



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

수 산 학 석 사 학 위 논 문

CASA system을 이용한 뱀장어 정자의
활성 평가



2020년 8월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 물 학 과

김 한 식

수 산 학 석 사 학 위 논 문

CASA system을 이용한 뱀장어 정자의
활성 평가

지도교수 최 윤 희

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함.

2020년 8월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 물 학 과

김 한 식

김한식의 수산학석사 학위논문을 인준함.

2020년 8월 28일



위원장

이 학 박사

김 종 명



위원

수 산 학 박 사

김 신 권



위원

수 산 학 박 사

최 윤 희



Evaluation of sperm quality in *Anguilla japonica* using computer-assisted sperm analysis (CASA) system

HanSik Kim

Department of Fisheries Biology, The Graduated School,
Pukyong National University

Abstract

Anguilla japonica is an important eel species in the aquaculture industry of Asia, especially in Korea. However, techniques for the industrialization are still not completed all over the world. Healthy gametes, including egg and sperm, are essential to accomplish the stable seed production in any aquaculture systems that involves evaluation of the healthy gametes with suitable parameters and improvement of the quality. In this study, the factors to evaluate the quality of eel sperm were investigated using CASA system, and try to provide effective formula for artificial seminal plasma by regulation of inorganic composition.

Sperm samples were first divided into four groups, (A) 0-10%, (B) 10-40%, (C) 40-70%, and (D) 0-100%, based on motility and progressive. In the observation of sperm velocity variations, curve motion velocity which is VCL showed significantly highest values in all groups, moreover the relative

correlations with progressive and the velocity factors revealed strong as positive relations. The directional factor, BCF which is beat cross frequency was lower in higher activation groups showing opposite correlation with sperm activity. And the highest VCL and lowest BCF values were 207.1 $\mu\text{m/s}$ and 43.35 Hz, respectively. The head sizes of spermatozoa in high activity groups were significantly bigger than lower active groups. Although several minerals showed significant variations with the changes of sperm activity, the Na^+ and K ions were assumed important to be principal inorganic elements of seminal plasma in this species. Furthermore, the regulation of the elements in artificial seminal plasma presented effective formula improved than the existing composition, exhibiting composition of Na 120 mM and K 40 mM when preserve the sperm for a short time, and Na 120 mM and K 30 mM for long time. The results of this study establish the indicators for evaluation of eel sperm quality, moreover suggests novel compositions for the artificial seminal plasma which is probably useful to produce the healthy seeds for aquaculture industry.

목 차

| | |
|---|----|
| 요약(Abstract) | I |
| 표 목차(List of tables) | V |
| 그림 목차(List of figures) | VI |
| | |
| I. 서론 | 1 |
| | |
| II. 재료 및 방법 | 4 |
| 1. 친어 관리 및 배정 유도 | 4 |
| 2. 채정 및 정장액 분리 | 5 |
| 3. CASA system을 이용한 뱀장어 정자의 활성 분석 | 6 |
| 가. 활성인자 분석 | 6 |
| 나. 정자의 활성별 형태학적 분석 | 10 |
| 다. 활성별 정장액의 무기원소 조성 분석 | 11 |
| 4. 뱀장어 인공정장액 조성별 정자의 활성변화 분석 | 12 |
| 가. 주요 무기원소 조성별 인공정장액 제작 | 12 |
| 나. 무기원소 조성에 따른 정자활성 변화 분석 | 16 |
| 5. 통계처리 | 17 |
| | |
| III. 결 과 | 18 |
| 1. CASA system에 활용한 뱀장어 정자의 활성 평가 | 18 |

| | |
|-------------------------------------|----|
| 가. 운동속력 변화 | 18 |
| 나. 방향인자 변화 | 22 |
| 다. 정자 두부 형태의 변화 | 24 |
| 라. 무기원소 조성의 변화 | 29 |
| 2. 인공정장액내 무기원소 조성에 따른 정자활성 변화 | 31 |
| 가. 칼슘 조성 조절에 따른 활성 변화 | 31 |
| 나. 마그네슘 조성 조절에 따른 활성 변화 | 33 |
| 다. 나트륨 조성 조절에 따른 활성 변화 | 35 |
| 라. 칼륨 조성 조절에 따른 활성 변화 | 37 |
| | |
| IV. 고찰 | 39 |
| | |
| 요약 | 45 |
| | |
| 감사의 글 | 47 |
| | |
| 참고문헌 | 48 |

