

참돔, *Pagrus major* 정자의 동결보존에 미치는 희석제와 동해방지제의 효과

고 강 희*

전남대학교 수산해양대학 해양기술학부

Effects of Cryoprotectants and Diluents on Cryopreservation of the Red Seabream, *Pagrus major* Sperm

Kang Hee Kho*

Faculty of Marine Technology, Chonnam National University, Yeosu 550-749, Korea

A series of experiments were conducted to compare the effects of various diluents and cryoprotectants on the motility and survival rate in cryopreservation of the red seabream, *Pagrus major* sperm. Sperm was efficiently cryopreserved using 300 mM glucose as a diluent. Two cryoprotectant, dimethyl sulfoxide (DMSO) and glycerol, were added to 300 mM glucose to formulate the extenders at concentrations between 5% and 30% by volume for freezing. The highest post-thawed sperm motility and survival rate were obtained with 10% DMSO.

Key words : *Pagrus major*, cryopreservation, cryoprotectants, diluents, dimethyl sulfoxide

서 론

수산 동물 정자의 보존은 산업적으로 중요한 양식 대상종의 인공종묘 생산시 어미의 방란 방정시기와 성비의 차이에 따른 문제점을 극복할 수 있게 하며, 정액의 수송이나 조작 등을 간편하게 한다. 개체 수준의 보존의 경우 고비용과 사육관리의 어려움 및 다른 종과의 오염 등 많은 문제점을 가지고 있는 반면 생식세포 수준에서의 보존법은 비용의 절감과 우량 유전자원을 효율적으로 보존할 수 있다는 잇점을 가지고 있어 새로운 품종 개발시 유익한 도구로도 활용될 수 있다. 어류 정자의 보존에 관한 연구는 Blaxter (1953)가 청어의 정액을 6개월간 보존하여 수정에 성공한 이래, 암수 친어간 성성

속 시기의 차이를 해결하고 우량 형질을 가진 계통을 보존하기 위하여 꾸준히 진행되어 왔다. 이러한 연구의 결과로 1970년 후반부터 연어과 어류에서 동결 정자에 의한 수정률이 80%를 상회하는 단계에 이르렀다. 그러나 정자 동결보존시 사용되는 희석액과 동해방지제의 종류와 농도에 따라 보존 결과에 큰 차이가 보고되어, 정자 보존을 위한 보다 기초적인 정보를 필요로 하게 되었다. 동결보존을 성공적으로 수행하기 위해서는 우선적으로 냉동에 의한 피해를 최소화하기 위하여 냉동 대상에 적합한 동해방지제를 선택하여야 한다 (Lim *et al.*, 2003). 동해방지제는 세포가 냉동되는 과정에서 생겨나는 세포내 전해질의 농축이나 삼투질 농도의 상승과 세포 내외의 빙결정 형성 등 세포의 생존에 불리한 상태를 완화시키거나 조절하는 작용을 가지고 있기 때문에 일반적으로 생식세포를 냉동보존할 때 냉동에 의한 손상을 막기 위하여 사용된다 (Kuwano and Saga, 2000).

*Corresponding author: kkh@chonnam.ac.kr

동해방지제의 구비조건으로는 중성으로 세포막의 투과성이 높아야하며, 세포에 대한 독성도 약해야 한다. 또한 정자보전전에 이루어지는 정액의 희석은 정자의 삼투압, pH 및 ion 농도를 조절하여 주는 중요한 요인이다. 또한 수정시에 정액의 양을 늘려주는 역할도 한다. 희석액은 냉동전까지 효과적으로 운동성을 억제할수 있도록 이온, 삼투질 농도변화에 의해 정자가 활성화되는 것을 방지하는 물질이어야 한다.

본 연구에서는 해산어류 정자의 보존기술을 개발하기 위한 기초자료를 얻고자, 중요 양식대상종인 참돔, *Pagrus major* 정자를 이용하여 적절한 희석액, 동해방지제의 효과를 검토하였다.

