

묵납자루(*Acheilognathus signifer*) 정자의 냉동보존

정민환 · 민병화 · 박미선 · 명정인 · 임재현¹ · 임한규² · 황형규*

국립수산과학원 양식관리과, ¹국립수산과학원 내수면양식연구센터, ²목포대학교 해양수산자원학과

Cryopreservation of Common Korean Bitterling *Acheilognathus signifer* Sperm

Min Hwan Jeong, Byung Hwa Min, Mi Seon Park, Jeong-In Myeong,
Je Hyun Im¹, Han Kyu Lim² and Hyung-Kyu Hwang*

Aquaculture Management Division, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-902, Korea

¹Inland Aquaculture Research Center, National Fisheries Research & Development Institute, Changwon 645-806, Korea

²Development of Marine and Fisheries Resources, Mokpo National University, Muan 534-729, Korea

This study aimed to find an optimal diluent and cryoprotective agent (CPA) during cryopreservation of common Korean bitterling *Acheilognathus signifer* sperm. The bitterling is an endangered species in Korea, and this study will enable conservation and further technical development of artificial seed production. We tested the effects of cryopreservation and toxicity by the type of diluent and CPA. The optimal combination of diluent and CPA for cryopreservation was 300 mM glucose+10% methanol, resulting in a survival rate and sperm activity index (SAI) of 96.3±1.5%, and 3.0±0.0 respectively, and no significant difference compared to fresh sperm. The survival rate and SAI of post-thawed sperm was 9.7±1.5%, 0.8±0.3 respectively, which was significantly higher than had been achieved with other diluents and CPAs.

Key words : *Acheilognathus signifer*, Sperm, Cryopreservation, Cryoprotective agents

서론

묵납자루(*Acheilognathus signifer*)는 한국 고유어종으로 잉어과(Cyprinidae)의 납자루아과(Acheilognathinae)에 속하며, 한강 수계를 포함하여 그 이북지역인 임진강, 대동강, 압록강, 성천 및 회양 등에 분포 하는 것으로 보고되어 있다(Uchida, 1939). 묵납자루의 체색은 암녹색으로 등쪽이 짙고 배쪽은 연한 노란색을 띠고 있으며, 등지느러미와 뒷지느러미의 기부는 회갈색이지만 중앙부는 노란색의 넓은 띠가 현저하고 가장자리는 흑갈색을 띠고 있어 칼납자루(*Acheilognathus koreensis*)와 함께 담수관상어로서 가치가 매우 높은 어종이다. 그러나 묵납자루는 포획, 반출 및 유통 등이 야생동물보호법으로 금지되어 있는 멸종위기 야생동식물 2급으로(MEV, 2012), 일반인이 쉽게 취급할 수 없는 어종이다. 묵납자루의 서식지는 하천 중상류 지역에 바닥이 펄과 모래의 비율이 높고, 하천 변에 수초

가 무성한 정수역을 선호하며, 담수산 이매패류인 작은말조개(*Unio douglasiae sinuolatus*)에 산란하는 독특한 산란 특성을 가지고 있다(Beak and Song, 2005a, b). 이로 인해 잉어(*Cyprinus carpio*) 및 붕어(*Carassius carassius*)와 같은 일반 담수어류와 달리 채란-채정이 용이하지 못하다. 또한 채란-채정이 이루어졌다 하더라도 그 양이 매우 적어 인공종묘생산 기술개발 및 대량생산에 어려움이 있다. 따라서 한국 고유어종의 종 보존 및 담수관상어 시장 활성화를 위해서는 묵납자루의 증식·복원 연구 및 인공종묘 대량생산 기술개발이 필요하다.

