

피조개, *Scapharca broughtonii* (Schrenck) 정자의 냉장보존에 미치는 희석액의 효과

라성주, 이성훈, 고강희

전남대학교 수산해양대학 해양기술학부

Effect of Diluents on the Cold Storage of Sperm in *Scapharca broughtonii* (Schrenck)

Sung Ju Rha, Sung Hun Lee and Kang Hee Kho

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

ABSTRACT

The effects of diluents composition on cold storage for *Scapharca broughtonii* (Schrenck) sperm were examined in the percentage of sperm activity and survival rate. Various diluents of glucose solutions (10 mM Hepes-pH 7.8), 600 mM NaCl, stein solution, Ringer's solution (230 mM NaCl, 8 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 3.7 mM MgCl₂, 0.2 mM NaHCO₃, 10 mM Hepes-pH 7.8), 20%, 25% ASW (NaCl 2.7 g + KCl 0.07 g + CaCl₂ 0.12 g + MgCl₂ 0.46 g + NaHCO₃ 0.05 g + distilled water 100 ml) were used to store th sperm at 4°C. The storage effect was evaluated using sperm activity and survival rate. Ringer's solution was found to be better diluents which maintained high activity and survival rate of sperm for a storage period of 7 days. Optimal pH of diluents to store the sperm at 4°C is 7.5.

Key words: *Scapharca broughtonii*, diluent, cold storage, sperm

서 론

우량 형질의 어미로부터 난과 정자를 확보하는 것은 개체보존에 있어 가장 선결되어야 할 조건으로 우량 형질의 개체를 보존하는 방법을 이용하였으나 고비용, 사육관리의 어려움 및 오염의 위험이 있어 현재는 유전자원과 생식세포 보존이 개발되어 개체 수준의 보존에서 벗어나고 있다 (Kho *et al.*, 2003). 이미 육상생물에 있어서는 정자 보존에 대해 많은 연구가 진행되어 인간에게도 응용되어 왔으며 (Friedler *et al.*, 2002; Hauser *et al.*, 2005; Ansah *et al.*, 1980; Donoghue and Wishart, 2000), 최근에는 담수어류 및 해산어류, 양식산업종과 멸종위기 종에 대한 정자보존의 연구가 활발히 진행되고 있다 (Chao *et al.*, 1975; Hara *et al.*, 1982; McNiven *et al.*, 1993; DeGraaf and Berlinsky,

2004; Billard *et al.*, 2004; Lim *et al.*, 2005).

정자의 냉장보존기술은 정자의 수정 능력을 유지한 채 기간 보존하는 기술로 일정한 시기에 집단으로 성성숙하는 어패류의 인공수정과 육종분야에 효과적으로 이용가능하며, 정자의 수송수단 중 하나로서 매우 중요하다 (Kho, 2004). 정자의 장기간 보존은 양식대상의 종묘생산에서 어미의 방란·방정시기와 성비의 차이에 따른 문제와 웅성선속 종 또는 어획된 자연산 어미를 이용할 경우 정액의 확보나 수정과정에 효과적으로 이용할 수 있는 장점이 있으며 (Lim *et al.*, 1997) 패류와 같이 일정한 시기에 집단으로 성성숙하여 방란·방정하는 종에 있어서는 매우 유용하게 이용될 수 있다.

해양무척추동물을 대상으로 정자 동결보존에 관한 연구는 진주조개, *Pinctada fucata martensii* (Takayuki and Kawamoto *et al.*, 2007), 참굴, *Crassostrea gigas* (Usuki *et al.* 1997; S.L. Adams *et al.*, 2004), *Sicyonia ingentis* (T. Anchooguy *et al.*, 1988), 지중해담치, *Mytilus galloprovincialis* (Matteo *et al.*, 2009) 등 근래 많은 연구가 진행되었으나 냉장보존기술에 대한 연구는 매우 미진하다.