재료 및 방법

1. 재료

실험재료로는 2006년 3월에서 7월 사이에 여수근해에서 채집한 참돔 수컷 어미의 정액을 사용하였다. 정액은 배설물이 혼입되지 않도록 복부를 주의깊게 눌러 채취하여 얼음위에서 보관하며 실험에 사용하였다.

채취한 정액중에서 인공해수 (artificial sea water, ASW; 423.00 mM NaCl, 9.00 mM KCl, 9.27 mM CaCl₂, 22.94 mM MgCl₂, 2.114 mM NaHCO₃, 10 mM Hepes-pH 7.8)에서 희석직후의 운동성이 거의 100%인 정액만을 실험재료로 사용하였다.

2. 정자운동성 및 생존율의 측정

정자가 슬라이드 글라스에 달라붙는 것을 방지하기 위하여 1% 소 혈청액을 이용하여 슬라이드 글라스를 코팅한 후 실험에 사용하였다. 동결보존의 각 실험별 정액의 처리조건에 따른 운동성을 평가하기 위하여 각각의 실험에서 앞의 방법에 따라 보존한 희석정액을 인공해수와 1 : 5의 비율로 섞은 다음, 광학현미경으로 관찰된 운동지수에 따라 점수를 부여하였고 (Table 1), Strussmann *et al.* (1994)의 방법을 변형한 Table 1에 따라 정자활성지수 (sperm activity index, SAI : SAI=점수×운동정자의 비율 (%) / 100)를 계산하였으며 각 실험에 대한 정자활성지수는 5회 측정하여 평균을 구하였다. 냉동보존한 정자의 생존 여부는 정자를 5% eosin-10% nigrosin (Blom, 1950; Fribourgh, 1966)에 염색한 다음, 정자의 염색정도에 따라 판별하였으며, 광학현미경 (×1,000) 아래에서 5회 측정하여, 전체 정자수에 대한 살아 있는 정자수의 비율로 생존율을 구하였다. 실험결과는 일원 분

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

산분석과 Tukey test (Zar, 1984)로 검정하였다.

3. 희석액과 동해방지제

희석액에 따른 정자의 동결보존 효과를 조사하기 위한 실험에서는 희석액으로 150 mM NaCl (10 mM Hepes-pH 7.8), 300 mM glucose (10 mM Hepes-pH 7.8), 해산경골어류용 생리식염수 (marine fish Ringer's solution, MFRS; 230 mM NaCl, 8 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 3.7 mM MgCl₂, 0.2 mM NaHCO₃, 10 mM Hepes-pH 7.8)를 사용하였으며 동해방지제로는 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 사용하였으며, DMSO의 최종농도는 15%로 하였고, 평형시간은 1분 이내로 하였다. 동해방지제의 종류와 농도별 실험에서는 300 mM glucose에 DMSO와 glycerol을 각각 최종 농도가 5, 10, 15, 20, 25 및 30% 되도록 하였으며, 평형시간은 1분 이내로 하였다. 해동한 정자의 운동성과 생존율은 냉동하여 10일 경과후 조사하였다. 모든 냉동보존 실험에서 정자의 냉동은 희석정액이 주입된 0.5 mL 용량의 straw를 액체질소 증기 (-76°C)에 의해 5분간 1차 냉동한 다음, 즉시 액체질소 (-196°C)에 넣어 급속 냉동하였다. 각 실험에서 냉동된 정자는 실험에 사용하기 전까지 액체질소 탱크에서 보존하였다.

결 과

여러 가지 희석액에 혼합한 정액을 액체질소에서 10일 동결보존하여 해동직후의 SAI, 정자의 생존율을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 해동직후의 SAI는 300 mM glucose에서 1.7±0.1로 가장 높았고, MFRS에서는 1.2±0.2로 가장 낮았다. 정자의 생존율은 300 mM glucose에서 65±5%로 가장 높았고, 다음으로 MFRS와 NaCl의 순이었으나, 서로간에 유의한 차이는 없었다. 동결보존한 정자의 각 생존율은 원정액의 생존율 보다는 유의하게 낮았다 (P<0.05).

