

동자개 *Pseudobagrus fulvidraco* 정자 동결보존정민환¹ · 홍창기^{2*} · 임재현² · 구인본² · 박주환²¹국립수산과학원 육종연구센터²국립수산과학원 중앙내수면연구소Sperm Cryopreservation of Korean Bullhead
*Pseudobagrus fulvidraco*Min-Hwan Jeong¹, Chang-Gi Hong^{2*}, Jae-Hyun Im², In-Bon Goo², Ju-Hwan Park²¹Genetics and Breeding Research Center, National Institute of Fisheries Science, Geoje 53334, Korea²Inland Fisheries Research, National Institute of Fisheries Science, Geumsan 32762, Korea

Corresponding Author

Chang-Gi Hong

Inland Fisheries Research, National

Institute of Fisheries Science, Geumsan

32762, Korea

E-mail : ckhong@korea.kr

Received : September 27, 2023

Revised : October 04, 2023

Accepted : October 23, 2023

본 연구는 동자개 정자의 동결보존을 위해 동결보존제의 최적 농도와 적정 희석액을 구명하여 정자를 최상의 상태로 보존하여 인공종자를 생산하는데 목적이 있다. 실험은 3종의 희석액(I: 300 mM glucose, II: Kurokura extender, III: Li extender), 4종의 동결보존제(dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, methanol and glycerol)와 4개의 동결보존제 농도(5, 10, 15, 20%)를 조합하여 대하여 조사하였다. 동결보존한 정자를 해동한 후 정자의 생존율과 정자활성지수로 동결보존제의 효과를 평가하였다. 희석액 III(Li extender)과 10과 15%의 methanol을 조합했을 때 동자개 정자의 생존율과 정자활성지수는 각각 66.9 ± 8.7 , $67.3 \pm 13.1\%$ 과 2.6 ± 0.4 , 2.6 ± 0.5 로 다른 희석액과 동결보존제보다 높았다.

This study aims to find out a suitable extender and cryoprotective agent (CPA) for cryopreservation and its optimum concentration in order to conduct planned artificial seed production of Korean bullhead *Pseudobagrus fulvidraco* and to preserve superior sperm. Experiments were designed to investigate the effects of the different combinations of three extenders (I: 300 mM glucose, II: Kurokura extender, III: Li extender), four cryoprotectants (dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, methanol and glycerol) and four concentrations (5, 10, 15, 20%) on the cryopreservation of Korean bullhead sperm. Post-thawed sperm survival rate and sperm activity index (SAI) were detected to evaluate the effects of sperm cryopreservation. The optimal combination of extender and CPA for cryopreservation of Korean bullhead sperm was extender III + 10 and 15% methanol, resulting in a survival rate and SAI of 66.9 ± 8.7 , $67.3 \pm 13.1\%$ and 2.6 ± 0.4 , 2.6 ± 0.5 respectively, which was higher than had been achieved with other extenders and CPAs.

Keywords: Korean Bullhead(동자개), Sperm(정자), Cryopreservation(동결보존), Cryoprotective agents(동결보존제)

서론

우리나라에 서식하는 메기목 동자개과에 속하는 어종은 2속 6종(*Pseudobagrus fulvidraco*, *P. koreanus*, *P. brevicopus*, *Leiocassis nitidus*, *L. ussuriensis*, *L. longirostris*)이 보고되고 있다(Lee and Lim, 1990). 이중 동자개(*P. fulvidraco*)는 운수성 담수 어종으로 우리나라 서해와 남해로 흐르는 강의 중·하류에 유숙이 완만하고 바닥

이 모래와 진흙이 많은 곳에 서식하며(Kim, 1997), 동해안과 낙동강의 일부 하천에는 이식되어 서식하고 있다(Chae et al., 2019).

국내 동자개류 양식생산량은 2022년 145톤으로 내수면 어류양식 총 생산량(29,005톤)의 0.5%로 미비하지만 양식현장 출하 가격이 10,000원/kg 이상으로 고가로 판매되고 있으며, 수입량은 국내 양식생산량의 약 4배인 650톤으로 수입에 많이 의존하고 있는 고급 어종이다(KOSIS, 2023).