우리나라의 피조개, *Scapharca broughtonii* (Schrenck)는 우수한 품질로 주요 수출 품목이었으나, 자연채묘의 부진과

Received March 23, 2010; Revised April 26, 2010; Accepted June 7, 2010

Corresponding author: Kho, Kang Hee
Tel: +82 (61) 659-3192 e-mail: kkh@chonnam.ac.kr
1225-3480/24345

*Present address: Fisheries Science Institute, Chonnam National University, Yeosu 550-749, Korea

환경변화로 인해 1980년대 말부터 생산량이 급감하고 있다 (Kim *et al.*, 2006; Chun *et al.*, 1991; Park *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2007). 따라서 본 연구에서는 산업적으로 유용한 피조개, *Scapharca broughtonii* (Schrenck) 정자의 냉장보존 가능성을 검토하여 해양무척추동물의 보존과 종묘생산 과정에 이용 가능한 기초자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

실험에 사용한 피조개, *Scapharca broughtonii* (Schrenck) 는 진해만에서 채집하여 실험실로 운반하여 48시간 여과해수에 수용하였으며, 각장 약 10 cm 내외의 성숙한 개체를 이용하였다. 정액의 채취를 위해 패각을 분리한 후 생식소를 절개하였으며, 채취한 정액은 시험관에 넣어 밀봉한 후 얼음을 채운 용기에 보관하였다. 채취한 정액 중 인공해수 (artificial sea water, ASW: 423.00 mM NaCl, 9.00 mM KCl, 9.27 mM CaCl₂, 22.94 mM MgCl₂, 2.11 mM NaHCO₃, 10 mM Hepes-pH 7.8) 에서 희석직후의 운동성이 약 100% 인 정액만을 실험에 사용하였다.

피조개 정자 냉장보존 효과를 조사하기 위해 사용한 희석액은 600mM NaCl, Stein solution, 300 mM, 600 mM glucose (10 mM Hepes-pH 7.8), Ringer solution (230 mM NaCl, 8 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 3.7 mM MgCl₂, 0.2 mM NaHCO₃, 10 mM Hepes-pH 7.8), 20%, 25% ASW (NaCl 2.7 g + KCl 0.07 g + CaCl₂ 0.12 g + MgCl₂ 0.46 g + NaHCO₃ 0.05 g + distilled water 100 ml) 를 각각 사용하여 4°C에서 보관하였으며, 생존율과 운동성을 조사하였다. 또한, 정자의 냉장보존 효과가 가장 좋은 희석액에 대하여 pH 5, 7.5, 9의 농도로 냉장 보존하여 적정 pH 농도를 조사하였다.

피조개 정자의 운동성 및 생존을 측정하기 위하여 슬라이드 글라스에 1% 소혈청액을 이용하여 코팅한 후 각 실험별 정액의 처리조건에 따른 운동성 및 생존율을 조사하였다. 각각의 희석액에 보존한 희석정액을 인공해수와 1: 5의 비율로 섞은 다음 광학현미경으로 운동성을 측정하였으며, 5회 측정하여 평균을 구하였다. 정자의 생존여부는 정자를 5% eosin-10% nigrosin (Blom, 1950; Fribourgh, 1966) 에 염색하여 판별 하였으며, 광학현미경 (× 1,000) 상에서 5회 측정하여 전체 정자수에 대한 살아있는 정자수의 비율로 생존율을 구하였다. 실험결과는 일원분산분석 (One-way ANOVA) 으로 검정하였다.

결 과

채취 직후의 피조개 정액을 희석액 별로 혼합하여 4°C로 유

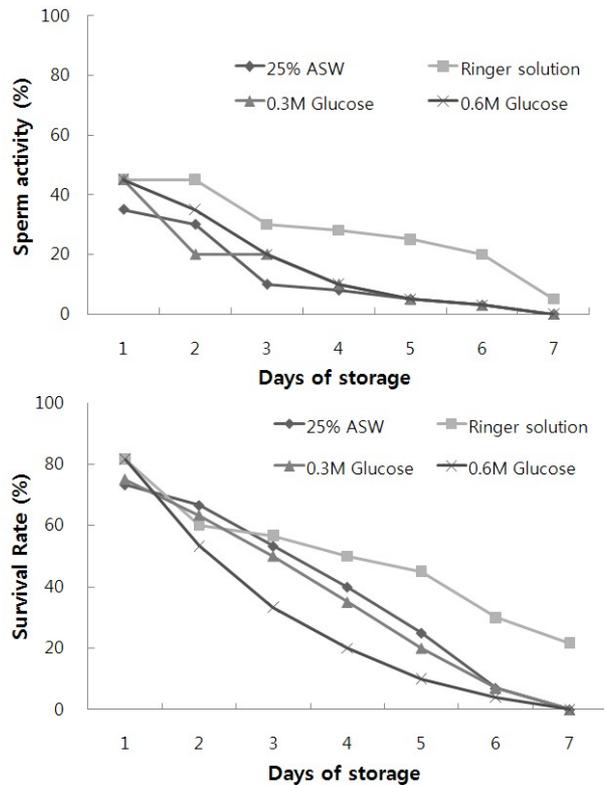


Fig. 1. Variation of sperm activity and survival rate in ark shell, *Scapharca broughtonii* sperm stored at 4°C with four diluents (P < 0.05).

