

동해방지제의 종류, 농도 및 침투시간이 굴 (*Crassostrea gigas*) 미수정란의 수정률과 부화율에 미치는 영향

김기태, 임한규¹

국립수산과학원 남동해수산연구소, ¹국립목포대학교 해양수산자원학과

Effects of concentration and permeation time of cryoprotectants on fertilization and hatching rate in the unfertilized egg of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*

Ki Tae Kim and Han Kyu Lim¹

Southeast Sea Fisheries Research Institute, NFRDI, 398-68, Sanyangilju-ro, Sangyang-Up Tongyeong, Gyeongnam 650-943, Korea

¹Mokpo National University, 1666 Youngsan-ro, Muan, Jeonnam, 534-729, Korea

ABSTRACT

The Pacific oyster *Crassostrea gigas* oocytes were exposed to 4 cryoprotectants, dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol (EG), methanol, or polyethylene glycol (PEG), each with 4 four concentrations (5, 10, 15, and 20%) and for 10, 20, 30 or 40 minutes for permeation. The oocytes were then fertilized, using normal sperm of the species. Fertilization and hatching rates were clearly influenced by cryoprotectant species and their concentration and permeation time. Overall, they decreased as concentrations and permeation time of cryoprotectants increased with optimum results at concentrations of 5-10% and a permeation time of 10 minutes. Larval abnormalities, a sign of the chemical damage, were a representative phenotype which was higher at a higher concentration and longer duration of the chemicals. In conclusion, best result was from 5% DMSO exposure for 10-20 minute permeation.

Key Words: Cryoprotectant, Fertilization rate, Permeation, *Crassostrea gigas*

서 론

동해방지제 (cryoprotectant) 는 세포가 동결되는 과정에서 생겨나는 세포내 전해질의 농축이나 삼투질농도의 증가와 세포 내외의 얼음 결정 형성 등 세포의 생존에 불리한 상태를 완화하거나 조절하는 역할을 하는 물질이다 (한국수정란이식학회, 1995). 동결보존 과정에서 세포의 생존에 중요한 역할을 하는 동해방지제는 동해방지제 외에도 동결보호제, 동결보호물질, 내동제 등 다양하게 불리고 있다. 동해방지제는 세포막의

통과여부에 따라 투과형과 비투과형으로 나뉘어지는데, 투과형으로는 methanol, ethanol, ethylene glycol (EG), acetamide, propylene glycol (PG), dimethyl sulfoxide (DMSO), glycerol 등이 있으며, 비투과형으로는 sucrose, trehalose, glucose, dextran 등이 있다. 동해방지제의 투과 속도는 분자량에 따라 달라지는데, 분자량이 적은 methanol (분자량 32.04) 이 가장 빨리 침투하고 분자량이 큰 sucrose (분자량 342.3) 는 침투하지 못한다. 또한 동해방지제의 농도가 증가하고 침투시간이 길어지면 배우자 및 발생 배는 동해방지제의 독성으로 인한 생존에 부정적인 영향을 받는다 (Leung and Jamieson 1991; 한국수정란이식학회, 1995; Lim 1998).

동결보존의 성공에 영향을 주는 핵심적인 요소는 적정 동해방지제의 선택과 처리방법이라 할 수 있다 (Lim *et al.*, 2003; Chung *et al.*, 2011). 그러므로 적정 동해방지제와 동해방지제의 농도 파악, 그리고 세포 안으로 동해방지제의 침투속도와 평형시간을 추정하기 위한 침투 및 용출 실험과 이에 따른 세

Received: September 11, 2015; Revised: September 22, 2015; Accepted: September 30, 2015
Corresponding author : Han Kyu Lim
Tel: +82 (61) 450-2395 e-mail: limhk@mokpo.ac.kr
1225-3480/24582

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License with permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproducibility in any medium, provided the original work is properly cited.

포의 생존 여부를 파악하는 것은 안정적인 동결보존 방법의 확립을 위해 중요하다.