동자개는 자연 산란에 의한 수정란 확보가 어려운 어종으로 대부분 인위적인 채란·채정에 의한 인공수정이 이루지고 있다. 특히 수컷에서 정액을 확보하기 위해서 일반적으로 수컷 친어의 복부를 절개하여 정소를 적출/분쇄하여 사용하는 생식소 절개법을 많이 활용하기 때문에 한번 사용한 수컷의 재활용은 불가능하다. 따라서 특정 수컷 개체를 이용한 지속적인 후대생산 또는 수회에 나뉘어서 이뤄지는 인공수정 실험 등 특수한 목적을 수행하기 위해서는 정액의 장기 보존 방법이 필요하다.

정액 동결보존 기술은 인공종자생산에 있어 친어의 방란·방정 시기의 불일치, 성비의 불균형에 따른 문제 해결 및 수컷 친어의 관리/유지하는데 소요되는 노력과 경비를 절약할 수 있다. 또한 우량 개체간의 선택적 교배가 가능하며, 멸종위기에 놓인 재래종의 보존을 간편하게 할 수 있는 장점을 가지고 있다(Chang et al., 1997; Choi et al., 2007). 어류 정자의 보존에 대한 연구는 Barrett (1950)의 연어류 정자 보존에 대한 연구 이후 꾸준히 연구되고 있다(Jang, 1997). 그러나 어류의 정자 동결보존에 대한 연구는 일부 어종에 대해서만 진행되어 있다(Kim et al., 2017). 어류의 정액 동결보존 시 냉동 후 해동 정자의 생존율 및 운동성을 유지하기 위해서는 다양한 희석액, 동결보존제(cryoprotective agent, CPA), 평형시간, 냉동률 및 해동온도 등에 대한 중별 최적 조건을 탐색하여야 한다. 이중 희석액은 정자의 활성을 억제하여 동결보존 전·후로 생존율과 운동성을 유지하게 하는 역할을 하고, CPA는 정액의 냉동/해동 시 정자의 세포 내 결빙형성 및 냉해를 억제하는 역할을 한다. 그러나 CPA는 독성이 있어 정자의 생존율 및 운동성을 감소시키므로, 어종별 적정 CPA를 탐색하는 것은 매우 중요하다(Jeong et al., 2014).

본 연구에서는 고부가가치 내수면 양식 어종인 동자개의 효율적인 인공종자생산 기술개발을 위한 연구의 일환으로 동자개의 정액 동결보존 시 최적의 희석액과 CPA의 종류 및 농도 조합을 알아보려고 한다.

재료 및 방법

1. 실험어 및 정액 확보

실험에 사용한 동자개는 국립수산과학원 중앙내수면연구소에서 사육중인 전장 19.9 ± 3.2 cm, 체중 82.4 ± 39.5 g의 수컷 18마리를 사용하였으며, 1회 실험 시 6마리씩 총 3회 실시하였다. 정액은 실험어를 2-phenoxyethanol (Sigma-Aldrich, USA)을 200 ppm으로 희석하여 마취한 후 복부를 절개하여 정소를 채취한 다음 정소에 묻은 이물질을 솜으로 제거 후 실험용 가위로 잘게 자른 뒤 50 μ m 망을 이용하여 정액을 짜내어 실험 전까지 냉장보관(2°C) 하였다. 동자개 정액 동결보존 실험 직전 각각의 개체별로 냉장보관 한 정액의 일부를 담수에 1:100으로 희석하여 광학현미경으로 관찰, 생존율 95% 이상, 운동성이 왕성한 정액만 실험에

사용하였다.

2. 정액 특성 분석

채취한 정액 중 일부는 정액의 화학적 특성을 알아보기 위하여 원심분리(4°C, 12,000 rpm, 10분) 하여 정자와 정장을 분리하였으며, 정장은 분석 전까지 초저온냉동고(-80°C)에 보관하였다. 정장의 Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} , glucose 및 total protein (TP) 농도는 건식임상화학자동분석장치(Dri-chem NX500i, Fuji, Japan)를 이용하여 측정하였으며, pH와 삼투질농도는 각각 pH 측정기(Orion 2-star, Thermo Fisher Scientific, USA)와 삼투질농도 측정기(Osmomat 3000D, Gonotec, Germany)로 측정하였다.

