

# 희석액별 감성돔, *Acanthopagrus schlegeli* 정자의 단기보존 효과

임한규 · 고강희 · 장영진  
부경대학교 양식학과

## Effect of Diluents on the Short-Term Storage of Sperm in Black Seabream, *Acanthopagrus schlegeli*

Han Kyu LIM, Kang Hee KHO and Young Jin CHANG  
Department of Aquaculture, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

Experiments were performed to find out the proper conditions of diluents for the short-term storage of sperm of black seabream, *Acanthopagrus schlegeli*.

For milt collection, brood stock was reared in a recirculating seawater system. The following results indicated that short-term storage methods with fresh condition could be employed in black seabream sperm. When the black seabream's serum was used as a diluent for the fresh storage, sperm activity index (SAI), fertilization rate and survival rate derived the best result in 7~10 days of storage. pH 7 and 8 showed the highest SAI in the same storage condition. In order to keep high SAI and survival rate of the sperm, addition of 800 ppm neomycine into the diluent revealed the best storage results.

**Key words :** black seabream, *Acanthopagrus schlegeli*, sperm storage, diluent

### 서 론

어류 정자의 단기 액상보존은 양식 대상 어류의 종묘 생산시 친어의 방란 방정 시기와 성비의 차이에 따른 문제점을 극복할 수 있게하며, 정액의 수송이나 조작 등을 간편하게 한다. 이와 같이 어류의 정자보존 기술이 종묘 생산에 있어 많은 장점을 가지고 있으나, 우리나라에서는 아직 이 분야에 관한 기초 연구가 미흡한 실정이다. 그러므로 해산 어류의 정자보존을 위한 정자의 기초 생리 활성 요인에 관한 연구와 함께 실제 종묘생산 현장에서 단기간 효과적으로 활용할 수 있는 단기 액상보존 기술의 확보가 우선되어야 할 것이다.

지금까지 외국에서 어류 정자의 액상보존에 관한 연구는 희석액에 따른 보존효과 (Chao et al., 1975; Hara et al., 1982; McNiven et al., 1993), 산소공급에 따른 정자의 수정능력 향상 (Stoss and Holtz, 1983), 항생제 사용에 따른 보존기간 연장 (Chao et al., 1992; Saad et al., 1987; Stoss et al., 1978) 및 희석액의 농도에 따른 수정률의 검토 (Erdahl and Graham, 1987) 등을 통하여, 신선한 정자의 최적 액상보존 조건을 파악하기 위한 방향으로 연구가 진행되어 왔었다.

본 연구에서는 산업적으로 유용한 어류인 감성돔, *Acanthopagrus schlegeli*을 대상으로 희석액과 항생제 처리에 따른 정자의 단기 액상보존 가능성을 검토하여, 어류의 종묘생산 과정에 이용 가능한 정자보존 방법을 제공하고 자 하였다.

### 재료 및 방법

정액채취를 위한 실험어는 부경대학교 양식생리학연구실의 순환여과 사육 시스템에서 사육한 전장 25.9 ± 1.7 cm, 체중 292.8 ± 53.7 g의 감성돔을 사용하였다. 실험기간중 사육수의 수온은 17.5~23.0°C (평균 20.7 ± 1.2°C), 비중은 1.0227~1.0263 (평균 1.0246 ± 0.0011) 범위였다. 사료는 시판용 넙치 부상사료를 공급하였으며, 1일 공급량은 체중의 1% 내외로 하였다.

어체로부터 정액을 채취하기 위하여 실험어를 마취제 (MS-222, 200 ppm)를 사용하여 마취시킨 다음 개체별로 표지하였다. 오줌과 배설물을 미리 제거하고, 마른 거즈로 비뇨생식공 주위를 깨끗이 닦은 뒤, 복부를 여러번 가볍게 문질러 정액을 채취하였다. 채취된 정액은 시험관에 넣어 밀봉한 후 실험에 사용될 때까지 얼음을 채운 ice box에서 보관하였으며, 채정후 1시간 이내에 실험에 사용하였다.

희석액에 따른 정자의 액상보존 효과를 파악하기 위하여, 가축에서 이용하고 있는 egg-tris<sup>1</sup> (鄭 等, 1991)외에 0.1 M, 0.3 M, 0.5 M glucose 및 감성돔 혈액을 원심분리하여 얻은 혈청을 각각 2:1의 비율로 정액과 희석한 후 1.5 ml vial에 분주하였다.