지금까지 발생 배에 대한 동해방지제의 연구는 척추동물, 특히 포유류를 대상으로 기술개발이 촉진되어 왔으며, DMSO (Somgsasen *et al.*, 1995), EG (Cseh *et al.*, 1997), glycerol (Shelton, 1992; Sakul *et al.*, 1993), PG (Tervit and Gold, 1984; Schiewe *et al.*, 1991) 등에 관한 연구와 glycerol에 sucrose를 혼합한 동해방지제에 관한 보고가 있다 (Shelton, 1992). 해양생물에서도 어류의 정자를 비롯하여 발생 배의 동결보존에 관한 연구가 꾸준히 진행 중에 있으며, 동해방지제 효과에 관한 연구는 Suzuki *et al.* (1995) 이 무지개송어 *Oncorhynchus mykiss*, 잉어 *Cyprinus carpio*, 송사리 *Oryzias latipes*의 발생 배를 1-5 M DMSO에 침투한 결과, 고농도 일수록 독성이 증가함을 보고하였다. 패류에서는 굴 *Crassostrea gigas*, 바지락 *Ruditapes philippinarum* 및 king scallop *Pecten maximus*의 2-4세포기인 발생 배를 이용한 실험에서 methanol의 독성이 가장 낮았다고 보고되어 있다 (Renard and Cochard, 1989). Chao *et al.* (1994) 은 굴의 초기 배를 사용하여 동해방지제별 내성을 연구한 결과, DMSO가 가장 높은 생존율을 보였다고 하였다. Renard and Cochard (1989) 에 따르면 동해방지제는 종에 따라 독성에 대한 내성이 다르다고 하였으며, Renard (1991) 는 methanol이 EG, 1,2-propanediol, DMSO, glycerol 등 보다 굴의 발생 배에 손상을 덜 입히는 것으로 보고하였다. 국내에서는 Chung *et al.* (2011) 이 북방전복 *Haliotis discus hannai* 발생 배를 이용하여, EG의 효과를 입증하였고, Choi and Chang (1999) 및 Kim *et al.* (2013) 은 EG를 사용할 때 굴 담륜자의 생존율이 높았다고 보고하였다.

이와 같이 패류의 발생 배를 이용한 많은 연구들이 진행되어 왔지만, 수정되지 않은 알을 이용한 연구는 아직 미미한 실정이고, 동해방지제의 정확한 세포 보호 매커니즘은 아직 완전히 구명되지 않은 상태이다. 그러므로 본 연구에서는 패류양식 산업에서 중요한 위치를 점유하고 있는 굴의 미수정란을 동결보존하기 위하여, 적합한 동해방지제의 종류, 농도 및 침투 시간에 관한 실험을 실시하여 적정 동해방지제와 농도 및 침투시간을 파악하고자 하였다.

재료 및 방법

동해방지제 침투실험에서 사용한 채란-채정용 굴 어미는 2년생 남해안 양식산으로 50개체를 15°C의 ice box에 수용하여 실험실로 수송되었다. 이 후 폐각에 붙어 있는 오염물질 및 이물질을 제거하고, 수온 20°C의 순환사육시스템에서 하루 동안 적응시킨 다음 실험에 사용하였다. 먼저 폐각을 제거한 후 생

식소가 충분히 성숙한 굴 20개체만을 선별하여, 절개법으로 성숙한 알을 채취하였다. 어미 굴의 크기는 각고 98.5 ± 9.8 mm, 각장 58.1 ± 4.5 mm, 전중 56.5 ± 9.3 g, 육중 8.2 ± 2.5 g이었다. 이 후 미수정란을 망목 140 µm, 65 µm 및 20 µm의 필터가지를 사용하여 3회 걸러낸 후, 차아염소산나트륨 150 ppm으로 소독하였고, 자외선 유수 살균기를 거친 깨끗한 해수에 보관하면서 동해방지제 침투실험에 사용하였다. 침투실험에 사용되어진 동해방지제의 종류는 methanol, DMSO, EG 및 polyethylene glycol (PEG) 였으며, 인공해수 (NaCl 2.7 g, KCl 0.07 g, NaHCO₃ 0.05 g, CaCl₂ 0.12 g, MgCl₂ 0.46 g, Milli-Q water 100 mL) 와 혼합 하여 농도를 조절하였다. 실험 농도와 침투시간은 각각 5, 10, 15 및 20%와 10, 20, 30 및 40분으로 설정하였다. 동해방지제 침투가 끝난 미수정란은 침투시간과 같은 시간만큼 각각 여과해수에서 동해방지제를 용출 시켰으며 용출된 미수정란은 성숙한 수컷 굴의 정소에서 채취한 정액으로 수정시켰다. 그 후 망목 30 µm 체로 거른 다음, 100개/mL 밀도로 100 mL 비커에 넣어 실온 20°C에서 경과시간에 따른 수정률, 부화율 및 형태 이상률을 조사하였다. 수정률은 광학현미경 (× 100) 의 한 시야에서 전체 수정란에 대한 2-4세포로 발생한 발생 배의 수로 계산하였으며, 부화율도 전체 배중에서 담륜자로 발생한 개체의 비율로 산정하였다. 굴의 전형적인 담륜자 유생과 비교하여 세포가 파괴되어 형태가 변형된 유생은 모두 형태 이상으로 간주하여 계수하였다. 실험에 사용된 각 용액의 삼투농도는 삼투압측정기 (Vapro 5520, USA) 를 사용하여 측정하였으며 Table 1 과 같다.