지한 다음, 보존기간에 따른 정자의 운동성과 정자의 생존율을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 희석액 별 정자의 냉장보존 24시간 이후 정자운동성은 Ringer,s solution에서 45%의 운동성으로 가장 높았으며, 각 희석액 별 피조개 정자의 7일간 냉장보존 결과 시간이 경과함에 따라 급속하게 정자 운동성이 떨어지는 실험군과는 달리 Ringer,s solution에서는 완만히 감소되어 보존효과가 가장 좋았고 (P < 0.05), 실험종료인 7일에는 전 실험구간에서 낮은 운동성을 나타내었다.

또한, 정자의 생존율에서는 실험시작 후 24시간이 경과할 때까지 각 실험구별로 유의한 차이를 보이지 않았으나 (P > 0.05) 실험 종료시에는 Ringer's solution에서 23%의 생존율을 보여 다른 실험구에 비하여 높은 생존율을 나타내었다. 반면, 600 mM NaCl 실험구와 Stein solution 실험구는 실험시작 24시간 경과 후 정자의 운동성이 20%로 가장 저조하였으며 (Fig. 2), 600 mM NaCl, 20% ASW, Stein,s solution을 희석액에서 7일간 냉장 보존한 실험결과 냉장보존 효과의 유의한 차이는 보이지 않았고, 희석액 별 실험구 중 낮은 결과를 나타내었다 (Fig. 2; P > 0.05).

피조개 정자의 냉장보존 효과가 가장 높았던 Ringer's solution을 희석액으로 각각 pH 농도별로 실험한 결과는

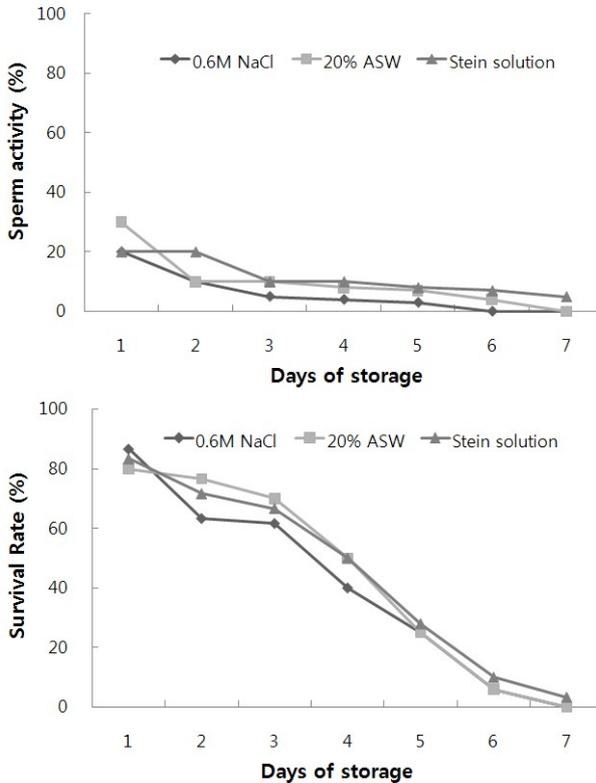


Fig. 2. Variation of sperm activity and survival rate in ark shell, *Scapharca broughtonii* sperm stored at 4°C with tree diluents ($P > 0.05$).

Fig. 3과 같다. pH별 실험에서 pH 7.5 실험구가 가장 높은 운동성과 생존율을 나타내 pH 5와 pH 9 실험구와 유의한 차이를 나타내었다 ($P < 0.05$). pH 7.5를 제외한 나머지 실험구에서는 48시간 경과 후부터 급격히 낮은 운동성을 보였으며, pH 7.5 실험구에서는 96시간 이후 점차 운동성이 낮아짐을 나타냈다. 반면, 생존율은 운동성과 달리 pH 5와 pH 9 실험구에서 약 72시간 후부터 급격히 감소하였다.

고찰

정자의 운동, 생존 및 보존에 관한 연구는 대부분 육상생물을 대상으로 연구되어 왔으나 근래 해양생물의 중요성과 지구 온난화로 인한 생물종의 보호를 위해 많은 연구가 진행되고 있으며 (Muchlisin *et al.*, 2004; Carlos *et al.*, 2008; Verapong *et al.*, 2009; He and Woods, 2003; Butts *et al.*, 2009), 이중 담수 및 해양양식생물과 관상어에 대한 연구는 더욱 활발히 진행되고 있다 (Yao Z. *et al.*, 2000; Zilli *et al.*, 2003; Ding *et al.*, 2009).