3. 희석액 및 CPA

동자개 정액의 동결보존 시 최적의 희석액과 CPA 종류 및 농도를 조사하기 위하여 희석액 3종과 CPA 4종 및 CPA 별 4개의 농도를 조합하여 사용하였다.

희석액 I은 어류의 정액 동결보존 시 보편적으로 쓰이는 300 mM glucose (5.4048 g glucose, 증류수 100 mL; pH 6.8 ± 0.1 , osmolality 315 ± 2 mOsm/kg), 희석액 II는 잉어과 어류의 정액 동결보존 연구에서 효과가 좋았던 Kurokura et al. (1984)의 인공정장(artificial seminal plasma, ASP; 0.44 g NaCl, 0.62 g KCl, 0.022 g CaCl_2 , 0.008 g MgCl_2 , 0.02 g NaHCO_3 , DW 100 mL; pH 7.6 ± 0.1 , osmolality 301 ± 1 mOsm/kg) 그리고 희석액 III은 메기과 어류인 yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* 정액 동결보존 연구(Pan et al., 2008)에서 효과가 좋았던 Li et al. (1994)의 ASP (0.78 g NaCl, 0.02 g KCl, 0.021 g CaCl_2 , 0.0021 g NaHCO_3 , DW 100 mL; pH 7.6 ± 0.1 , osmolality 256 ± 2 mOsm/kg)를 제조하여 사용하였다.

CPA는 정액 동결보존 연구에서 가장 많이 사용되는 dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol (EG), methanol 및 glycerol을 사용하였으며, 농도는 각각 5, 10, 15, 20%로 하였다.

4. 정액 동결보존

희석액 3종과 CPA 4종의 농도별 조합에 따른 동자개 정액의 동결보존 효과를 비교하기 위하여 각각의 희석액과 농도별 CPA가 첨가된 용액에 정액을 20:1의 비율로 희석하여 3분간 평형시간을 준 다음 0.25 mL straw에 봉입하였다. 이 후 각 straw를 액체질소 증기(-76°C)로 3분간 1차 냉각 한 다음, 액체질소(-196°C)에 바로 넣어 급속 냉각하였다. 희석액 3종과 CPA 4종의 농도별로 냉동된 각각의 정액 straw를 액체질소에 50일간 보존하였다. 이후에 각각의 정액 straw를 25°C의 항온수조에 넣어 60초간 급속 해동한 다음, 정자의 생존율 및 운동성을 측정하였다.

정자의 생존율과 운동성은 해동 정액과 담수를 1:100으로 희석

Table 1. Numerical index for the evaluation of sperm activity index (SAI)

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

SAI = score × % motile sperm / 100

Table 2. Biochemical properties in seminal plasma of Korean bullhead *Pseudobagrus fulvidraco*

Component	Seminal plasma
Na ⁺ (mM/L)	100.5±10.5
K ⁺ (mM/L)	36.4±3.9
Cl ⁻ (mM/L)	91.0±2.1
Mg ²⁺ (mg/L)	2.8±0.9
Ca ²⁺ (mg/L)	3.0±0.2
Glucose (mg/L)	9.0±2.4
Total protein (g/L)	2.5±1.0
pH	7.1±0.1
Osmolality (mOsm/kg)	259.3±5.1

하여 slide glass 위에 분주하여 광학현미경으로 관찰하였다. 생존율은 머리와 꼬리의 움직임이 관찰되는 정자는 생존한 것으로 판단하였으며, 운동성은 Table 1의 운동지수에 따라 점수를 부여하고, 각각의 운동점수와 운동 정자의 비율에 따라 Strüssmann et al. (1994)의 방법을 변형하여 정자활성지수(sperm activity index, SAI)로 나타내었다.