굴 미수정란의 동해방지제 침투 전·후 형태학적 미세구조의 관찰을 위하여 다음과 같은 투과전자현미경 시료가 제작되었다. 굴 미수정란을 0.1 M phosphate buffer solution (PBS, pH 7.2) 으로 완충시킨 2.5% glutaraldehyde 용액에 4°C에서 2시간 동안 1차 고정하였다. 이어 PBS로 10분간 세척한 후, 1% osmium tetroxide (OSO₄)로 4°C에서 2시간동안 2차 고정하였다. 고정이 끝난 시료는 PBS로 세척하고 50-100% ethanol에서 10-20분씩 탈수하였다. 탈수된 시료는 propylene oxide와 epon의 혼합물에 넣어 1-3시간 동안 중합시킨 다음, epon 812에 포매하였다. 포매된 미수정란의 시료는 ultramicrotome (LKB, Nova, Sweden) 에 의해 두께 0.5-1.0 µm로 semithin section한 다음, toluidine blue로 염색하여 관찰할 부위를 결정하였다. 관찰부위가 정해진 포매 시료는 다시 60-90 nm 두께로 박절하여 200 mesh copper grid에 부착하였다. 이 후 절편을 uranylacetate와 lead citrate 용액으로 이중염색하여 투과전자현미경 (JEM 1200 E-XII, 60-80 Kv, JEOL, Japan) 으로 관찰하였다.

각 실험 결과로부터 얻어진 모든 측정값은 평균 ± 표준 오차

Table 1. Osmolalities of four cryoprotectant concentrations

Cryoprotectant	Concentration (%)	Osmolality (mOsm/kg)
Dimethyl sulfoxide	5	1690 ± 19.6
	10	2685 ± 30.9
	15	> 3000
	20	> 3000
Ethylene glycol	5	1265 ± 14.5
	10	2084 ± 17.4
	15	2739 ± 38.7
	20	> 3000
Polyethylene glycol	5	1565 ± 8.7
	10	2863 ± 16.2
	15	> 3000
	20	> 3000
Methanol	5	1573 ± 11.3
	10	2771 ± 36.5
	15	> 3000
	20	> 3000

(mean ± S.E.) 로 표시하였으며, 측정값 사이의 유의차 유무는 SAS 통계패키지 (ver. 9.1)

를 이용하여 95%의 신뢰수준에서 One-way ANOVA test 를 실시한 후 최소유의차 검정을 실시하였다.

결 과

동해방지제를 처리한 굴 미수정란에 대한 인공 수정 후 수정률, 부화율 및 형태 이상률을 동해방지제 종류와 농도 및 침투시간별로 관찰한 결과, 모든 동해방지제에서 농도 및 침투시간이 점차 증가함에 따라 수정률 및 부화율이 낮아진 반면, 형태 이상률은 높아졌다 (Fig. 1, 2, 3). 10% methanol에 10분 또는 20분간 침투하였을 때 수정률은 40% 이상으로 다른 농도에 비해 유의하게 높았으며 ($P < 0.05$), 10% methanol을 40분간 침투하였을 때 수정률이 $12.7 \pm 0.9\%$ 로 가장 낮았다. DMSO에 대한 수정률은 5% 농도에서 침투시간 10분과 20분일 때 각각 $61.9 \pm 1.4\%$ 와 $62.4 \pm 0.2\%$ 로 다른 농도에 비해 유의하게 높으나 ($P < 0.05$), DMSO 20%에서 40분간 침투한 경우, $3.5 \pm 1.2\%$ 로 급격히 낮아졌다. EG의 경우 침투시간 10분과 30분에서는 처리 농도에 따른 수정률의 유의한 차이를 보이지 않았으며 ($P > 0.05$), 침투시간 40분에서 농도가 증가할수록 수정률이 유의하게 낮아졌다 ($P < 0.05$). PEG의 경우 농도 및 침투시간이 점차 증가함에 따라 수정률이 낮아졌으며 5% PEG를 10분간 침투한 경우 수정률이 $39.3 \pm 0.7\%$ 였으나 20%에서 40분간 침투한 경우 $1.4 \pm 0.5\%$ 로 낮아졌다

(Fig. 1).

4가지 동해방지제에 침투한 후 조사한 부화율 또한 수정률과 비슷한 경향을 보였다. Methanol에 대한 굴 미수정란의 부화율은 5%와 10%에서 침투시간을 10분으로 설정한 경우 $29.7 \pm 0.1\%$ 와 $31.4 \pm 0.6\%$ 였으며, 20% methanol에 40분간 처리한 경우 $3.7 \pm 0.4\%$ 로 가장 낮아졌다. DMSO에 침투한 경우의 부화율 또한 수정률과 같이 5%에서 10분과 20분간 침투한 경우 각각 $44.8 \pm 1.6\%$ 및 $43.6 \pm 0.4\%$ 로 다른 농도보다 높았다 ($P < 0.05$). EG의 부화율은 5% 농도와 침투시간 10분일 때 $40.3 \pm 1.2\%$ 였으나 10%나 15%와 유의적인 차이를 보이지는 않았다 ($P > 0.05$). 침투시간 20분에서도 5-15% 사이의 농도에서는 부화율에 차이를 보이지 않았으나 ($P > 0.05$), 침투시간 40분과 20% 농도에서는 부화율이 $9.9 \pm 1.1\%$ 까지 낮아졌다. PEG에 침투한 경우, 부화율은 5% 농도와 침투시간 10분에서 $36.0 \pm 0.6\%$ 로 가장 높았으며, 20% 농도와 침투시간 40분에서 $1.6 \pm 0.2\%$ 로 가장 낮았다 (Fig. 2).