희석액의 최적 pH를 조사하기 위하여 희석액 조성에 따른 액상보존 실험에서 가장 좋은 성적을 나타냈던 감성돔 혈청에 HCl과 NaOH를 첨가하여 pH 5, 6, 7, 8 및 9로 조절하였다. 이후 혈청과 정액의 비율을 2:1로 희

**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

석하여 1.5 ml vial에 분주하였다.

액상보존시 항생제의 첨가에 따른 보존효과를 평가하기 위하여 0.3 M glucose를 2 : 1의 비율로 정액과 섞은 후, neomycine, gentamycin 및 chlortetracycline의 최종 농도가 400, 600, 800, 1000 ppm이 되도록 첨가하였다. 각 실험에서 분주된 vial들은 0 ± 1°C의 냉장고에서 10일 동안 보관하면서 1일 간격으로 정자의 운동성과 생존율을 조사하였다.

액상보존의 각 실험별 정액의 처리조건에 따른 운동성을 평가하기 위하여 앞의 방법에 따라 보존한 희석정액을 인공해수<sup>2</sup>와 1 : 3의 비율로 섞은 다음, 광학현미경으로 관찰된 운동지수에 따라 점수를 부여하였다 (Table 1). 그리고 Strussmann et al. (1994)의 방법을 변형한 Table 1에 따라 정자활성지수 (sperm activity index, SAI)<sup>3</sup>를 계산하였다. 각 실험에 대한 정자활성지수는 3회 측정하여 평균을 구하였다.

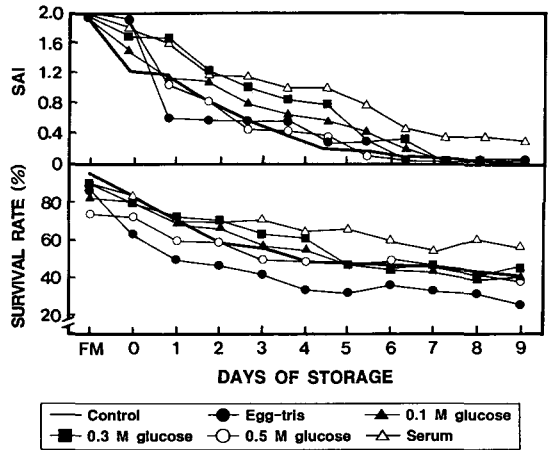
액상보존 실험에서의 실험 후 정자의 생존 여부는 정자를 5% eosin-10% nigrosin (Blom, 1950; Fribourgh, 1966)에 염색한 다음, 정자의 염색 정도에 따라 판별하였으며, 광학현미경 (×1000) 아래에서 5회 측정하여, 전체 정자수에 대한 살아 있는 정자수의 비율로 생존율을 산정하였다.

보존 후 정자의 알에 대한 수정은 건식법으로 3회 실시하였으며, 수정 12시간 후 낭배기로 발생이 진행된 배의 수를 계수하여 수정률을 구하였다.

각 실험 결과는 일원분산분석 (one-way ANOVA)과 Tukey test (Zar, 1984)로 검정하였다.

**결 과**

채취 직후의 정액을 희석액별로 혼합하여 0°C로 유지한 다음, 보존 기간에 따른 SAI와 정자의 생존율을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 희석액별 희석 직후의 SAI는 egg-tris와 0.5 M glucose에서 1.9로 가장 높았고, 0.1 M glucose에서 1.5로 가장 낮았다. 그러나 보존 1일째의 SAI는 egg-tris에서 급격히 떨어진 반면, 혈청에서는 서서히 낮아지면서 보존 10일째 까지도 0.3으로 비교적 높게 유지되어 보존효과가 가장 좋았다. 희석액별 정자의 생존율에서도 보존기간별 SAI와 비슷한 경향을 보여,



**Fig. 1. Variation of sperm activity index (SAI) and survival rate in black seabream, *Acanthopagrus schlegelii* sperm stored at 0°C with five diluents. Serum is originated from black seabream. FM : fresh milt.**

<sup>1</sup> tris 2.422 g + citric acid 1.424 g + fructose 0.48 g + 400 ppm gentamycin 80 μl + distilled water 80 ml + egg yolk 20 ml

<sup>2</sup> NaCl 2.7 g + KCl 0.07 g + NaHCO<sub>3</sub> 0.05 g + CaCl<sub>2</sub> 0.12 g + MgCl<sub>2</sub> 0.46 g + distilled water 100 ml