결 과

1. 정액 특성

동자개 정액을 원심분리하여 얻은 정장의 화학적 특성은 Table 2에 나타내었다. 정장의 Na⁺, K⁺ 및 Cl⁻ 농도는 각각 100.5 ± 10.5, 36.4 ± 3.9, 91.0 ± 2.1 mM/L, Mg²⁺ 및 Ca²⁺ 농도는 각각 2.8 ± 0.9, 3.0 ± 0.2 mg/L로 나타났다. 정장의 glucose와 TP는 각각 9.0 ± 2.4 mg/L, 2.5 ± 1.0 g/L 이었으며, pH와 삼투질농도는 각각 7.1 ± 0.1과 259.3 ± 5.1 mOsm/kg로 나타났다.

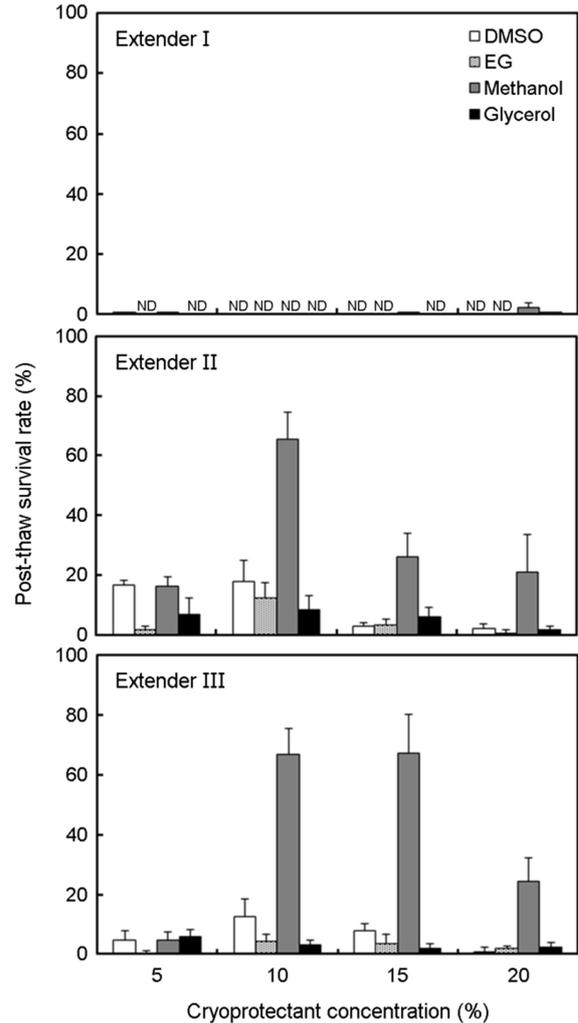


Fig. 1. Effects of extenders, cryoprotective agents (CPAs) and concentrations on survival rate of post-thawed sperm of Korean bullhead *Pseudobagrus fulvidraco*. ND: no data.

2. 희석액 종류와 CPA 및 농도별 동결보존 효과

희석액 3종과 CPA 4종의 4개 농도를 각각 조합한 용액으로 동결보존 한 동자개 정액의 해동 후 정자의 생존율 및 SAI는 Fig. 1과 2에 나타내었다.

희석액 I에 각각의 CPA 및 농도로 조합한 용액으로 동결보존 한 동자개 정액의 해동 후 정자의 생존율은 모두 0.0~2.1%, SAI는 0.0~0.9로 매우 낮았다. 희석액 II에 각각의 CPA 및 농도로 조합한 용액으로 동결보존 한 동자개 정액의 해동 후 정자의 생존율이 60%가 넘는 조합은 10% methanol (65.4 ± 9.2%)로 다른 조합으로 동결보존 한 해동 정자 보다 높았으나, SAI가 2.0 이상인 조합은 없었다. 희석액 III에 각각의 CPA 및 농도로 조합한 용액으