어류 정자의 냉동보존에 관한 연구는 Blaxter (1953)가 청어(*Clupea pallasii*) 정자의 냉동보존을 성공적으로 이룬 이후, 유용 어류의 정자냉동보존에 관한 많은 연구결과가 보고되고 있다(Chang and Chang, 2002; Billard et al., 2004). 정자의 냉동보존 기술은 양식 종의 종묘생산에 있어 어미의 방란·방정 시기가 불일치하거나, 성비가 고르지 못할 때 발생하는 채란·채정의

Article history;

Received 25 October 2013; Revised 27 October 2013; Accepted 7 January 2014

*Corresponding author: Tel: +82. 51. 720. 2435 Fax: +82. 51. 720. 2439

E-mail address: hhk5166@hanmail.net

Kor J Fish Aquat Sci 47(1) 039-044, February 2014

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2014.0039>

pISSN:0374-8111, eISSN:2287-8815

© The Korean Society of Fisheries and Aquatic Science. All rights reserved

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.

비동시화 문제를 해결할 수 있으며, 수컷 어미의 사육관리에 소요되는 노력과 경비를 절약할 수 있다. 또한 우량 개체간의 선택 교배를 가능하게 하고, 멸종위기에 놓인 재래종의 보존을 간편하게 할 수 있는 장점을 가지고 있다(Chang et al., 1997; Choi et al., 2007). 그러나 어류의 정자냉동보존 시 냉동/해동 후 정자의 생존율 및 운동성을 유지하기 위하여 다양한 희석액, 결빙 억제제(cryoprotective agent, CPA), 평형시간, 냉동률 및 해동 온도 등에 대한 중별 최적조건을 탐색하여야 한다. 이중 희석액은 정자의 활성을 억제하여 냉동보존 전·후로 생존율과 운동성을 유지하게 하는 역할을 하고, CPA는 정자의 냉동/해동 시 병결정형성 및 동해를 억제하는 역할을 한다. 그러나 CPA는 독성이 있어 정자의 생존율 및 운동성을 감소시키므로, 어종별 적정 CPA를 탐색하는 것은 매우 중요하다.

본 연구에서는 한국의 고유어종이며 멸종위기 종인 묵납자루의 종 보존 및 인공증묘생산 기술개발을 위한 연구의 일환으로 묵납자루 정자의 냉동보존 시 적정 희석액 및 CPA를 알아보고자, 희석액 종류 및 CPA별 묵납자루 정자에 미치는 독성 및 냉동보존 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

실험에 사용한 묵납자루 정액은 국립수산물연구원 내수면연구센터에서 증식·보존을 위해 사육중인 전장 6.9 ± 3.0 cm, 체중 4.9 ± 0.5 g의 수컷 40마리로부터 채취하였다. 실험어로부터 정액을 채취하기 이전에 배설물에 의한 정액 오염을 방지하기 위하여 채정 24시간 전부터 절식시켰으며, 실험어를 100 ppm MS-222로 마취한 다음 복부를 부드럽게 압박하여 채정하였다.

채취한 정액 중 일부는 정액의 화학적 특성을 알아보기 위하여 원심분리(4℃, 12,000 rpm, 20분) 하였으며, 원심분리하여 얻은 정액은 분석 전까지 초저온 냉동고(-80℃)에 보관하였다. 정액의 Na⁺, K⁺, Cl⁻, Ca²⁺, Mg²⁺, glucose 및 total protein (TP) 농도는 건식임상화학자동분석장치(Fuji Dri-chem 3500i, Japan)를 이용하여 분석하였으며, pH와 삼투질농도는 각각 pH 측정기(DE/Docu-pH plus, Sartorius, USA)와 삼투질농도 측정기(Vapro 5520, WESCOR Co., USA)로 분석하였다.

희석액 종류 및 CPA별 묵납자루 정자의 독성평가와 냉동보존 효과를 비교하기 위하여 희석액으로 기존 잉어과 어류의 정

Table 2. Biochemical properties in seminal plasma of common Korean bitterling *Acheilognathus signifer* (n=10)

Component	Seminal plasma
Na ⁺ (mM/L)	83.6±3.0
K ⁺ (mM/L)	75.5±5.5
Cl ⁻ (mM/L)	32.3±2.1
Mg ²⁺ (mg/L)	5.9±2.0
Ca ²⁺ (mg/L)	4.1±1.2
Glucose (mg/L)	3.5±1.2
Total protein (g/L)	0.4±0.1
pH	7.2±0.1
Osmolality (mOsm/kg)	254.6±8.6