<sup>3</sup>SAI = 점수 × 운동정자의 비율 (%) / 100

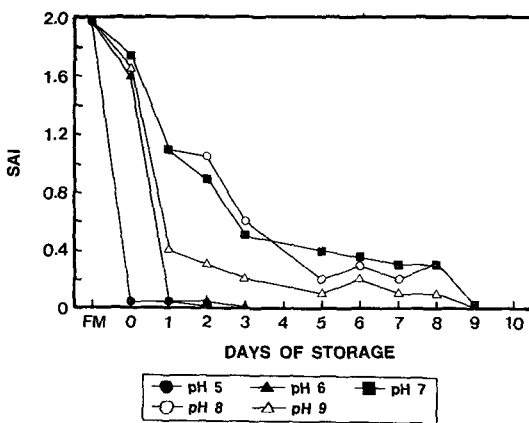
**Table 2. Effects of diluents on fertilization rate in black seabream sperm**

Diluent	Days of storage	SAI	Fertilization rate (%) <sup>1</sup>
Control <sup>2</sup>	0	2.40	78.3 ± 8.3 <sup>a</sup>
Serum <sup>3</sup>	7	0.87	47.7 ± 7.3 <sup>b</sup>
Egg-tris	7	0.25	37.7 ± 7.6 <sup>b</sup>
0.1 M glucose	7	0.32	35.8 ± 8.4 <sup>b</sup>
0.3 M glucose	7	0.35	44.3 ± 5.3 <sup>b</sup>
0.5 M glucose	7	0.32	39.6 ± 5.9 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>values within the same column with different letters are significantly different (P<0.01).

<sup>2</sup>fresh milt

<sup>3</sup>black seabream

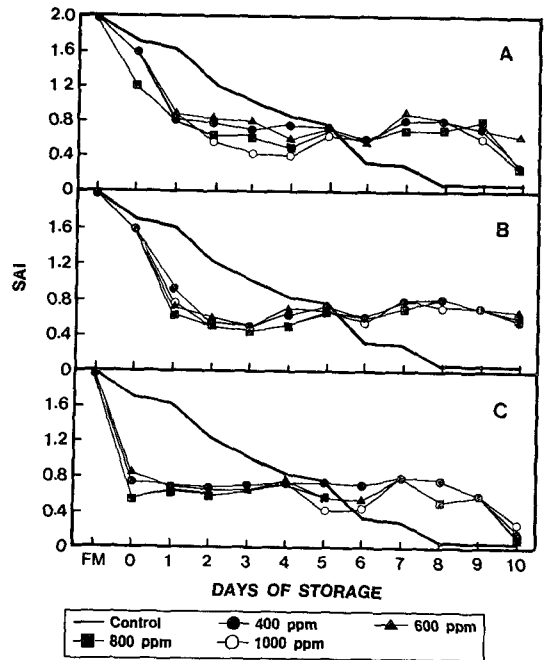


**Fig. 2. Variation of sperm activity index (SAI) and survival rate in black seabream, *Acanthopagrus schlegeli* sperm stored at 0°C with several pH conditions. FM : fresh milt.**

보존 10일째 정자의 생존율은 혈청에서 55.6%로 가장 높았으나 egg-tris에서는 25.5%로 낮았다.

희석액별로 7일 동안 액상보존한 정자의 감성돔 알에 대한 수정률은 Table 2와 같이 혈청을 희석액으로 사용하였을 때 47.7 ± 7.3%로 가장 높았고, 그 다음이 0.3 M glucose, 0.5 M glucose, egg-tris, 0.1 M glucose 순이었으나 서로간에 유의한 차이는 없었다. 액상보존한 정자의 수정률들은 신선한 정액으로 수정시켰을 때의 78.3 ± 8.3% 보다 유의하게 낮았다 (P<0.01).

정자의 생존율과 수정률이 가장 높았던 감성돔 혈청을 희석액으로 하여, 희석액의 pH를 달리한 후 보존하였을 때의 SAI는 보존 8일째까지는 pH 7과 8에서 높았다. 특히 pH 5와 6의 산성 희석액에서는 희석과 동시에 SAI가 급격히 감소하여 보존 3일 이내에 SAI가 0으로 낮아진 반면, pH 7~9에서는 보존 9일째에 SAI가 0이 됨으로써, 정장에서와 같은 pH 수준에서 보존효과가 좋을 수 있었다 (Fig. 2).