동해방지제 처리에 대한 굴 유생의 형태 이상률은 수정률이나 부화율과 반대 경향을 보였다. Methanol을 사용한 경우 5% 농도와 침투시간 10분에서 $3.7 \pm 0.5\%$ 로 가장 낮았으나 농도별로 유의적인 차이는 없었다. 침투시간 20분에서도 농도별로 차이를 보이지 않았으며 ($P > 0.05$), 15% 농도에서 40분간 침투한 경우 $16.4 \pm 1.4\%$ 로 높아졌다. DMSO 15%에서 40분간 침투한 경우, 형태 이상률이 $15.9 \pm 0.9\%$ 로 다른 농도에 비해 가장 높게 나타났다 ($P < 0.05$). EG에 침투한 경우 형태 이상률은 10-30분까지 농도별로 유의한 차이를 보이지

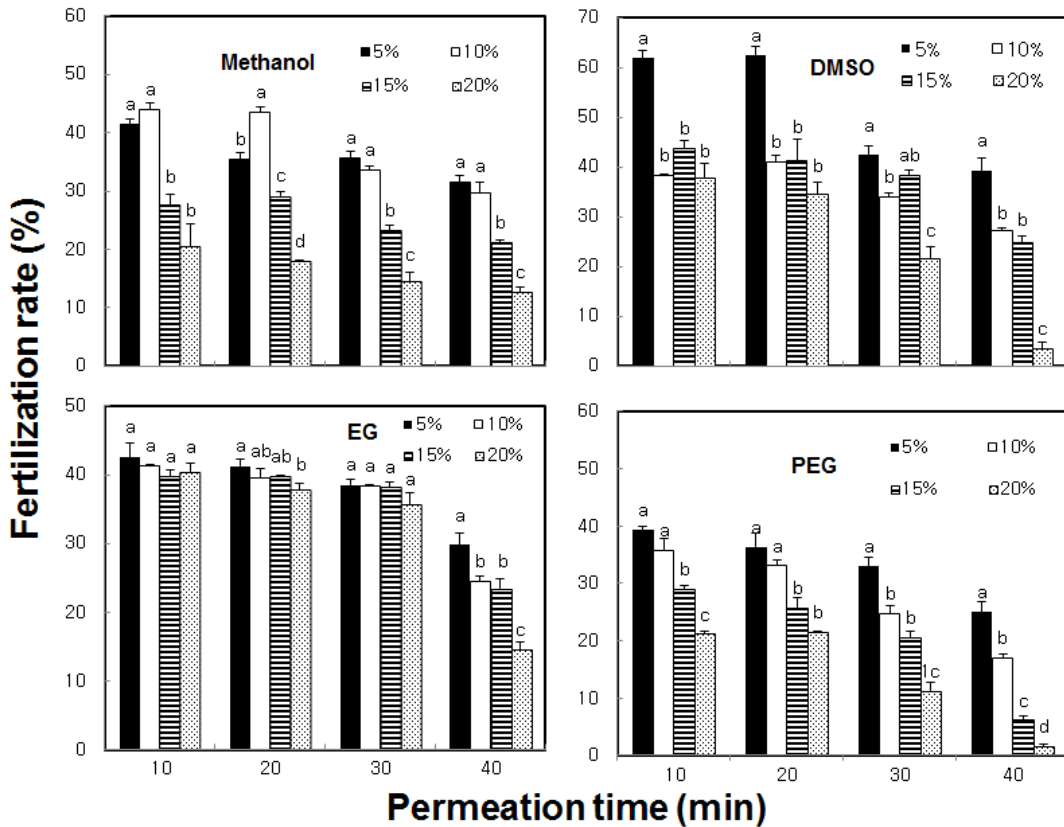


Fig. 1. Effects of cryoprotectant concentrations on the fertilization rates of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* eggs after different permeation time. Error bar represents mean \pm S.E. Superscript on the bars indicates statistical significance at $P < 0.05$.

않았다 ($P > 0.05$). PEG 5% 농도에서 침투시간 10분으로 설정한 경우 형태 이상률이 $6.8 \pm 0.6\%$ 였고, 5% 농도에서 40 분간 침지한 경우 $23.4 \pm 1.4\%$ 로 가장 높았다 (Fig. 3).

굴 미수정란을 동해방지제침투 전과 후에 투과전자현미경으로 미세 구조를 관찰한 결과, 세포질내의 밀집되어있던 난황과립 및 지방과립은 동해방지제 침투 후 세포막의 파열로 인해 흩어져있는 것을 관찰할 수 있었으며, 세포내 미토콘드리아 또한 파괴된 것을 알 수 있었다 (Fig. 4).