자냉동보존 연구에서 효과가 좋았던 Kurokura et al. (1984)의 잉어 인공정장(artificial seminal plasma, ASP; 0.44 g NaCl, 0.62 g KCl, 0.022 g CaCl₂, 0.008 g MgCl₂, 0.02 g NaHCO₃, DW 100 mL; pH 7.56±0.2, osmolality 276±2 mOsm/kg; 희석액 I)과 어류의 정자냉동보존에서 희석액으로 많이 쓰이는 300 mM glycerol (5.4048 g glycerol, 증류수 100 mL; pH 6.13±0.1, osmolality 312±2 mOsm/kg; 희석액 II)를 사용하였다. CPA는 어류의 정자냉동보존 연구에서 가장 많이 사용되는 dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol (EG), methanol 및 glycerol, 농도는 10%로 하였다. 희석액 종류 및 CPA별 묵납자루 정자에 미치는 독성을 평가하기 위하여 각각의 희석액과 CPA가 첨가된 용액에 정액을 100:1로 넣고 정자의 생존율 및 운동성을 측정하였다. 정자의 생존율은 광학현미경으로 각각 3회 반복 관찰하여 전체 정자수에 대한 살아있는 정자수의 비율로 생존율을 산정하였다. 정자의 운동성은 정자운동성 관찰용 slide glass (Teflon Printed Glass Slide; 21 wells; diameter of each well, 4 mm; Funakoshi Co., Japan) 위에 정액을 2 µL씩 분주하여 cover slide 없이 광학현미경으로 관찰하였다. 정자의 운동성은 Table 1의 운동지수에 따라 점수를 부여하고, 각각의 운동점수와 운동정자의 비율에 따라 Strüssmann et al. (1994)의 방법을 변형하여 정자활성지수(sperm activity index, SAI)로 나타내었다.

희석액 종류 및 CPA별로 묵납자루 정자의 냉동보존 효과를 비교하기 위하여 각각의 희석액과 CPA가 첨가된 용액에 정액을 20:1의 비율로 희석하여 3분간 평형시간을 준 다음, 0.25 mL straw에 봉입하였다. 이후 각 straw를 액체질소 증기(-76℃)로 3분간 1차 냉각 한 다음, 액체질소(-196℃)에 바로 넣어 급속 냉각하였다. 희석액 종류 및 CPA별로 냉동된 각각의 정액 straw를 액체질소에 보존 30일 후에 25℃의 항온수조에서 30초간 급속 해동한 다음 정자의 생존율 및 운동성을 측정·비교하였다.

모든 실험은 3반복으로 진행하였으며, 측정값은 평균±표준오차로 나타내었다. 유의차는 SPSS-통계패키지(version 12.0)

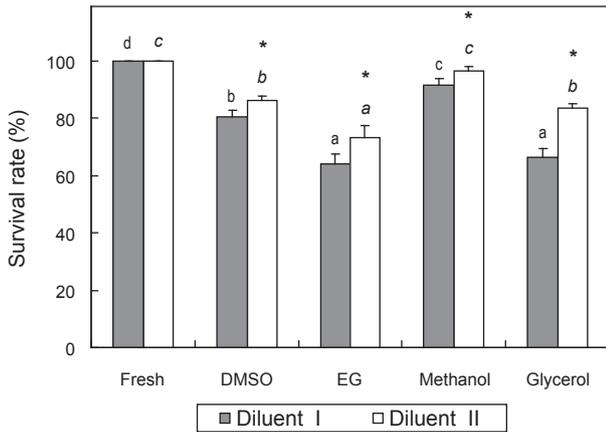


Fig. 1. Effects of diluents and cryoprotective agents (CPAs) on survival rate of fresh sperm of common Korean bitterling *Acheilognathus signifer*. Different small letters indicate significant differences between CPAs in each diluent ($P < 0.05$). Asterisk indicates significant differences between diluents in each CPAs ($P < 0.05$).