**Fig. 3. Variation of sperm activity index (SAI) in black seabream, *Acanthopagrus schlegeli* sperm stored at 0°C with three antibiotic. FM : fresh milt. A : neomycin, B : gentamicin, C : chlorotetracycline.**

5% glucose를 섞은 희석액에 3종의 항생제를 농도별로 첨가하여 0°C에서 보존하였을 때, 보존기간에 따른 SAI를 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. 보존 5일째까지의 SAI는 항생제를 첨가하지 않았던 대조구에서 항생제를 첨가한 실험구 보다 높았다. 그러나 항생제를 첨가한 실험구에서는 보존 직후 및 1일째 사이에 급격히 낮아졌던 SAI가 그 이후 0.8 전후로 유지되어 9일째까지 이어졌으며, 5일 이후 부터는 대조구에 비해 높은 SAI를 나타냈다.

이상의 조건에서 3종의 항생제를 농도별로 10일 동안 보존했을 때 정자의 생존율은 neomycine 800 ppm 처리

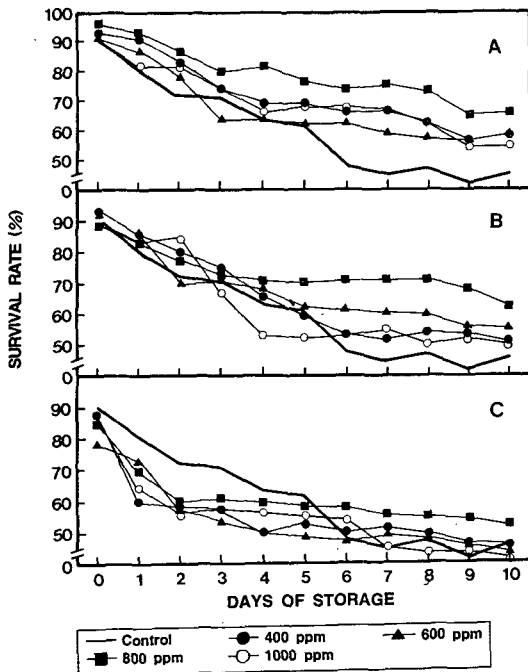


Fig. 4. Variation of survival rate in black seabream, *Acanthopagrus schlegeli* sperm stored at 0°C with three antibiotic. A : neomycin, B : gentamicin, C : chlortetracycline.

구에서 65.6%로 가장 높았으며, gentamicine과 chlortetracycline에서도 800 ppm 처리구가 각각 62.4%, 51.8%로 생존율이 가장 높았다. 항생제별로는 neomycine이 가장 생존율이 높았으며, 다음이 gentamicine과 chlortetracycline 순이었다 (Fig. 4).

## 고 찰

어류 정자의 액상보존에는 많은 종류의 희석액이 이용되어 왔다 (Chao et al., 1975; Hara et al., 1982; McNiven et al., 1993; Truscott et al., 1968). 감성돔 정자를 단기간 (10일) 동안 액상보존한 본 연구에서는 혈청이 가장 좋은 결과를 보였다. 이것은 milkfish, *Chanos chanos*의 정자를 0~4°C에서 보존하였을 때, milkfish의 혈청이 다른 희석액 (150 mM NaCl, 400 mM glucose, 생리식염수 및 소 혈청)들 보다 뛰어난 보존 효과를 보였다는 Hara et al. (1982)의 연구결과와 일치하는 것으로서, 같은 종의 혈청이 희석액으로 탁월한 효과를 가지고 있음을 입증하였다. 한편, McNiven et al. (1993)은 탄화플루오르와 같은 인공혈액 물질을 사용하여 정자의 생존능력과 수정능력을 높였다. 이처럼 액상보존을 위한 희석액으로 혈청

이나 인공 혈청이 좋은 결과를 보이는 것은 정자의 성분이 혈청에서 유래하며, 이들의 삼투질농도 및 pH가 서로 비슷하기 때문이라고 생각된다. 그러나 같은 종의 정자는 원심분리 과정에서 손상된 정자로 부터 방출된 단백질 분해효소가 포함되어 있기 때문에 보존을 위한 희석액으로는 부적합하다 (Saad et al., 1987).

감성돔 정자보존에서 희석액의 최적 pH는 감성돔 정액의 pH (8.3)와 비슷한 7~8로서 틸라피아의 정자가 pH 7~9 (Chao et al., 1987), *Epinephelus malabaricus*의 정자가 pH 7.5~8.0 (Chao et al., 1992)에서 운동성이 높게 나타난 결과와 일치하였다.