300 mM glucose를 희석액으로 사용하여 10일 동안 동결 보존하였을 때 동해방지제인 DMSO와 glycerol의

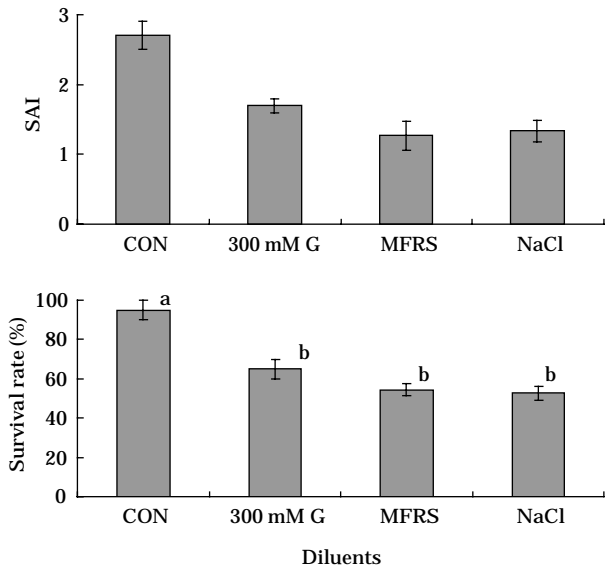


Fig. 1. Effects of various diluents on the sperm activity index (SAI) and survival rate in cryopreservation of red seabream, *Pagrus major* sperm. Different superscripts on the bars within the figure are significantly different ($P < 0.05$). CON: control, G: glucose, MFRS: marine fish Ringer's solution.

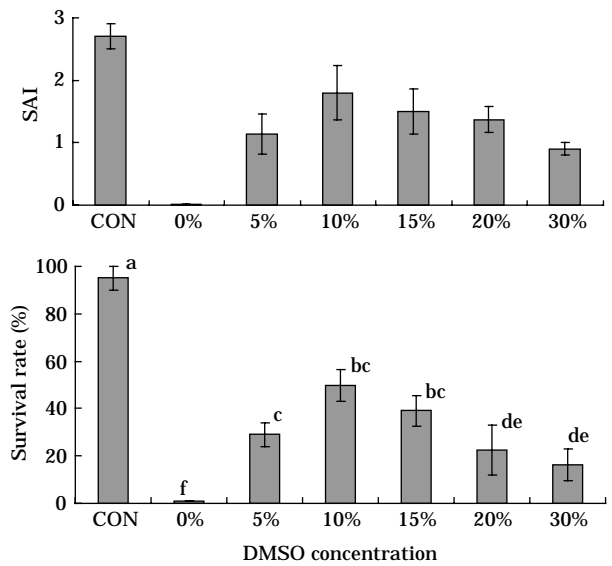


Fig. 3. Effects of DMSO concentrations on the sperm activity index (SAI), and survival rate in cryopreservation of red seabream, *Pagrus major* sperm. Different superscripts on the bars within the figure are significantly different ($P < 0.05$). CON: control, DMSO: Dimethyl sulfoxide.