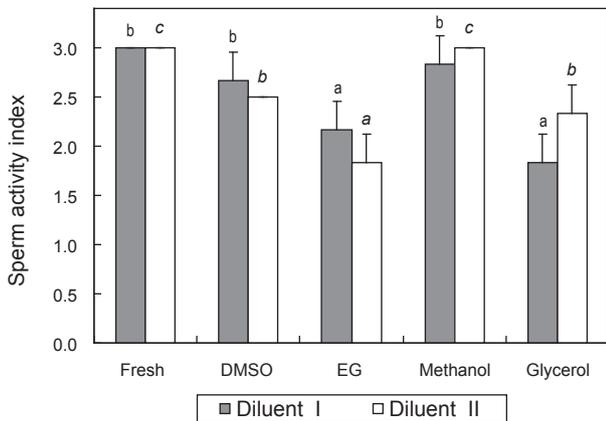


Fig. 2. Effects of diluents and cryoprotective agents (CPAs) on sperm activity index of fresh sperm of common Korean bitterling *Acheilognathus signifer*. Different small letters indicate significant differences between CPAs in each diluent ($P < 0.05$).

를 이용하여 Independent samples t-test와 one-way ANOVA-test로 검정하였으며, 집단간 다중비교는 Duncan's multiple range test에 의해 검증하였다($P < 0.05$).

결 과

정액특성

묵납자루 정액을 원심분리하여 얻은 정장의 화학적 특성은 Table 2에 나타내었다. 정장의 Na^+ , K^+ 및 Cl^- 농도는 각각

83.6 ± 3.0 , 75.5 ± 5.5 , 32.3 ± 2.1 mM/L, Mg^{2+} 및 Ca^{2+} 농도는 각각 5.9 ± 2.0 , 4.1 ± 1.2 mg/L로 나타났다. 정장의 glucose와 TP는 각각 3.5 ± 1.2 mg/L, 0.4 ± 0.1 g/L 이었으며, pH와 삼투질농도는 각각 7.2 ± 0.1 과 254.6 ± 8.6 mOsm/kg로 나타났다.

희석액 종류 및 CPA별 독성평가

희석액 종류 및 CPA별 독성이 묵납자루 정자의 생존율 및 운동성에 미치는 영향을 조사한 결과, Fig. 1과 2에 나타내었다.

CPA가 첨가되지 않은 희석액 I·II에 침지한 묵납자루 정자의 생존율과 SAI는 모두 100%, 3.0으로 Fresh 정자와 동일하였다. 희석액 I에 10%의 DMSO, EG, methanol 및 glycerol이 각각 첨가된 용액에 침지한 묵납자루 정자의 생존율은 각각 80.3 ± 2.5 , 64.0 ± 3.6 , 91.7 ± 2.1 및 $66.3 \pm 3.2\%$ 로 methanol에 침지한 묵납자루 정자의 생존율이 다른 CPA에 침지한 정자보다 유의하게 높았다($P < 0.05$). 희석액 II에 각각의 CPA를 첨가한 용액에 침지한 묵납자루 정자의 생존율은 각각 86.3 ± 1.5 , 73.3 ± 4.2 , 96.3 ± 1.5 및 $83.7 \pm 1.5\%$ 로 methanol에 침지한 묵납자루 정자의 생존율이 다른 CPA에 침지한 정자보다 유의하게 높았다($P < 0.05$) (Fig. 1). 희석액 I에 10%의 DMSO, EG, methanol 및 glycerol이 각각 첨가된 용액에 침지한 묵납자루 정자의 SAI는 각각 2.7 ± 0.3 , 2.2 ± 0.3 , 2.8 ± 0.3 및 1.8 ± 0.3 으로 methanol과 DMSO에 침지한 묵납자루 정자의 SAI가 EG나 glycerol보다 유의하게 높았다($P < 0.05$). 희석액 II에 각각의 CPA를 첨가한 용액에 침지한 묵납자루 정자의 SAI는 각각 2.5 ± 0.0 , 1.8 ± 0.3 , 3.0 ± 0.0 및 2.3 ± 0.3 으로 methanol에 침지한 묵납자루 정자의 SAI가 다른 CPA에 침지한 정자보다 유의하게 높았다($P < 0.05$) (Fig. 2). 각각의 CPA에서 희석액별 묵납자루 정자의 생존율은 희석액 I보다 희석액 II가 유의하게 높았다($P < 0.05$). 그러나 SAI는 유의한 차이를 보이지 않았다($P > 0.05$).