어류 정액의 채취시 배설물이나 환경수에 의한 박테리아 감염을 피하기 힘들기 때문에 액상보존에서 항생제 사용은 필수적인 과정이다 (Stoss and Refstie, 1983). 희석액에 항생제 첨가는 정자의 생존을 뿐만 아니라 수정률의 감소도 막아줌으로써 (Saad et al., 1987), 액상보존시 보존효과를 높일 수 있는 효과적인 방법이다. 그러나 Stoss et al. (1978)은 항생제가 박테리아의 증식을 억제시켰지만, 항생제의 농도가 증가하면 역효과를 낸다고 하여 적합한 농도의 항생제 사용이 중요함을 시사하였다. 또한, Chao et al. (1987)은 틸라피아 정자의 보존시 chloramphenicol, chlortetracycline 및 gentamicine에 비해 400~500 ppm의 neomycine sulphate에서 보존효과가 가장 좋게 나타났다고 하여, 항생제의 농도 뿐만 아니라 종류에 따라서도 보존효과에 차이가 있음을 강조하였다. 본 연구에서도 chlortetracycline, gentamicine 및 neomycine을 사용하였을 경우, chlortetracycline은 gentamicine과 neomycine에 비해 SAI와 정자의 생존율이 낮게 나타났다. 그리고 항생제의 첨가농도에 따라서도 정자의 생존율이 각기 다르게 나타남으로써 항생제 종류와 첨가농도가 종특이적임을 보였다. 따라서 앞으로 항생제 사용 기준에 대한 체계적인 연구와 함께 희석비율, 보존온도, 가스교환 등 세부적인 과정에 관한 연구도 이루어져야 할 것이다.

## 요 약

감성돔, *Acanthopagrus schlegeli* 정자의 단기보존을 위한 기초자료를 얻기 위하여, 순환여과사육 시스템에서 사육한 전장 25.9 ± 1.7 cm, 체중 292.8 ± 53.7 g의 성숙한 어미로부터 정액을 채집하여 정자의 액상보존 효과를 조사하였다.

희석액별 단기 액상보존 실험에서 혈청을 사용하였을 때 보존 10일후 정자의 SAI와 생존율은 각각 0.3, 55.6%

로 가장 좋았으며, 보존 7일후의 감성돔 알에 대한 수정률도 47.7%로 혈청이 가장 좋았다. 정자를 pH 7~8의 희석액에서 보존하였을 때 가장 높은 SAI를 보였으며, 정자의 생존율과 SAI를 높이기 위한 항생제로는 neomycine (800 ppm)이 효과적인것으로 나타났다.

## 참 고 문 헌

- Blom, E., 1950. A one-minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. *Fertil. Steril.*, 1, 176~177.
- Chao, N.H., W.C. Chao, K.C. Liu and I.C. Liao. 1987. The properties of tilapia sperm and its cryopreservation. *J. Fish Biol.*, 30, 107~118.
- 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.
- Erdahl, A.W. and E.F. Graham. 1987. Fertility of teleost semen as affected by dilution and storage in a seminal serum-mimicking medium. *Aquaculture*, 60, 311~321.
- Fribourgh, J. H. 1966. The application of a differential staining method to low-temperature studies on goldfish spermatozoa. *Prog. Fish-Cult.*, 28, 227~231.
- 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.
- 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.
- Saad, A., R. Billard, M.C. Theron and M.G. Hollebecq. 1987. 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. Biol. Anim. Biochem. Biophys.*, 18, 1077~1082.
- Stoss, J. and W. Holtz. 1983. Successful storage of chilled rainbow trout (*Salmo gairdneri*) spermatozoa for up to 34 days. *Aquaculture*, 31, 269~274.
- Stoss, J. and T. Refstie. 1983. Short-term storage and cryopreservation of milt from atlantic salmon and sea trout. *Aquaculture*, 30, 229~236.
- Strussmann, C.A., P. Renard, H. Ling and F. Takashima. 1994. Motility of pejerrey *Odontesthes bonariensis* spermatozoa. *Fish. Sci.*, 60, 9~13.
- 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.
- Zar, J.H. 1984. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall Inc. Englewood Cliffs, N.J., 620 pp.
- 鄭吉生·李在根·高光斗·尹昌鉉·邊明大·羅鎮洙·孫奉煥·金基龜. 1991. *家畜人工授精*. 鄉文社. 서울, 299 pp.

1996년 9월 14일 접수

1997년 3월 4일 수리