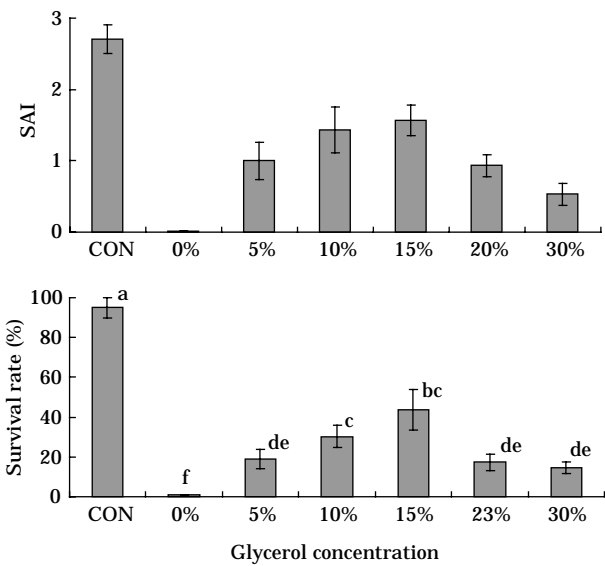


Fig. 2. Effects of glycerol concentrations on the sperm activity index (SAI), and survival rate in cryopreservation of red seabream, *Pagrus major* sperm. Different superscripts on the bars within the figure are significantly different ($P < 0.05$). CON: control.

농도별 냉동보존 효과는 Figs. 2, 3과 같다. DMSO 농도를 달리하였을 때 해동정자의 SAI와 생존율은 10%

DMSO에서 1.8 ± 0.4 , $49 \pm 6.6\%$ 로 가장 높았고, 농도가 증가함에 따라 SAI와 생존율이 감소하는 경향을 보였다. 동해방지제로 glycerol을 사용하였을 때, 15% glycerol에서 SAI가 1.5 ± 0.2 로 가장 높았고, 농도가 증가함에 따라 SAI가 감소하였다. 생존율에 있어서도 15% glycerol에서 $44 \pm 4\%$ 로 가장 높았고 농도가 증가함에 따라 생존율이 감소하는 경향을 보였다. 정자의 생존율과 수정률을 근거로 동해방지제인 glycerol과 DMSO를 서로 비교하면, 참돔 정자의 냉동보존을 위한 동해방지제로는 DMSO가 glycerol 보다 좋은 결과를 보였다.

고 찰

어류의 정자보존에 관한 연구는 1950년대부터 이루어져 왔는데 비하여, 정자 보존효과를 판정하는데 중요한 요인 중의 하나인 정자 운동기구에 관한 연구는 최근 십수년에 불과하여 정자보존의 결과와 정자의 운동성에 대한 정밀도 높은 평가에 활용할 수 있는 자료는 제한적이다. 체외수정을 하는 어류의 정자는 체외로 방출되기 전까지는 정소내에서 운동이 억제되어 운동 에너지원인 ATP를 보존하며, 환경수에 방출되어질 때 정자의 운동이 개시된다 (Morisawa and Morisawa, 1990). 그리고 체내수정을 하는 어종인 guppy와 topminnow에서는

암컷 생식기로 전달된 후 정구 (sperm ball)의 형태로 존재하다가 암컷의 배란시에 운동이 개시되는 것으로 알려져 있다 (Morisawa, 1985). 이와 같이 체외수정을 하는 경골어류의 정자는 환경수에 노출되었을 때 운동이 개시되는데, 잉어과와 같은 담수산 어류의 정자는 저장 삼투도에서, 해산어류의 정자는 고장 삼투도에서 각각 운동이 개시되는 것으로 보고되고 있다 (Kho *et al.*, 2005). 1% NaCl, 0.3 M glucose, 희석 인공해수, 해산경골어류 식염수등이 어류 정자의 냉장 및 동결보존용 희석액으로 사용되어 왔다 (Blaxter, 1953; Chang *et al.*, 1997; Fabbrocini *et al.*, 2000; Yao *et al.*, 2000). 적절한 희석액은 희석 후에도 정자가 운동하지 않도록 하여 운동에 필요한 에너지가 소비되는 것을 효과적으로 억제시키는 것 (Ohta and Izawa, 1996)으로, 삼투질 농도나 이온조성이 정장과 유사한 조성을 가졌을 경우에 보존효과가 높게 나타난다. 본 연구에서는 희석액으로 사용하였던 300 mM glucose, MFRS, 150 mM NaCl에서 모두 좋은 효과를 나타내었다. 이는 이들 희석액의 삼투질 농도가 정장과 비슷하여 효율적으로 운동성을 억제하였기 때문인 것으로 생각된다.