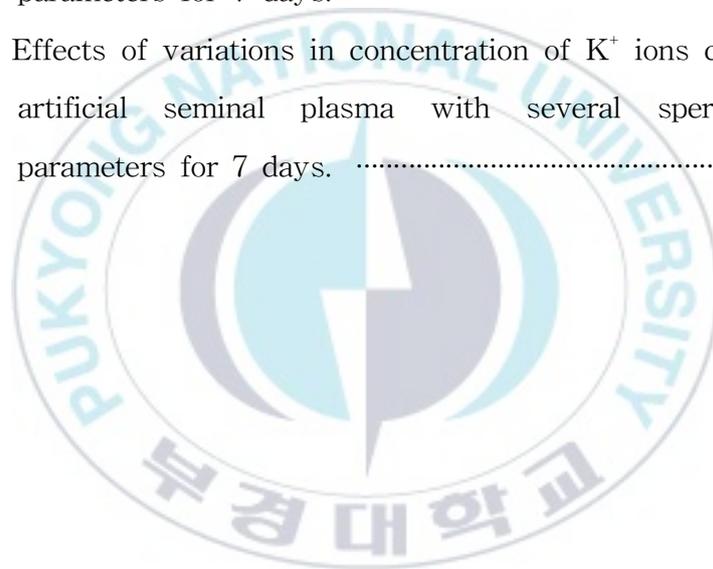
표 목 차

| | |
|---|----|
| Table 1. Software setup information for CASA system. | 9 |
| Table 2. Regulation of Ca^{2+} in formula for eel's artificial seminal plasma. | 13 |
| Table 3. Regulation of Mg^{2+} in formula for eel's artificial seminal plasma. | 13 |
| Table 4. Regulation of Na^{+} in formula for eel's artificial seminal plasma. | 14 |
| Table 5. Regulation of K^{+} in formula for eel's artificial seminal plasma. | 15 |
| Table 6. Relative correlations with several sperm velocity factors and sperm activity groups. Motile and progressive groups classified as follows, (A) 0-10%, (B) 10-40%, (C) 40-70%, (D) 70-100%. | 21 |
| Table 7. Comparisons of sperm directional factors (ALH: amplitude of lateral head displacement, BCF: beat cross frequency, LIN: linearity, STR: straightness) with motile and progressive groups divided into (A) 0-10%, (B) 10-40%, (C) 40-70% and (D) 70-100%. | 23 |
| Table 8. Ionic composition in seminal plasma of <i>Anguilla japonica</i> evaluated with motile (Mot) activity groups following, (A) 0-10%, (B) 10-40%, (C) 40-70% and (D) 70-100%. | 30 |

그림 목 차

| | |
|--|----|
| Figure 1. Illustration of spermatozoa trajectory computed by CASA system. | 7 |
| Figure 2. Observation of eel sperm activity under CASA system. Sperm motility : (A) 0-10%, (B) 10-40%, (C) 40-70%, (D) 70-100%. | 8 |
| Figure 3. Comparisons of sperm velocity factors (VAP: average path velocity, VSL: straight line velocity, VCL: curvilinear velocity) with motile and progressive groups divided into (A) 0-10%, (B) 10-40%, (C) 40-70% and (D) 70-100%. | 20 |
| Figure 4. Comparisons of spermatozoa head height with motile and progressive groups divided into (A) 0-10%, (B) 10-40%, (C) 40-70% and (D) 70-100%. | 25 |
| Figure 5. Comparisons of spermatozoa head width with motile and progressive groups divided into (A) 0-10%, (B) 10-40%, (C) 40-70% and (D) 70-100%. | 26 |
| Figure 6. Comparisons of spermatozoa head perimeter with motile and progressive groups divided into (A) 0-10%, (B) 10-40%, (C) 40-70% and (D) 70-100%. | 27 |
| Figure 7. Comparisons of spermatozoa head area with motile and progressive groups divided into (A) 0-10%, (B) 10-40%, (C) 40-70% and (D) 70-100%. | 28 |
| Figure 8. Effects of variations in concentration of Ca^{2+} ions composed in | |

| | |
|---|----|
| artificial seminal plasma with several sperm activity parameters for 7 days. | 32 |
| Figure 9. Effects of variations in concentration of Mg ²⁺ ions composed in artificial seminal plasma with several sperm activity parameters for 7 days. | 34 |
| Figure 10. Effects of variations in concentration of Na ⁺ ions composed in artificial seminal plasma with several sperm activity parameters for 7 days. | 36 |
| Figure 11. Effects of variations in concentration of K ⁺ ions composed in artificial seminal plasma with several sperm activity parameters for 7 days. | 38 |