정자의 냉장보존에 영향을 미치는 주요 요인으로 희석액의 조성, 희석비율, 항생제 첨가, 산소공급 및 보존온도 등이 있으며, 이중 가장 중요한 요인으로 대상종에 적합한 희석액을 찾

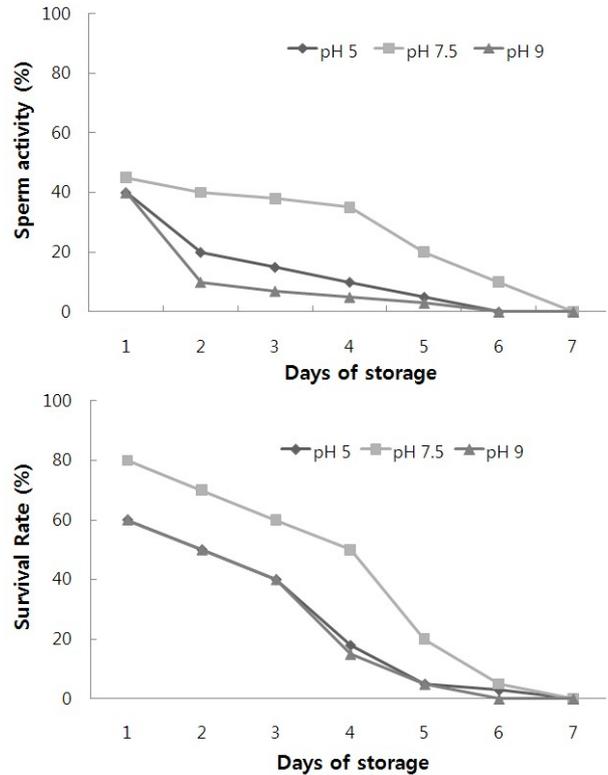


Fig. 3. Variation of sperm activity and survival rate in ark shell, *Scapharca broughtonii* sperm stored at 4°C with tree pH conditions ($P < 0.05$).

는 것이다 (Lim *et al.*, 2005). 희석액의 중요한 역할로 갖춰야 할 요인은 정자가 운동을 억제하여 필요한 에너지 소비를 줄이는데 있다 (Ohta and Izawa, 1996). 피조개 정자는 Ringer's solution에서 높은 생존율과 운동성을 보였는데 동일선 상에서 비교하기는 어려우나 말뚝성게, *Hemicentrotus pulcherrimus*에서는 ASW 와 1.2 M glucose가 적합한 희석액으로 보고하였고 (Kho *et al.*, 2003), 가자미류를 대상으로 한 연구에서는 Stein's solution 이 가장 좋은 효과를 나타내었고 (Chang *et al.*, 2002), 자주복, *Takifugu rubripes* 정자의 냉장보존에 MFR과 1% NaCl 이 적정 희석액이란 보고 (Chagn *et al.*, 1997) 등과 비교할 때 각 종마다 적합한 희석액의 종류와 농도가 다르며, 냉장보관 기간 역시 넉치, *Paralichthys olivaceus* 와 말뚝성게는 30일 동안 보관한 (Lim *et al.*, 2005; Kho *et al.*, 2003) 반면, 가자미류 (Chang *et al.* 2002) 는 본 연구의 결과와 비슷하였다. 한편, Milkfish, *Chanos chanos* 에서는 동종의 혈청을 이용하여 냉장보존하였을 경우 효과가 높다고 보고하여 (Hara *et al.*, 1982) 냉장보존에 적합한 희석액은 종에 따라 차이가 있으므로 정자의 활성을 효율적으로 억제하며 보존할 수 있는 적정 희석액의 탐색이 필요하다.

정자의 운동성과 관련하여 Alavi 와 Cosson (2005) 은 적합한 희석액의 조건으로 pH와 온도가 매우 밀접한 관계가 있다고 보고하였다. 피조개 정자의 냉장 보존시 희석액의 적정 pH별 정자의 운동성과 생존율을 실험한 결과 pH 7.5에서 다른 실험구보다 비교적 높은 운동성과 생존율을 보였는데 이것은 Zebrafish의 정자가 pH 7.5-8.0의 약 알카리에서 운동성이 높다는 결과 (Jing *et al.*, 2009) 와 비슷한 경향을 나타내었으나 피조개의 경우 운동성이 5-6일 정도까지 유지되었으나 Zebrafish는 약 20시간 내외였다.