희석액 종류 및 CPA별 냉동보존 효과

희석액 종류 및 CPA별로 냉동보존 한 묵납자루 정자의 해동 후 생존율 및 운동성은 Fig. 3과 4에 나타내었다.

CPA가 첨가되지 않은 희석액 I·II에 침지한 묵납자루 정자의 냉동/해동 후 생존율과 SAI는 모두 0이었다. 희석액 I과 10%의 DMSO, EG, methanol 및 glycerol을 사용하여 냉동보존 한 묵납자루 정자의 해동 후 생존율은 각각 3.0 ± 1.0 , 1.0 ± 1.0 , 5.3 ± 1.5 및 $0.0 \pm 0.0\%$ 로 methanol을 사용하여 냉동보존 한 해동 정자의 생존율은 다른 CPA를 사용하여 냉동보존 한 해동 정자보다 유의하게 높았다($P < 0.05$). 희석액 II에 각각의 CPA를 첨가한 용액에 침지하여 냉동보존 한 묵납자루 정자의 해동 후 생존율은 각각 3.3 ± 0.6 , 2.0 ± 1.0 , 9.7 ± 1.5 및 $0.7 \pm 1.2\%$ 로 methanol을 사용하여 냉동보존 한 해동 정자의 생존율이 다른 CPA를 사용하여 냉동보존 한 해동 정자보다 유의하게 높았다($P < 0.05$) (Fig. 3). 희석액 I과 10%의 DMSO, EG, methanol 및 glycerol을 사용하여 각각 냉동보존 한 묵납

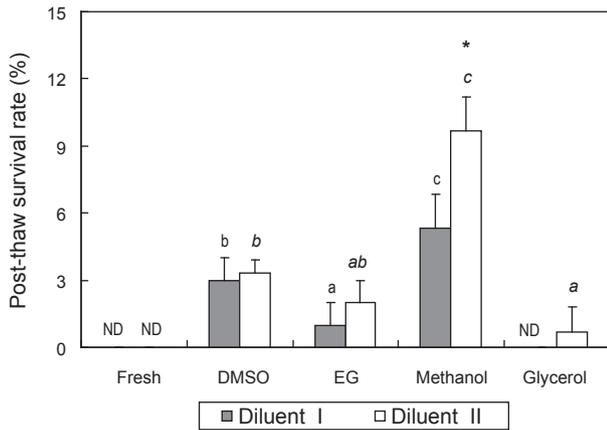


Fig. 3. Effects of diluents and cryoprotective agents (CPAs) on survival rate of post-thawed sperm of common Korean bitterling *Acheilognathus signifer*. Different small letters indicate significant differences between CPAs in each diluent ($P < 0.05$). Asterisk indicates significant differences between diluents in each CPAs ($P < 0.05$). ND: no date.

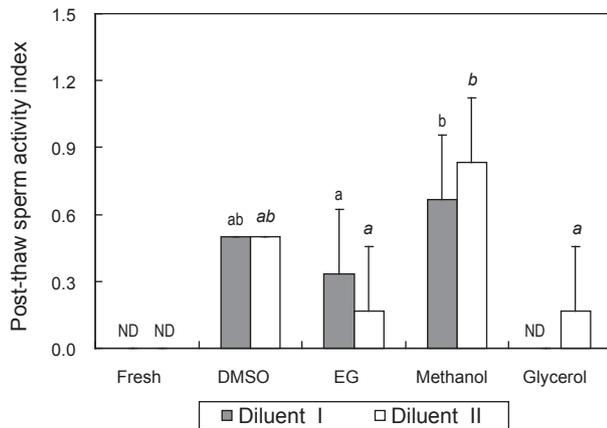


Fig. 4. Effects of diluents and cryoprotective agents (CPAs) on sperm activity index of post-thawed sperm of common Korean bitterling *Acheilognathus signifer*. Different small letters indicate significant differences between CPAs in each diluent ($P < 0.05$). ND: no date.