일반적으로 정자세포의 동결보존은 동결 및 해동중에 일어나는 열충격, 얼음형성 그리고 동결중에 일어나는 과도한 탈수등에 의해 원형질막, 핵, 미토콘드리아 및 편모가 상당한 변형을 일으킨다 (Watson, 1995; Lahnsteiner *et al.*, 1996). 세포막의 보존은 정자의 생존율에 있어서 기본적으로 중요한 요소이며, 세포막 동결 및 해동에 의해서 민감하게 손상을 받게 된다 (Morris, 1981). 세포막의 구조적인 손상에 의해 막 투과성 등에도 변화를 일으키게 되어 세포의 삼투조절능력도 저하되어 정자의 두부와 꼬리부의 팽창, 미토콘드리아를 비롯한 세포내 소기관의 손실이 유도된다. 냉동보존에서 세포내 삼투질 농도 상승과 세포내외의 빙결정 (ice crystal) 형성 등을 완화·조절하기 위하여 동해방지제의 사용은 필수적이다 (Kang *et al.*, 2004). 동해방지제는 중성물질이어야 하며, 친수성이 강해야 하고, 세포막에 대한 투과성이 높아야 하며, 세포에 대한 독성이 적어야 한다. 현재 동해방지제로서 DMSO, glycerol, ethylene glycol, proline, sucrose, sorbital, dextran 그리고 polyvinylpyrrolidone 등 여러 가지 물질들이 사용되어지고 있다 (Kuwano and Saga, 2000). 그러나 각 어종의 정자는 동해방지제의 종류에 따라 종특이적인 경향을 나타내기 때문에 모든 어류에서 공통적으로 사용될 수 있는 동해방지제는 아직 밝혀진 바 없으며, 동해방지제가 세포동결시 세포를 보호하는 자세한 기구에 관해서는 아직 잘 알려지지 않고 있다. 채널메기 (Guest *et al.*, 1976), 능성어 (Chao *et al.*,

1992)에서는 10% DMSO를 동해방지제로 사용하였을 때 보존효과가 가장 높았다. Black grouper (Gwo, 1993), 전어 (Kang *et al.*, 2004)에서는 glycerol에서 보존효과가 높은 것으로 나타났다. 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). 본 연구에서는 참돔정자의 동결보존시 10% DMSO에서 보존효과가 가장 높은 것으로 나타났다. 동결시에 적절한 희석액과 동해방지제가 각 종마다 다르다는 것은 정자막, 정자구조, 정장의 구성이 종마다 특이적이라는 것을 의미한다. 현재 세포동결에 관한 약리학적인 정보이외에 열역학적 특성에 관한 정보는 거의 없는 실정이다.

앞으로 세포동결과정에서의 열역학적 특성의 측정을 통해 동결과정에서의 동해방지제의 작용기구에 관한 연구는 보다 안전한 동결보존 기술의 발전에 기여할 것이다.

적 요

참돔 정자의 동결보존에 미치는 희석제와 동해방지제의 효과를 운동성과 생존율로 비교하였다. 300 mM glucose를 희석제로 사용하였을 때 보존 효과가 좋았다. 동해방지제로는 10% dimethyl sulfoxide (DMSO)를 동결보존에 사용하였을 때 해동 후의 운동성과 생존율이 가장 높았다.

사 사

본 연구를 수행하는 데 있어서 실험어 채집과 실험 및 자료정리에 도움을 주신 전남대학교 자원생물생리학 연구실원들께 감사드립니다.