본 연구에서는 피조개 정자의 냉장보존을 위해 희석액에 따른 운동성과 생존율을 조사하여 보다 기초를 마련하였으나 정자의 냉장보존에 있어 적정 희석액은 종에 따라 차이를 나타내고, 삼투질 농도, pH, 이온농도 및 정자의 활력억제 등 다양한 조건이 함께 수반되어야하며, 이와 더불어 정자운동성 메커니즘, 정자의 구조, 이온의 역할 및 정액채취 조건과 환경조건 등 다양한 부분에서 세부적인 연구가 이루어져야 할 것이다.

요 약

피조개, *Scapharca broughtonii* (Schrenck) 정자의 냉장 보존을 위해 희석액에 따른 보존효과를 비교하였다. 피조개 정액을 채취하여 600 mM NaCl, Stein solution, 300 mM, 600 mM glucose (10 mM Hepes-pH 7.8), Ringer's solution (230 mM NaCl, 8 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 3.7 mM MgCl₂, 0.2 mM NaHCO₃, 10 mM Hepes-pH 7.8), 20%, 25% ASW (NaCl 2.7 g + KCl 0.07 g + CaCl₂ 0.12 g + MgCl₂ 0.46 g + NaHCO₃ 0.05 g + distilled water 100 ml) 를 각각 사용하여 4℃에서 보관하였다. 피조개 정자의 보존효과는 정자의 운동성과 생존율로 평가였다. 피조개 정자는 Ringer's solution에서 7일간 냉장 보존하였을 때 운동성과 생존율을 가장 높았으며, 희석액의 적정 pH는 7.5 이었다.

사 사

이 논문은 2008년도 정부 (교과부) 의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (2008-1566).

REFERENCES

Alavi S.M.H. and J. Cosson (2005) Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review, *Cell Biol. Int.*, **29**: 101-110.
 Ansah G.A., D.C. Crober, R.B. Buckland, A.E. Sefton and B.W. Kennedy (1980) Artificial insemination of individually caged broiler breeders. 1. Reproductive performance of males relation to age and strain of females. *Poultry Sci.*, **59**: 428-437.

Billard, R., J. Cosson, S.B. Noveiri and M. Pourkazemi (2004) Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. *Aquaculture*, **236**: 1-9.
 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.
 Butts A.E., E.A. Trippel and M.K. Litvak (2009) The effect of sperm to egg ratio and gamete contact time on fertilization success in Atlantic cod *Gadus morhua* L. *Aquaculture*, **286**: 89-94.
 Carlos Frederico Ceccon Lanes, Marcelo Okamoto, Paulo Varoni Cavalcanti, Tiago Collares, Vinicius Farias Campos, Joao Carlos Deschamps, Ricardo Berteaux Robaldo, Luis Fernando Marins and Luis Andre Sampaio (2008) Cryopreservation of Brazilian flounder (*Paralichthys orbignyanus*) sperm. *Aquaculture*, **275**(1-4): 361-365.
 Chang Y.J., Y.J. Chang, H.K. Lim, J.K. Lee and Y.J. Park (2002) Coldstorage 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.
 Chun Y.Y., Na G.H. and Choi E.J. (1991) Mass mortality of arkshell, *Anadara broughtonii* SCHRENCK seedling with marine ecological characteristics. *Bull. Kor. Fish. Soc.*, **24**: 70-78.
 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.
 Ding Shuyan , Jiachun Ge, Chen Hao, Mingsheng Zhang, Weihui Yan, Zhiqiang Xu, Jianlin Pan, Songlin Chen, Yongsheng Tian and Yahong Huang (2009) Long-term cryopreservation of sperm from Mandarin fish *Siniperca chuatsi*. *Animal Reproduction Science*, **113**(1-4): 229-235.
 Donoghue A.M. and G.J. Wishart (2000) Storage of poultry semen. *Anim. Prprod. Sci.*, **62**: 213-232.
 Fribourgh, J.H. 1966. The application of a differential staining method to 10w-temperature studies on goldfish spermatozoa. *Prog. Fish-Cult.*, **28**: 227-231.
 Friedler S, Raziell A, Strassburger D, Schachter M, Soffer Y, Ron-EI R. (2002) Factors influencing the outcome of ICSI in patients with obstructive and non-obstructive azoospermia: a comparative study. *Hum Reprod*, **17**: 3114-3121.
 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.
 Hauser R., Yogev L., Amit A., Yavetz H., Botchan A., Azem F., Lessing J.B. and Ben-Yosef D. (2005) Severe hypospermatogenesis in cases of nonobstructive azoospermia: Should we use or