고 찰

세포의 동결보존시 동결에 의한 손상을 막기 위해 첨가하는 물질을 동해방지제라고 하며, 지금까지 DMSO, EG, glycerol 및 methanol 등이 수산 동물의 정자나 발생중인 배를 위한 동해방지제로 사용되어 왔다 (Lim 1998; Lim *et al.* 2003). 동해방지제는 공정점 (eutectic point) 이 낮기 때문에 동결시

얼음 결정의 양을 감소시켜 염의 농축을 막고 세포내에 빠르게 침투하여 탈수를 억제하고 원형질의 콜로이드 상태가 변화하는 것을 방지함으로써 동결에 의한 세포의 피해를 최소화시킨다 (한국수정란이식학회 1995; Leung and Jamieson 1991). 이들은 분자량 100 이하로 중성이고 친수성이 강하며 전해질이나 유기산의 용매가 될 수 있으며 세포막을 자유롭게 통과하여 염류 완충작용을 가져야 하고 세포에 대한 독성이 적어야 한다 (Leung and Jamieson 1991). 그러나 모든 동해방지제는 강약의 차이는 있지만 세포에 대한 독성을 가지고 있어 사용 농도나 처리 시간에 따라 세포의 생존에 큰 영향을 미치고 있다. 본 연구에서 굴 미수정란에 대한 DMSO, EG, methanol 및 PEG의 침투실험 결과, 동해방지제의 농도가 높아지거나 침투시간이 길어질수록 수정률 및 부화율은 낮아지는 반면, 형태 이상률은 높아지는 경향을 나타내었다. 이는 Renard and Cochard (1989) 가 언급한 것처럼 동해방지제 독성으로 인한 배의 손상은 동해방지제의 높은 삼투질농도와

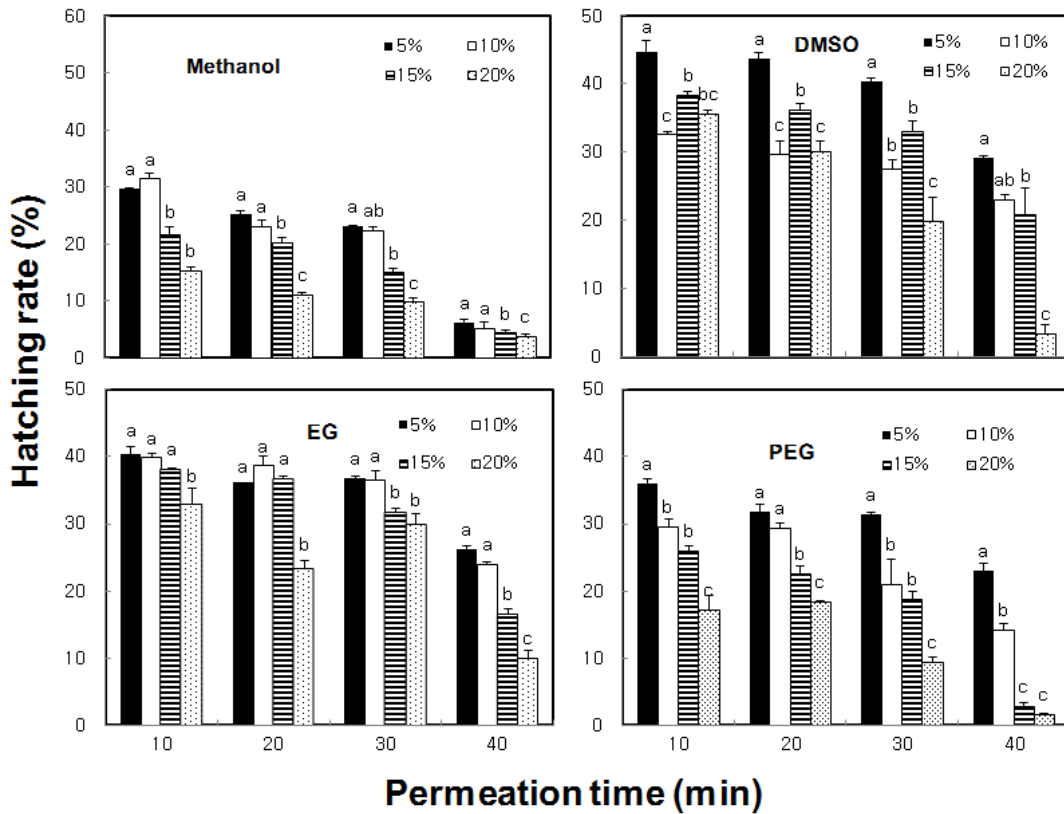


Fig. 2. Effects of cryoprotectant concentrations on the hatching rates of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* eggs after different permeation time. Error bar represents mean \pm S.E. Superscript on the bars indicates statistical significance at $P < 0.05$.