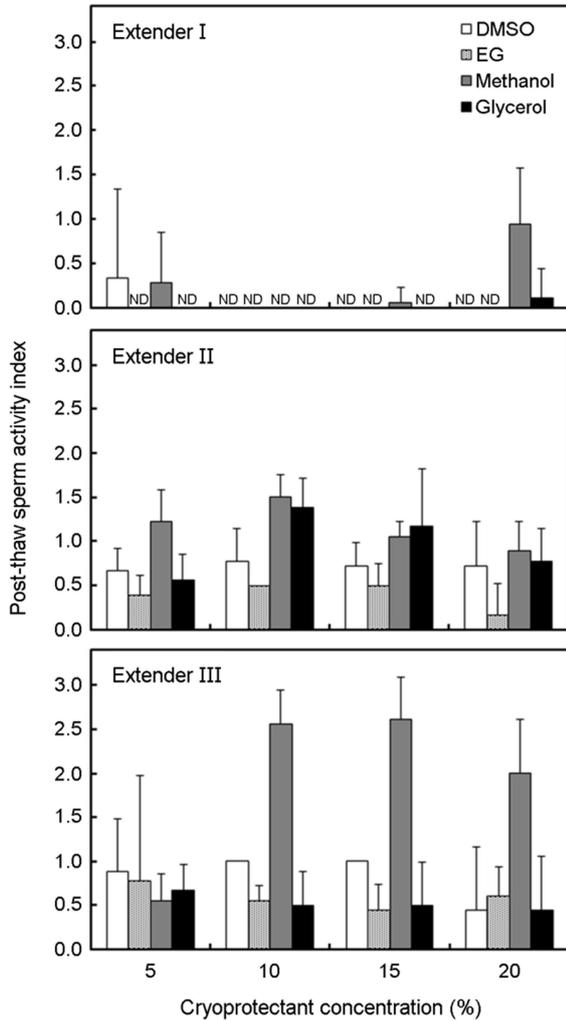


Fig. 2. Effects of extenders, cryoprotective agents (CPAs) and concentrations on sperm activity index of post-thawed sperm of Korean bullhead *Pseudobagrus fulvidraco*. ND: no data.

로 동결보존 한 동자개 정액의 해동 후 정자의 생존율이 60%가 넘는 조합은 10, 15% methanol 각각 $66.9 \pm 8.7\%$, $67.3 \pm 13.1\%$ 로 다른 조합으로 동결보존 한 조합 보다 높았다. SAI가 2.5 이상인 조합 역시 10, 15% methanol 각각 2.6 ± 0.4 , 2.6 ± 0.5 로 다른 조합 보다 높았다(Fig. 1, 2).

고찰

동결보존 후 정자의 생존율과 운동성에 영향을 미치는 많은 요인 중 희석액은 동결보존 과정에서 가장 먼저 확인해야 할 조건이다(Jeong et al., 2014). 일반적으로 체외수정을 하는 어류의 정자는 체외로 방출되면 수분에서 수 십분 내에 운동성을 상실하게

되는데, 희석액은 정자의 생존율은 유지하되 활성을 억제하여 동결보존 전·후로 생존율과 운동성을 보존하는 역할을 한다(Ohta and Izawa, 1996). 그러나 종마다 적정 희석액이 달라 ASP, glucose, 생리식염수, sucrose 등 여러 가지 희석액을 사용하고 있다. CPA는 정자의 동결보존 시 가장 중요한 요소로 세포 내 삼투질농도와 결빙형성 등을 완화·조절하는 역할을 한다(Jamieson, 1991). 이 때문에 CPA는 중성 물질에 친수성이 이어야 하며, 세포막 투과성이 높고, 세포에 대한 독성이 적어야 한다(Kuwano and Saga, 2000). 또한 CPA의 종류에 따라 종 특이성을 보이기 때문에 정액 동결보존 시 적정 CPA 종류와 농도를 조사하는 것은 중요하다.

본 연구에서 동자개 정액의 동결보존 시 적정 희석액과 CPA 종류 및 농도를 조사하기 위하여 희석액 3종, CPA 4종, 각 CPA 별 4개의 농도, 총 48개의 조합을 만들어 적정 동자개 정액 동결보존 조건을 조사하였다. 48개의 조합으로 만들어진 용액에 침지하여 50일간 -196°C 의 액체질소에 보존 한 결과, 해동 정자의 생존율이 60% 이상, SAI 가 2.5 이상인 조합은 희석액은 III, CPA는 methanol, 농도는 10%와 15%였다.