- frozen testicular spermatozoa. *J. andrology*, **26**: 772-8.
- He S. and L.C. Woods III (2003) Effects of glycine and alanine on short-term storage and cryopreservation of striped bass (*Morone saxatilis*) spermatozoa. *Cryobiology*, **46**: 17-25.
- Jinga Rongyan, Changjiang Huang, Chenglian Baia, Robert Tanguaya and Qiaoxiang Donga (2009) Optimization of activation, collection, dilution, and storage methods for zebrafish sperm. *Aquaculture*, **290**(1-2): 165-171.
- Kho K.H., Kang K.H. and Kim J.M. (2003) Effect of diluents on the cold storage of sperm in sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Dev. Reprod.*, **7**(1): 9-13.
- Kho K.H. (2004) Physiological approach to improve solutions for liquid storage of semen and artificial fertilization in the brown trout (*Salmo trutta*). *Korean J. Ichthyol.*, **16**(3): 215-222.
- Kim B.H., Min K.S., Lee S.J., Park K.Y., An C.M., and Min B.H. (2006) Effect of Temperature on Induced Sexual Maturation of the arkshell, *Scapharca broughtonii* (Schrenck) Broodstock. *The Korean Journal of Malacology*, **22**(2): 175-182.
- Kim J.B., Lee S.Y., Jung C.G., Jung C.S. and So S.G. (2007) The effects of the spat planting time and environmental factors in the arkshell, *Scapharca broughtonii* Schrenck culture. *J. Aquaculture in Korea*, **20**(1): 31-40.
- Lim, H. K., C. M. An, M. H. Son, M. W. Park and Y. J. Park (2005) Effect of diluents for cold storage of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm. *J. Kor. Fish. Soc.*, **38**: 232-238.
- 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.
- Muchlisin Z.A. , R. Hashim and A.S.C. Chong (2004) Preliminary study on the cryopreservation of tropical bagrid catfish (*Myxus nemurus*) spermatozoa; the effect of extender and cryoprotectant on the motility after short-term storage, *Theriogenology*, **62**: 25-34.
- Matteo O.Di , A.L. Langellotti, P. Masullo and G. Sansone (2009) Cryopreservation of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) spermatozoa. *Cryobiology*, **58**(2): 145-150.
- Ohta H. and T. Izawa (1996) Diluent for cool storage of Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. *Aquaculture*, **142**: 107-118.
- Park M.S., Lim H.J. and Kim P.J. (1998) Effect of environmental factors on the growth, glycogen and hemoglobin content of cultured Arkshell, *Scapharca broughtonii*. *J. Kor. Fish. Soc.*, **31**: 176-175.
- Park M.S., Kang C. and Lee P. (2001) Reproductive cycle and biochemical composition of the ark shell *Scapharca broughtonii* (Schrenck) in a southern coast bay of Korea. *J. Shellfish Research*, **20**: 51-59.
- S.L. Adams, J.F. Smith, R.D. Roberts, A.R. Janke, H.F. Kaspar, H.R. Tervit, P.A. Pugh, S.C. Webb and N.G. King (2004) Cryopreservation of sperm of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): development of a practical method for commercial spat production, *Aquaculture* **242**: 271-282.
- Takayuki Kawamoto, Teruyoshi Narita, Kiyoshi Isowa, Hideo Aoki, Masahiro Hayashi, Akira Komaru and Hiromi Ohta (2007) Effects of cryopreservation methods on post-thaw motility of spermatozoa from the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. *Cryobiology*, **54**(1): 19-26.
- Usuki H., M. Hamaguchi and H. Ishioka (1997) Long-term cryopreservation of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, sperm. *Bull. Nansei Natl. Fish. Res. Inst.* **30**: 115-123 (in Japanese with English abstracts).
- Verapong Vuthiphandchai, Itthinan Thadsri and Subuntith Nimrat (2009) Chilled storage of walking catfish (*Clarias macrocephalus*) semen. *Aquaculture*, **296**(1-2): 58-64.
- 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**(3-4): 361-375.
- Zilli L., R. Schiavone, V. Zonno, C. Storelli and S. Vilella (2003) Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation. *Cryobiology*, **47**(3): 227-235.