생화학적 영향에 의한 것으로 생각된다. 본 연구에서 굴 미수정란에 대한 methanol 및 PEG는 다른 동해방지제보다 수정률 및 부화율이 유의하게 낮았으며, DMSO는 5%의 저농도일 때는 수정률이 높게 나타났지만, 10%부터 EG와 비슷한 수준으로 낮아졌다. 이는 굴이 다른 조개류에 비해 DMSO에 대해 강한 내성을 나타낸다는 기존의 연구 결과 (Renard and Cochard, 1989) 와 다소 차이를 보이는 것이었다. 동해방지제의 효과는 종 특이성이 있고 같은 종이라도 발생단계에 따라 내성이 다른 경우가 많으므로 차이는 있을 수 있다.

종마다 적합한 동해방지제의 선택을 위해 근본적으로 고려해야 할 요인은 동해방지제가 세포 속으로 침투하여 세포막의 내외에서 평형을 이루어야하기 때문에 동해방지제의 분자량 및 침투 속도일 것이다. 본 실험에 사용된 동해방지제중 EG의 분자량이 42.67로 가장 작고, DMSO와 PEG는 각각 78.13, 76.10로 분자량이 크고 같은 농도에서 삼투질농도도 상대적으로 높았다. 해수는 1,000 mOsm/kg의 삼투질농도를 가지지만 연구에 사용된 동해방지제는 최저 1,265 mOsm/kg에서 최고

3,000 mOsm/kg 이상을 나타냈다. 따라서 세포가 동해방지제 노출시 세포막이 손상을 입는 것은 피할 수 없을 것으로 판단된다. 그러나 굴 미수정란을 동해방지제에 노출시킨 후 실제 세포내 동해방지제의 농도와 세포가 받는 손상과의 관계는 파악하지 못했다. 수산 동물을 대상으로 발생 배 내부에 침투한 동해방지제의 농도를 측정하는 방법으로는 동위원소로 표지하여 측정하는 방법 (Harvey *et al.*, 1983) 과 HPLC를 이용하는 방법 (Suzuki *et al.*, 1995) 이 있으나, 이번 연구에서는 발생중인 배의 내부에 침투한 동해방지제의 농도를 측정하지 못했다. 그러나 잉어, 무지개송어, 송사리 및 pejerrey의 발생중인 배를 이용한 Suzuki *et al.* (1995) 의 연구 결과를 바탕으로 검토해 볼 때 굴 미수정란의 사망은 세포 내부로 침투한 동해방지제의 증가 때문이며, 굴 배의 사망 패턴은 동해방지제의 종류별로 내성의 차이를 보였지만 농도나 침지 시간의 증가와 함께 높아지는 특성을 보였다. 동해방지제의 농도나 침지 시간 외에도 Chao *et al.* (1996) 은 finger fish의 배에 대한 연구에서 수정 후 시간이 더 지날수록 동해방지제인

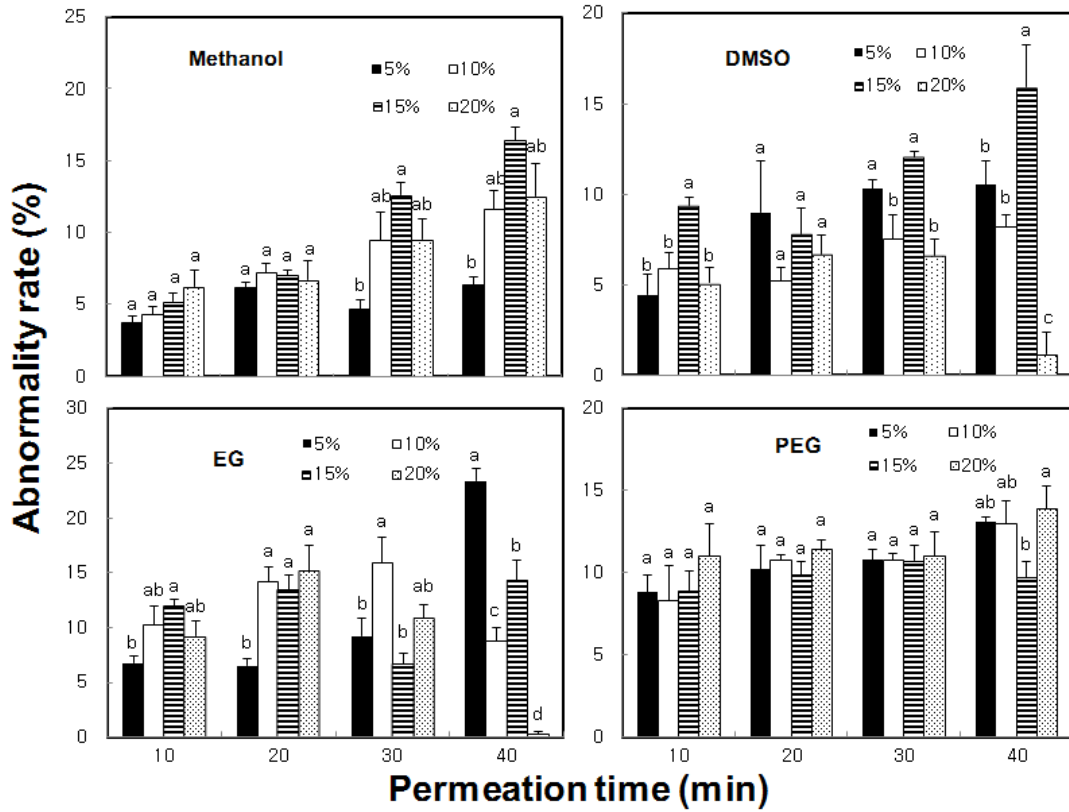


Fig. 3. Effects of cryoprotectant concentrations on the abnormality rates of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* eggs after different permeation time. Error bar represents mean \pm S.E. Superscript on the bars indicates statistical significance at $P < 0.05$.