I. 서론

어류의 양식생산 또는 종 보존 및 관리를 위하여 인공적으로 수정란을 생산하는 기술은 매우 중요하며, 현재에 이르기까지 다양하게 발전해 왔다. 인공수정란 생산을 위해서는 자성 배우자(Gamete)인 난과 음성 배우자인 정자가 필수적이며, 각 배우자의 건강도가 수정 및 부화의 성공률을 결정짓는 핵심 요소이다. 하지만 지금까지 다양한 관점과 수법으로 어류의 난질을 향상시키기 위한 연구들이 진행되고 있는 반면, 정자의 질을 평가하고 향상시키는 것에 초점을 맞춘 연구들은 부족한 실정이다(Rurangwa et al., 2004).

어류 정자의 평가에 있어 운동 활성 관찰은 가장 일반적으로 사용되어지고 있는 방법이며(Mylonas et al., 2017), 활성의 정도는 정자의 생존능력, 형태, 수정능력과 밀접한 관계를 가지고 있는 것으로 알려져 있다(Lahnsteiner et al., 1996; Verstegen et al., 2002; Rurangwa et al., 2004; Bozkhurt et al., 2008). 초기에는 현미경을 통해 사람의 시각으로 0-5 단계의 기준으로 정자의 활동성을 구분하였으나(Guest et al., 1976; Le et al., 2007; Jeong and Chang, 2011; Jeong et al., 2014), 이는 관찰자의 주관에 따라 약 30-60%의 오차를 보이며 큰 변동성을 나타내 재현성 있는 분석이 어려웠다(Verstegen et al., 2002; Rurangwa et al., 2004). 이러한 문제를 보완하기 위해 1979년에 Dott and Foster가 CASA (Computer-assisted sperm analysis) system을 개발하여 정자의 운동경로를 컴퓨터상에서 이미지화 후 다양한 활성인자를 관측·분석하는 기법을 내놓았다. 이러한 CASA system을 활용하여 객관적이고, 신뢰할 수 있으며, 빠르고 정확한 분석이

가능하게 되었고, 현재는 인간을 포함한 포유류, 조류 등에서 다양하게 활용되고 있으나 어류에서의 활용 예는 여전히 미비한 실정이다(Iguerouada and Versteegen, 2001; Klimowicz et al., 2008; Nagy et al., 2015).

경골어류의 정액(Semen)은 정자(Spermatozoa)와 정장액(Seminal plasma)으로 구성되어 있으며, 정장액에는 지방산, 단백질, 무기원소 등이 함유되어 중요한 역할을 한다. 그 중 무기원소는 정자의 활성화·억제와 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있어(Morisawa, 2008), 경골어류의 정장액 내 무기원소 조성은 정자의 활성화 평가에 이용되고 있다. 하지만 다양한 수중환경에 적응하여 진화한 어류들은 종에 따라 다양한 무기원소 조성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다(Morisawa, 1983; Le et al., 2007; Jeong and Chang, 2011). 각 무기원소들이 어떻게 정자의 활성화에 영향을 미치는지에 대한 명확한 메커니즘은 밝혀지지 않았지만, 해수어의 정자는 고삼투압 조건에서 내부의 칼륨의 농도가 증가하게 되면서 정자의 활성을 유발한다고 보고된바 있으며(Takai and Morisawa, 1995; Miura et al., 2013; Jeong et al., 2014), Asturiano et al. (2004)는 정장액의 칼륨 농도가 높아질수록, 칼슘과 마그네슘의 농도는 감소할수록 활성이 증가한다고 하였다. 즉, 어류 정장액내 무기원소의 조성을 조절하는 것에 따라 정자의 활성화 제어가 가능하다는 것이 나타나 인위적으로 정장액을 제작, 활용하는 기술이 현장에서 활용되었다. 인공정장액은 수정 전까지 정자의 활성을 억제시키며, 생존능력과 형태를 유지하면서 보존가능하다는 이점이 있다(Ohta and Izawa, 1996). 이에 따라 단기간의 보존에 한하여 정자의 동결과 해동 등의 복잡한 과정이 없이 인공수정에 간편하게 사용되어져왔다. 포유동물인 돼지의 경우 수정에 필요한 대부분의 정자를 인공수정센터에서 인공정장액에 희석하여 단기보존액과 장기보존액로 분류하여 시판하고 있으며(Sa et al., 2011), 어류에서도 무지개송어 *Oncorhynchus mykiss*, 브라운송어 *Salmo trutta*

macrostigma, 잉어 *Cyprinus carpio* 등에서 인공정장액이 사용되고 있다 (Kobayashi et al., 2004; Bozkurt et al., 2011; Cejko et al., 2018). 뱀장어에서는 Ohta and Izawa (1996)가 인공정장액 조성에 관한 연구를 통해 인공종자생산 기술 개선에 기여한 바 있으나, 정자의 활성이 빠르게 저하되고 보존성이 유지되지 않는 등 개선의 여지가 있다.