Gwo et al. (1991)은 sodium chloride, glucose, sucrose와 같은 조성이 간단한 희석액이 어류의 정액 동결보존 시 유리하다고 하였고, Chang et al. (1997)은 당질이 포함된 희석액은 정자 세포막의 인지질을 안정시켜 보존 효과를 높인다고 보고하였다. 본 연구에서는 300 mM glycerol(희석액 I)로 조합한 용액에 침지하여 동결보존 한 해동 정자의 생존율과 SAI는 없거나 매우 낮았다. 그러나 다른 담수 어류의 정자 이온 농도를 바탕으로 제조한 ASP를 희석액으로 사용하여 조합한 용액에 침지하여 동결보존 한 해동 정자는 CPA 종류와 농도에 따라 각기 다르지만 높은 생존율과 운동성을 보였다. 따라서 정액 동결보존 시 종 특성을 고려한 ASP를 희석액으로 사용하는 것이 유리할 수 있다고 판단된다.

어류의 정액 동결보존을 연구하는 많은 연구자들의 연구결과를 보면 일반적으로 해산 어류의 정액 동결보존 시 적정 CPA는 DMSO, EG, glycerol로 다양하나 그 중 DMSO가 전반적으로 효과가 좋은 것으로 보고하고 있다(Ciereszko and Dabrowski, 1993; Lim et al., 2007; Jeong et al., 2012). 그리고 담수 어류에서는 다른 CPA 보다 methanol이 효과가 좋은 것으로 보고하고 있다(Lahnsteiner et al., 2002; Lim et al., 2008; Jeong et al., 2014). 본 연구에서도 methanol이 다른 CPA 보다 높은 생존율과 SAI를 보였다.

정자와 정자의 물리·화학적 특성은 어류의 번식 능력을 평가하거나 수정 기구를 이해하는 기준이 되며(De Kruger et al., 1984), Na^+ , K^+ , Cl^- , Mg^{2+} 및 Ca^{2+} 등과 같은 이온 농도는 정자의 삼투질농도를 유지하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Cruca, 1969). 희석액은 정자의 운동성을 억제시키기 위한 것으로(Lim et al., 2005), 어종마다 차이가 있어 정자 동결보존 대상 어류를 고려하여 희석액을 사용해야 한다(Kim et al., 2017).

본 연구에서 동자개의 정자 Na^+ 농도는 100.5 mM/L로 다른 담수 어류인 금붕어 *Carassius carassius* 96.0 mM/L, 잉어 *Cyprinus*

carpio 75.0 mM/L (Morisawa et al., 1983; Morisawa, 1985), 페르시아 철갑상어 *Acipenser persicus* 62.4 mM/L (Alavi et al., 2004), 묵납자루 *Acheilognathus signifer* 83.6 mM/L (Jeong et al., 2014) 보다 높았으나, 일반적인 해수 어류의 정상 Na^+ 농도인 150~165 mM/L (Chang et al., 1997; Lim et al., 2007; Jeong et al., 2012) 보다 낮았다. 동자개의 정상 K^+ 농도(36.4 mM/L)는 담수 어류의 정상 K^+ 농도 70.2~85.6 mM/L (Morisawa et al., 1983; Morisawa, 1985; Alavi et al., 2009; Jeong et al., 2014)와 해수 어류의 정상 K^+ 농도는 4.9~9.8 mM/L (Chang et al., 1995; Le et al., 2007; Lim et al., 2007)의 중간 범위에 속하였다. 동자개의 정상 Cl^- 농도(91.0 mM/L) 역시 담수 어류의 정상 Cl^- 농도 20~40 mM/L (Morisawa et al., 1983; Morisawa, 1985; Alavi et al., 2004; Jeong et al., 2014)와 해수 어류의 정상 Cl^- 농도 133.0~156.0 mM/L (Chang et al., 1995; Hafez et al., 2007; Le et al., 2007)의 중간 범위에 속하였다. Mg^{2+} 및 Ca^{2+} 등 다른 이온의 농도 역시 비슷한 경향을 보였다. 동자개 정액의 정상 이온 농도가 담수 어류와 해수 어류의 중간 범위에서 속하는 것은 종 특성으로 추정되며, 같은 동자개과의 어류 또는 메기류의 정상 이온 농도에 관한 추가 연구를 통해 종 특성을 검증할 필요가 있다고 판단된다.