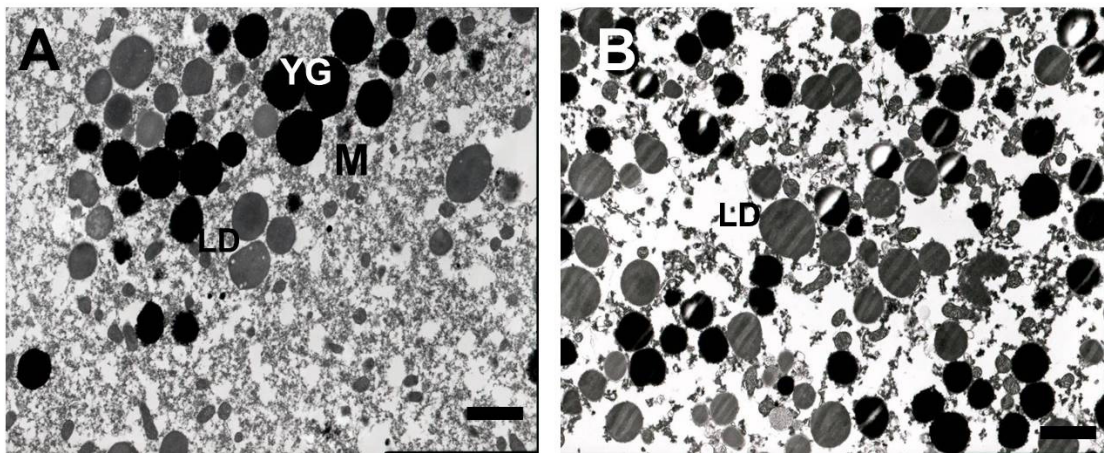


Fig. 4. Electron micrographs of cytoplasmic organelles of unfertilized eggs in Pacific oyster *Crassostrea gigas*. A, Pre-permeation; B, Post-permeation. Abbreviation: YG for yolk granule, LD for lipid droplet, M for mitochondrion. Scale bar stands for 1 μ m.

methanol에 대한 내성이 더 크다고 하여 배의 발달도 동해방지제의 효과에 영향을 미침을 보고하였다. Suzuki *et al.* (1995) 도 어류 배의 화학물질에 대한 내성은 발달 단계에 의존한다고 하였고, Haga (1982) 는 무지개송어의 발안난이 발안하기 이전보다 내성이 높다고 하였다. 본 연구에서는 미수정란만 실험에 사용하였기 때문에 배의 발달 단계에 따른 동해방지제의 효과를 명확히 밝힐 수 없었으나, 다른 실험들에서 더 발달한 굴 배일수록 동해방지제에 대한 내성이 증가하는 경향을 보였기 때문에 (Kim, 2015), 만일 본 실험에서도 수정 후 배체가 형성된 배를 대상으로 실험을 실시하였다면 더욱 좋은 결과가 얻어졌을 것이다.

요 약

굴 미수정란의 동결보존에 적합한 동해방지제의 종류, 농도 및 침투 시간을 구명하기 위하여 4가지 동해방지제 (DMSO, EG, methanol, PEG) 를 대상으로 수정률, 부화율 및 형태 이상률을 조사하였다. 동해방지제의 농도 및 침지시간은 각각 5, 10, 15, 20%와 10, 20, 30, 40분이었다. 침지 후 미수정란은 정상 정자와 수정되었고, 수정률, 부화율 및 형태 이상률은 동해방지제의 종류와 농도 및 침지시간에 영향을 받았다. 동해방지제의 농도와 침지시간의 증가에 따라 수정률과 부화율은 낮아졌고, 대부분의 동해방지제에서 5-10% 농도와 10-20분의 짧은 침지시간에서 좋은 결과를 보였다. 수정률과 부화율을 근거로 굴 미수정란에 가장 적합한 동해방지제는 DMSO였으며, 처리 농도와 침지 시간은 각각 5%와 10-20분이었다.

사 사

이 논문은 국립수산물과학원 부유망식 개체굴 및 3배체수하식 양식연구 과제로부터 일부 재정적 지원을 받아 수행되었습니다.