자루 정자의 해동 후 SAI는 각각 0.5 ± 0.0 , 0.3 ± 0.3 , 0.7 ± 0.3 및 0.0 ± 0.0 으로 methanol을 사용하여 냉동보존 한 해동 정자의 SAI가 유의하게 높았다($P < 0.05$). 희석액 II에 각각의 CPA를 첨가한 용액에 침지하여 냉동보존 한 묵납자루 정자의 해동 후 SAI는 각각 0.5 ± 0.0 , 0.2 ± 0.3 , 0.8 ± 0.3 및 0.2 ± 0.3 으로 methanol을 사용하여 냉동보존 한 해동 정자의 SAI가 유의하게 높았다($P < 0.05$) (Fig. 4). Methanol을 사용하여 냉동보존 한 정자의 해동 후 생존율은 희석액 I 보다 희석액 II를 사용하였을 때 유의하게 높았다($P < 0.05$). 그러나 SAI는 유의한 차이를 보이지 않았다($P > 0.05$).

고 찰

정자의 물리·화학적 특성에 관한 지식은 어류의 번식능력을 평가하거나 수정기구를 이해하는데 중요한 기준이 된다(De Kruger et al., 1984). 많은 연구자들의 보고에 의하면 해수어류의 정장 Na^+ 농도는 150-165 mM/L (Chang et al., 1997; Lim et al., 2007, Jeong et al., 2012), 담수어류의 정장 Na^+ 농도는 62-96 mM/L (Morisawa et al., 1983; Morisawa, 1985; Alavi et al., 2004)로 묵납자루의 정장 Na^+ 농도는 일반적인 담수어류의 정장 Na^+ 농도 범위에 속하였다. 이외에 K^+ , Cl^- , Mg^{2+} 및 Ca^{2+} 등 다른 이온의 농도 역시 일반적인 담수어류의 범위에 속하였다. 해수어류의 정장 삼투질농도는 강도다리(*Platichthys stellatus*)의 경우 337.0 mOsm/kg (Lim et al., 2007), 말뚝치(*Thamnaconus modestus*) 322.8 mOsm/kg (Le et al., 2007), 감성돔(*Acanthopagrus schlegelii*) 337.3 mOsm/kg (Jeong et al., 2012) 이었으며, 담수어류의 정장 삼투질농도의 경우 금붕어(*Carassius auratus*) 317 mOsm/kg, 잉어(*Cyprinus carpio*) 302 mOsm/kg (Morisawa et al., 1983; Morisawa, 1985), 페르시아 철갑상어(*Acipenser persicus*) 82.6 mOsm/kg (Alavi et al., 2004)로 해수어류 보다 담수어류의 삼투질농도가 낮았다. 본 연구에서 묵납자루 정장의 삼투질농도는 254.6 mOsm/kg로 전형적인 담수어류 정장의 삼투질농도 범위에 속하였다.

정자의 냉동보존 효과에 영향을 미치는 주된 요인으로는 희석액, CPA, 평형시간, 냉동률 및 해동온도 등이 있으며, 이 중 희석액은 정자의 냉동보존 과정에서 첫 번째로 확인해야 할 항목이다. 일반적으로 수산동물의 정자는 체내에서 체외로 방출되면 수분에서 수심분 내에 운동성을 상실하게 되는데, 희석액은 정자의 활성을 억제하여 냉동보존 전·후로 생존율과 운동성을 유지하는 역할을 한다(Ohta and Izawa, 1996). 그러나 종마다 적정 희석액의 종류와 농도가 달라 인공정장(artificial seminal plasma, ASP), glucose, Ringer's solution, MFRS (marine fish Ringer's solution), sucrose 등 여러 가지 희석액을 농도를 달리하여 사용하고 있다. CPA는 정자의 냉동보존 시 가장 중요한 요소로 세포내 삼투질농도와 빙결정형성 등을 완화·조절하는 역할을 한다(Jamison, 1991). 따라서 CPA는 중성물질이어야 하며, 친수성이 강하고, 세포막에 대한 투과성이 높고, 세포에 대한 독성이 적어야 한다(Kuwano and Saga, 2000). 그러나 각 어종의 정자는 CPA의 종류에 따라 종 특이성을 보이기 때문에 모든 어류에서 공통적으로 사용할 수 있는 CPA는 아직 밝혀진 바 없으며, CPA가 세포 냉동시 세포를 보호하는 자세한 기구에 관해서도 아직 알려지지 않고 있다(Kho, 2007). 따라서 어류 정자의 냉동보존 시 적정 CPA 종류 및 농도를 찾는 것은 매우 중요하다.