일반적으로 체외수정을 하는 어류의 정자는 정소 내에서는 비활성 상태로 있다가 방정이 이루어지면서 환경수의 삼투질농도 등의 물리·화학적 요인에 의해 운동성을 획득하며, 담수 어류의 정자는 정상보다 삼투질농도가 낮은 저장액에서, 해수 어류의 정자는 정상보다 삼투질농도가 높은 고장액에서 운동성이 개시되는 것으로 알려져 있다(Morisawa and Suzuki, 1980). 본 연구에서 동자개 정액의 삼투질농도는 259.3 mOsm/kg로 일반적인 담수 어류의 정상 삼투질농도인 82~317 mOsm/kg (Morisawa et al., 1983; Morisawa, 1985; Alavi et al., 2004; Jeong et al., 2014) 범위에 속하였으며, 정액 동결보존 직전 실시한 정자활성 조사에서 정액을 담수에 희석하여 정자 운동성을 측정한 결과 왕성한 활성을 보였다.

본 연구를 통해 담수 어류의 정액 동결보존 시 정액의 이온과 삼투질 농도를 고려하여 희석액을 선택하는 것은 중요하다고 사료되며, CPA로 methanol을 우선적으로 선택하는 것을 조심스럽게 추천한다.

사 사

이 논문은 2023년도 국립수산물학원 수산시험연구사업(R2023017)의 지원으로 수행된 연구입니다.

참고문헌

Alavi SMH, Cosson J, Karami M, Mojazi Amiri B, Akhounzadeh MA. 2004. Spermatozoa motility in the persian sturgeon, *Acipenser persicus*. Effects of pH, dilution rate, ions and

osmolality. Reproduction 128: 819-828.

- Alavi SMH, Rodina M, Policar T, Linhart O. 2009. Relationship between semen characteristics and body size in *Barbus barbus* L. (Teleostei: Cyprinidae) and effects of ions and osmolality on sperm motility. Comp Biochem Physiol A 153: 430-437.
- Barrett I. 1950. Fertility of Salmonoid Eggs and Sperm after Storage. J Fish Res Bd Can 8: 125-33.
- Chae BS, Son HB, Park JY. 2019. A Field guide to the freshwater fishes of Korea. LG Evergreen Foundation, Seoul, Korea, pp 355.
- Chang YJ, Chang YJ, Lim HK. 1997. Cryopreservation of tiger puffer (*Takifugu rubripes*) sperm. Dev Reprod 1: 29-36.
- Chang YJ, Lim HK, Kho KH. 1995. Properties of semen and sperm motility in black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*. J Aquacult 8: 149-157.
- Choi HY, Jo PG, Kim TI, Bai SC, Chang YJ. 2007. The effects of cryopreservation on fine structures of pearl oyster (*Pinctada fucata martensii*) larvae. Dev Reprod 11: 79-84.
- Ciereszko A, Dabrowski K. 1993. Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique. Aquaculture 109: 367-373.
- Cruca DD. 1969. Some chemical and physical characteristics of fish sperm. Trans Ame Fish Soc 4: 785-788.
- De Kruger JC, Smit GL, Van Vuren JHJ, Ferreira JT. 1984. Some chemical and physical characteristics of the semen of *Cyprinus carpio* L. and *Oreochromis mossambicus* (Peters). J Fish Biol 24: 263-272.
- Gwo JC, Strawn K, Longnecker MT, Connie R. 1991. Cryopreservation of atlantic croaker spermatozoa. Aquaculture 94: 355-375.
- Hafez A, Niksirat H, Amiri BM, Alavi SMH, Karami M. 2007. Sperm density, seminal plasma composition and their physiological relationship in the endangered caspian brown trout *Salmo trutta caspius*. Aquacult Res 38: 1175-1181.
- Jamieson BGM. 1991. Fish evolution and systematics: Evidence from spermatozoa. With a survey of lophophorate, echinoderm and photochordate sperm and an account of gamete cryopreservation. Cambridge University Press, Cambridge. pp 319.
- Jang YJ. 1997. Semen characteristics and sperm preservation of puffer fish, *Takifugu rubripes*. Master's thesis, Pukyong National University, Busan. p 1-3.
- Jeong MH, Lim HK, Do YH, Kim JH, Son MH, Chang YJ. 2012. Assessment of sperm activity of black porgy acclimated in freshwater on cryopreservation condition. Dev Reprod 16:

- 77-85.
- Jeong MH, Min BH, Park MS, Myeong JI, Im JH, Lim HK, Hwang HK. 2014. Cryopreservation of common Korean bitterling *Acheilognathus signifer* sperm. Korea J Fish Aquat Sci 47: 39-44.
- Kim HG, Kim SC, Kim DY, Kim JW, Kho KH. 2017. Studies on Cryopreservation of Sperm in Sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* and Kelp grouper, *E. bruneus*. Journal of Marine Life Science 2: 1-6.
- Kim IS. 1997. Illustrated encyclopedia of fauna and flora of Korea, Vol. 37, Freshwater fishes. Ministry of Education, Seoul. pp 320-330.
- KOSIS. 2023. Fishery production survey. Retrieved from <https://kosis.kr/statHtml/statHtml.do> Aug 19, 2023.
- Kurokura H, Hirano R, Tomita M, Iwahashi M. 1984. Cryopreservation of carp sperm. Aquaculture 37: 267-273.
- Kuwano K, Saga N. 2000. Cryopreservation of marine algae: Cryopreservation of marine algae: Applications in biotechnology. In: Figerman, M. and R. Nagabhushanam. ed. Recent advances in marine biotechnology. Volume 4: Aquaculture. Part A, Seaweeds and invertebrates. Science Publishers Inc., New Hampshire, U.S.A. pp 23-40.
- Lahnsteiner F, Mansour N, Weismann T. 2002. A new technique for insemination of large egg batches with cryopreserved semen in the rainbow trout. Aquaculture 209: 359-367.
- Le MH, Lim HK, Min BH, Kim SY, Chang YJ. 2007. Milt properties and spermatozoa structure of filefish, *Thamnaconus modestus*. Dev Reprod 11: 227-233.
- Lee CL, Lim IS. 1990. A taxonomic revision of the Family Bagridae (Pisces, Siluriformes) from Korea. Korea J Ichthyol 2: 117-137.
- Li J, Li Y, Zhao XX, Zhang SM, Zhang YH, Jiang KB, Yang ZX. 1994. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs of Tilapia. Biotechnology 4: 20-22.
- Lim HK, An CM, Son MH, Park MW, Park YJ. 2005. Effect of diluents for cold storage of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm. J Kor Fish Soc 38: 2-38.
- Lim HK, An CM, Noh GA, Min BH. 2007. Effects of diluents and cryoprotectants on sperm cryopreservation in starry flounder (*Platichthys stellatus*). J Aquacult 20: 173-177.
- Lim HK, Lee CH, Min BH, Lee JU, Lee CS, Seong KB, Lee SM. 2008. Effects of diluents and cryoprotectants on sperm cryopreservation of masou salmon, *Oncorhynchus masou masou*. J Korean Fish Soc 41: 267-271.
- Morisawa M, Suzuki K. 1980. Osmolality and potassium ion: Their roles in initiation of sperm motility in teleosts. Science 210: 1145-1146.
- Morisawa M, Suzuki K, Shimizu H, Morisawa S, Yasuda K. 1983. Effects of osmolarity and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. J Exp Biol 107: 95-103.
- Morisawa M. 1985. Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleosts. Zool Sci 2: 605-615.
- Ohta H, Izawa T. 1996. Diluent for cool storage of Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. Aquaculture 142: 107-118.
- Pan JL, Ding SY, Ge JC, Yan WH, Hao C, Chen JX, Huang YH. 2008. Development of cryopreservation for maintaining yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* sperm. Aquaculture 279: 173-176.
- Strüssmann CA, Renard P, Ling H, Takashima F. 1994. Motility of pejerrey *Odontesthes bonariensis* spermatozoa. Fish Sci 60: 9-13.