REFERENCES

- Chao, N.H., Chiang, C.P., Hsu, H.W., Tsai, C.T. and Lin, T.T. (1994) Toxicity tolerance of oyster embryos to selected cryoprotectants. *Aquat Living Res*, **7**: 99-104.
- Chao, N.H., Hsu, H.W., Chang, H.W. and Chen, Y.J. (1996) Finger fish (*Monodactylus sebae*) as model fish in embryo cryopreservation. *COA Fish. Ser. (Council of Agriculture, Taipei)*, **56**: 159-171.
- Choi, Y.H. and Chang, Y.J. (1999) Survival rates of trochophores from pearl oyster, *Pinctada fucata martensii* and pacific oyster, *Crassostrea gigas* immersed in four kinds of cryoprotectant. *J. Kor. Fish. Soc.*, **32**: 476-480.
- Chung, J.K., Lim, H.K., Son, M.H., Kim, J.H. and Jeong, M.H. (2011) Effects of concentration and Immersion time of three cryoprotective agents on the embryos development of abalone *Haliotis discus hannai*. *Development and Reproduction*, **15**: 337-343. (in Korean)
- Cseh, S., Corselli, j., Nehlsin-Cannarella, S.L., Bailey, L.L. and Szalay, A.A. (1997) The effect of quick-freezing in ethylene glycol on morphological survival and in vitro development of mouse embryos frozen at different preimplantation stages. *Theriogenology*, **48**: 43-50.
- Haga, Y. (1982) On the subzero temperature preservation of fertilized eggs of rainbow trout. *Bull. Japan Soc. Sci Fish.*, **48**: 1569-1572.
- Harvey, B.R., Kelley, N. and Ashwood-Smith, M.J. (1983) Permeability of intact and dechlorinated zebra fish embryos to glycerol and dimethyl sulfoxide. *Cryobiology*, **20**: 432-439.
- Kim, K. T. (2015) Reproductive physiology of pacific oyster *Crassostrea gigas* and cryopreservation of oysters and larvae. Ph.D. thesis, Pukyong National University, Pusan, Korea, 155 pp. [in Korean with English abstract]
- Kim, K.T., Lim, H.K. and Chang, Y.J. (2013) Survival rates with time course of frozen-thawed Pacific oyster larvae in indoor rearing system. *Development and Reproduction*, **17**: 337-343. [in Korean with English abstract]
- Leibo, S.P., Mcgrath, J.J. and Cravalho, E.G. (1978) Microscopic observation of intracellular ice formation in unfertilized mouse ova as a function of cooling rate. *Cryobiology*, **15**: 157-271.
- Leung, L.K.P. and Jamieson, B.G.M. (1991) Live preservation of fish gametes. *In: Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa.* (ed. by B.G.M. Jamieson), pp. 245-269. Cambridge University Press, New York,
- Lim, H. K. (1998) Physiological properties of sperm and gamete preservation in black seabream, *Acanthopagrus schlegeli*. Ph.D. thesis, Pukyong National University, Pusan, Korea, 130 pp. [in Korean with English abstract]
- Lim, H.K., Chang Y.J. and Jo P.G. (2003) Effects of cryoprotectants on survival and hatching of black seabream, *Acanthopagrus schlegeli* embryos. *J. of Aquaculture*, **16**: 262-266. [in Korean with English abstract]
- Renard, P. (1991) Cooling and freezing tolerances in embryo of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: methanol and sucrose effects. *Aquaculture*, **92**: 43-57.
- Renard, P. and Cochard, J.C. (1989) Effect of various cryoprotectants on Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg, Manila clam, *Ruditapes philippinarum* Reeve and King scallop, *Pecten maximus* (L.) embryo: influence of the biochemical and osmotic effects. *Cryo Letters*, **10**: 169-180.

- Sakul, H., Bradford, G.E., Bondurant, R.H., Anderson, G.B. and Donahue, S.E. (1993) Cryopreservation of embryos as means of germ plasm conservation in sheep. *Theriogenology*, **39**: 401-409.
- Schiewe, M.C., Rall, W.F., Stuart, L.D. and Wildt, D.E. (1991) Analysis of cryoprotectant, cooling rate and in situ dilution using conventional freezing or vitrification for cryopreserving sheep embryos. *Theriogenology*, **36**: 279-293.
- Shelton, J.N. (1992) Factors affecting viability of fresh and frozen-thawed sheep embryos. *Theriogenology*, **37**: 713-721.
- Somgsasen, N., Buckrell, B.C., Plante, C. and Leibo, S.P. (1995) In vitro and in vivo survival of cryopreserved sheep embryos. *Cryobiology*, **32**: 78-91.
- Suzuki, T., Komada, H., Takai, R., Arai, K. and Kozima, T.T. (1995) Relation between toxicity of cryoprotectant DMSO and its concentration in several fish embryos. *Fisheries science*, **6**: 193-197.
- Tervit, H.R. and Gold, P.G. (1984) Deep-freezing of sheep embryos. *Theriogenology*, **21**: 268.
- 한국수정란이식 학회 (1995) 소 수정란 이식. pp. 13-132, 정문각. 서울.