본 연구에서 희석액 종류 및 CPA별 독성이 묵납자루 정자의 생존율 및 운동성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 독성을 평가한 결과, methanol에 노출시킨 묵납자루 정자의 생존율 및 운

동성은 대조구와 큰 차이를 보이지 않았다. 따라서 methanol의 독성은 묵납자루 정자에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다. 그러나 EG와 glycerol에 노출시킨 묵납자루 정자는 대조구에 비해 생존율과 운동성이 유의하게 감소하여, 이들의 독성은 묵납자루의 정자에 영향을 미치는 것으로 판단된다. 또한 본 연구에서 희석액 I (영어 ASP) 보다 희석액 II (300 mM glucose)에 첨가한 CPA의 독성이 유의하게 낮았다. Gwo et al. (1991)은 정자의 냉동보존을 위한 희석액으로는 sodium chloride, glucose 및 sucrose와 같은 간단한 조성의 희석액이 유리하다고 하였고, Chang et al. (1997)은 당질이 포함된 희석액은 정자 세포막의 인지질을 안정시켜 보존효과를 높인다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서 사용한 희석액 II는 정자의 활성을 억제시키는 역할뿐만 아니라, CPA의 독성으로부터 정자를 보호한 것으로 추정된다.

많은 연구자들은 어류의 정자냉동보존 시 DMSO가 다른 CPA 보다 냉동보존 효과가 좋은 것으로 보고하였다(Cierieszko and Dabrowski, 1993; Lim et al., 2007; Jeong et al., 2012). 그러나 CPA는 종 특이적인 경향이 강하기 때문에 모든 어류에서 획일적으로 사용될 수 있는 CPA는 아직 구명되지 않았다. 본 연구에서 묵납자루 정자의 냉동보존 시 DMSO는 EG나 glycerol 보다 냉동보존 효과가 좋았다. 그러나 methanol을 사용하여 냉동보존 한 묵납자루 정자의 해동 후 생존율 및 SAI는 DMSO 보다 유의하게 높게 나타나, methanol이 묵납자루 정자의 냉동보존 시 적정 CPA로 판단된다. 묵납자루와 비슷한 갈납자루 정자를 냉동보존 한 Ohta et al. (2001)의 연구에서도 10% methanol을 사용하였을 때 다른 CPA 보다 해동 정자의 운동성이 높았다고 보고하였다. 이 외에도 산천어 (*Oncorhynchus masou masou*) 및 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*)와 같은 담수어종의 정자냉동보존 연구에서도 methanol은 다른 CPA 보다 냉동보존 효과가 좋았다(Lahnsteiner et al., 2002; Lim et al., 2008).

Lim et al. (2008)은 어종별 적정 CPA는 동일한 종이라 할지라도 CPA와 희석액의 조합 또는 냉동방법에 따라 달라질 수 있다고 하였다. 따라서 적정 CPA 선택을 위해서는 CPA의 효과에 영향을 미치는 여러 가지 요인들을 종합적으로 검토하여야 한다. 본 연구에서 묵납자루 정자의 냉동보존 시 희석액은 300 mM glucose, CPA는 10% methanol을 사용하였을 때 가장 좋은 냉동보존 효과를 나타내었다. 그러나 본 연구에서 사용한 냉동보존 조건 및 방법이 최적이라고 판단하기에는 여러 가지 변수가 많다. 따라서 묵납자루 정자의 냉동보존 시 적정 희석액, CPA, 평형시간, 냉동률 및 해동온도 등 여러 가지 요인에 대한 보다 세부적인 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 국립수산과학원 수산시험연구과제인 수산생물 종 보존 및 복원 연구 기술 개발(과제번호: RP-2014-AQ-001)의

