugu rubripes*. *J. Aquacult.*, 10, 273-279.
- Chang, Y.J., Y.J. Chang and H.K. Lim. 1999a. Cold storage and cryopreservation of grey mullet (*Mugil cephalus*) sperm. *J. Aquacult.*, 12, 57-62.
- Chang, H.K. Lim, Y.J., Y.J. Chang, H.S. Kim and H.T. Huh. 1999b. Physico-chemical properties and cold storage of river puffer (*Takifugu obscurus*) milt. *J. Kor. Fish. Soc.*, 32, 243-246.
- Chang, Y.J., Y.J. Chang, H.K. Lim, J.K. Lee and Y.J. Park. 2002. Cold storage of milt from four species of flatfish. *J. Fish. Sci. Technol.*, 5, 64-74.
- 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.
- DeGraaf, J.D. and D.L. Berlinsky. 2004. Cryogenic and refrigerated storage of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) spermatozoa. *Aquaculture*, 234, 527-540.
- DiLauro, M.N., W.F. Krise, M.A. Hendrix and S.E. Baker. 1994. Short term storage of Atlantic sturgeon sperm. *Progr. Fish-Cult.*, 56, 143-144.
- 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, 495-498.
- 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.
- Harvey, B. and R.N. Kelley. 1984. Chilled storage of *Sarotherodon massambicus* milt. *Aquaculture*, 36, 85-95.
- 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.
- Jensen, J.O.T. and D.F. Alderdice. 1984. Effects of temperature on short-term storage of eggs and sperm of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Aquaculture*, 37, 251-265.
- Lim, H. K., 1998. Physiological properties of sperm and gamete preservation in black seabream, *Acanthopagrus schlegeli*. Ph.D. Thesis, Pukyong National University, Busan, Korea, pp. 130.
- Lim, H.K., K.H. Kho and Y.J. Chang. 1997. Effects of diluents on the short-term storage of sperm in black seabream, *Acanthopagrus schlegeli*. *J. Kor. Fish. Soc.* 30, 211-215.
- Linhart, O., A.D. Mims and W.L. Shelton. 1995. Motility of spermatozoa from shovelnose sturgeon (*Scaphirhynchus platorynchus* Rafinesque 1820), and paddlefish (*Polyodon spathula* Walbaum, 1792). *J. Fish Biol.*, 47, 902-909.

- 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.
- Ohta, H. and T. Izawa. 1996. Diluent for cool storage of Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. *Aquaculture*, 142, 107-118.
- Saad, A., R. Billard, M.C. Theron and M.G. Hollebecq. 1988. Short-term preservation of carp (*Cyprinus carpio*) semen. *Aquaculture*, 71, 133-150.
- Stoss, J., S. Buyukhatipoglu and W. Holtz. 1978. Short-term and cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) sperm. *Ann. 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. 1983. Successful storage of chilled rainbow trout (*Salmo gairdneri*) spermatozoa for up to 34 days. *Aquaculture*, 31, 269-274.
- 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.
- Withler, F.C. and L.C. Lim. 1982. Preliminary observation of chilled and deep-frozen storage of grouper (*Epinephelus tauvina*) sperm. *Aquaculture*, 27, 389-392.

2005년 6월 20일 접수
2005년 8월 22일 수리