인 용 문 헌

- Blaxter, J.H.S. 1953. Sperm storage and cross fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature*, 172.
- Blom, E. 1950. A one-minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. *Fertil. Steril.*, 1 : 176~177.
- Chang, Y.J. 1997. Present and future studies on the cryop-

- reservation of fish gametes. *Suisanzoshoku*, 45 : 557~564.
- 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
- Fabbrocini, A.S., S. Lubrano Lavadera, S. Rispoli and G. Sansone. 2000. Cryopreservation of seabream (*Sparus aurata*) spermatozoa. *Cryobiology*, 40 : 46~53.
- Fribourgh, J.H. 1966. The application of a differential staining method to low-temperature studies on goldfish spermatozoa. *Prog. Fish-Cult.*, 28 : 227~231.
- Guest, W.C., J.W. Avault and J.D. Roussel. 1976. Preservation of channel catfish sperm. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 3 : 469~474.
- Gwo, J.C. 1993. Cryopreservation of black grouper (*Epinephelus malabaricus*) spermatozoa. *Therigenology*, 39 : 1331~1342.
- Gwo, J.C. 1994. Cryopreservation of yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*) spermatozoa. *Therigenology*, 41 : 989~1004.
- Gwo, J.C., K. Strawn, M.T. Longnecker and R. Connie. 1991. Cryopreservation of atlantic croaker spermatozoa. *Aquaculture*, 94 : 355~375.
- Kang K.H., K.H. Kho, Z.T. Chen, J.M. Kim, Y.H. Kim and Z.F. Zhang. 2004. Cryopreservation of filefish (*Thamnaconus septentrionalis* Gunther, 1877) sperm. *Aquaculture research*, 35(15) : 1429~1433.
- Kho, K.H., M. Morisawa and K.S. Choi. 2005. Cell signaling mechanisms of sperm motility in aquatic species. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 15(3) : 665~671.
- Kuwano, K. and N. Saga, 2000. Cryopreservation of marine algae: Cryopreservation of marine algae: Applications in biotechnology. In: Figerman, M. and R. Nagabhusanam. ed. Recent advances in marine biotechnology. Volume 4 : Aquaculture. Part A, Seaweeds and invertebrates. Science Publishers Inc, New Hampshire pp. 23~40.
- Lahnsteiner, F., B. Berger, T. Wiesmann and R. Patzner. 1996. Changes in morphology, physiology, metabolism, and fertilization capacity of rainbow trout semen following cryopreservation. *Prog. Fish. Cult.*, 58 : 149~159.
- Lim, H.K., Y.J. Chang and P.K. Jo. 2003. Effects of cryopreservations on survival and hatching of black seabream, *Acanthopagrus schlegeli* Embryos. *J. of Aquaculture*, 16(4) : 262~266.
- Morisawa, M. 1985. Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleosts. *Zool. Sci.*, 2 : 605~615.
- Morisawa, M. and S. Morisawa. 1990. In "Control of sperm motility: Biological and clinical aspects" Ed by C. Gagnon, CRC press, Boca Raron, pp. 137~152.
- Morris, G.J. 1981. Liposomes as a model system for investigating freezing injury. (in) Morris G.J. and A. Clarke, ed. Effects of low temperatures on biological membranes. Academic, New York, pp. 214~262.
- Ohta, H. and T. Izawa. 1996. Diluent for cool storage of Japanese eel (*Anguilla japonicus*) spermatozoa. *Aquaculture*, 142 : 107~118.
- Strussmann, C.A., P. Renard, H. Ling and F. Takashima. 1994. Motility of pejerrey, *Odontesthes bonariensis* spermatozoa. *Fish. Sci.*, 60 : 9~13.
- Watson, P.E. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and assessment of their post thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7 : 871~891
- Yao, Z., L.W. Crim, G.F. Richardson and C.J. Emerson. 2000. Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm after cryopreservation. *Aquaculture*, 181 : 361~375.
- Zar, J.H., 1984. Biostatistical Analysis. Prentice-Hall Inc. Englewood Cliffs, N.J., pp. 620.

Received : April 2, 2007

Accepted : May 14, 2007