연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

References

- Alavi SMH, Cosson J, Karami M, Mojazi Amiri B and Akhondzadeh MA. 2004. Spermatozoa motility in the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*: effects of pH, dilution rate, ions and osmolality. *Reproduction* 128, 819-828. <http://dx.doi.org/10.1530/rep.1.00244>.
- Baek HM and Song HB. 2005a. Habitat selection and environmental characters of *Acheilognathus signifer*. *Korean J Limnol* 38, 352-360.
- Baek HM and Song HB. 2005b. Spawning in mussel and adaptation strategy of *Acheilognathus signifer* (Cyprinidae: Acheilognathinae). *Korean J Ichthyol* 17, 105-111.
- Billard R, Cosson J, Noveiri SB and Pourkazemi M. 2004. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. *Aquaculture* 236, 1-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.10.029>.
- Blaxter JHS. 1953. Sperm storage and cross fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature* 172, 1189-1190.
- Chang YJ and Chang YJ. 2002. Milt properties of four flatfish species and fine structure of their cryopreserved spermatozoa. *J Fish Sci Tech* 5, 87-96.
- Chang YJ, Chang YJ and Lim HK. 1997. Cryopreservation of tiger puffer (*Takifugu rubripes*) sperm. *Dev Reprod* 1, 29-36.
- Choi HY, Jo PG, Kim TI, Bai SC and Chang YJ. 2007. The effects of cryopreservation on fine structures of pearl oyster (*Pinctada fucata martensii*) larvae. *Dev Reprod* 11, 79-84.
- Cierieszko A and Dabrowski K. 1993. Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique. *Aquaculture* 109, 367-373.
- De Kruger JC, Smit GL, Van Vuren JHJ and 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 and Connie R. 1991. Cryopreservation of atlantic croaker spermatozoa. *Aquaculture* 94, 355-375.
- 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, U.S.A., xiv 319.
- Jeong MH, Lim HK, Do YH, Kim JH, Son MH and Chang YJ. 2012. Assessment of sperm activity of black porgy acclimated in freshwater on cryopreservation condition. *Dev Reprod* 16, 77-85.
- Kho KH. 2007. Effects of cryoprotectants and diluents on cryopreservation of the red seabream, *Pagrus major* sperm. *Ko-*

- rean J Ichthyol 19, 173-177.
- Kurokura H, Hirano R, Tomita M and Iwahashi M. 1984. Cryopreservation of carp sperm. *Aquaculture* 37, 267-273.
- Kuwano K and 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., 23-40.
- Lahnsteiner F, Mansour N and 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 and Chang YJ. 2007. Milt properties and spermatozoa structure of filefish *Thamnaco-nus modestus*. *Dev Reprod* 11, 227-233.
- Lim HK, An CM, Noh GA and 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 and Lee SM. 2008. Effects of diluents and cryoprotectants on sperm cryopreservation of masou salmon, *Oncorhynchus masou masou*. *J Korean Fish Soc* 41, 267-271.
- MEV. 2012. Designation of endangered wildlife I, II. In: Environmental statistics yearbook 2012. Korea ministry of environment. 550-556. <http://library.me.go.kr/search/DetailView.ax?cid=5527962>.
- Morisawa M. 1985. Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleosts. *Zool Sci* 2, 605-615.
- Morisawa M, Suzuki K, Shimizu H, Morisawa S and Yasuda K. 1983. Effects of osmolarity and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. *J Exp Biol* 107, 95-103.
- Ohta H and Izawa T. 1996. Diluent for cool storage of Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. *Aquaculture* 142, 107-118.
- Ohta H, Kawamura K, Unuma T and Takegoshi Y. 2001. Cryopreservation of the sperm of the Japanese bitterling. *J Fish Biol* 58, 670-681. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8649.2001.tb00521.x>.
- Strüssmann CA, Renard P, Ling H and Takashima F. 1994. Motility of pejerrey *Odontesthes bonariensis* spermatozoa. *Fish Sci* 60, 9-13.
- Uchida K. 1939. The fishes of Tyosen (Korea). Part I. Nematognathi and eventognathi. *Bull Fish Exp Sat Gov Gener Tyosen* 6, 458.