뱀장어는 종 특유의 생태·생리적 특성을 가지고 있어 다른 양식어류에서 적용 가능한 수온, 광주기 조절 등의 사육환경제어로 인공 성 성숙 유도가 어려운 대상이다(Kagawa et al., 1998). 암컷 뱀장어는 SPE (Salmon pituitary extract)를 반복 투여하여 배란을 유도하고, 수컷뱀장어는 인간의 태반용모성호르몬(hCG)을 반복 투여하여 배정을 유도한다(Yamamoto et al., 1972; Miura et al., 1991; Ohta et al., 1996). 그러나 이러한 방법으로 얻어지는 배우자들(Gametes)의 품질(Quality)은 여전히 낮은 수준에 있고, 그 평가 기준 또한 명확하지 않다. 한편, 뱀장어 난질을 개선하기 위하여 친어의 건강도 및 영양상태, 성숙유도방법의 개선 등의 연구가 국립수산물학원에서 수행되어지고 있으며 이를 통해 인위적으로 수정란을 생산하고 있으나, 정자의 질을 평가하는 명확한 기준이 제시되어있지 않고 인공 채란과 채정이 동시에 이루어지지 않을 경우가 많아 장시간 정자를 보존해야 하는 등 적절한 활용에 어려움이 있다.

따라서 본 연구에서는 최신의 CASA system을 사용하여 1) 뱀장어 정자의 운동 속력인자, 방향인자 및 형태특성 등을 분석하여 본 종의 정자 품질을 평가할 수 있는 기준을 마련하고자 하였으며, 이를 활용하여 2) 정자의 활성화에 큰 영향을 미치는 정장액 내 무기원소 조성을 활성별로 비교 분석, 조절하여 효율적인 정장액 조성을 새로이 제시하는 것으로 뱀장어 인공수정란 생산기술의 개선을 도모하였다.

II. 재료 및 방법

1. 친어 관리 및 배정유도

실험어는 2019년에 전라남도 영광에 소재한 뱀장어 위판장에서 구입하여 국립수산물과학원 진해 내수면연구센터의 담수수조에 수용, 관리한 개체를 사용하였다. 일정기간 컨디션을 회복한 개체는 국립수산물과학원 본원(부산) 양식관리과로 이송하여 해수에서 1일간 5 ppt로 점진적으로 순치시킨 후 완전해수로 순치되었을 때 인공적으로 성 성숙을 유도하였다. 정자의 활성 분석에 사용한 실험어는 성숙유도 개시 시 평균체중 213.4 ± 9.7 g ($n=29$) 이었고, 인공정장액 조성분석에 사용한 실험어는 성숙유도 개시 시 평균체중 226.3 ± 4.9 g ($n=30$)이었다. 실험어는 500 L FRP 수조에 수용하여 성숙유도 시 사육수온 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 를 유지해 줬으며, 암실조건으로 성숙기간 동안 먹이는 공급하지 않았다.

각 실험어는 개체식별을 위해 동물주입형 microchip (Taechang industrial co., Korea)을 등 근육에 삽입한 후, hand reader (RT160, Covis., Korea)로 각 개체를 식별하여 성숙 및 채정기간 동안 추적·관리하였다. 배정유도를 위하여 hCG (10000 IU, Daesung microbiological labs co., Korea)를 eel's ringer solution (150 mM NaCl, 3.0 mM KCl, 3.5 mM MgCl_2 , 5.0 mM CaCl_2 , 10 mM HEPES, pH 7.4) 10 mL에 용해하여 1000 IU/mL의 농도로 준비하였다. 실험개체는 호르몬 투여 전 2-phenoxyethanol (Sigma Co., USA) 300 ppm 농도의 해수에 마취시켜 포비돈액(GUMI pharma Co., Korea)으로 복강을 소독한 후, hCG 1 IU/g BW의 농도로 복강 내 주사하였다.

2. 채정 및 정장액 분리

호르몬 투여 8주 이후 생식공으로부터 배정이 확인된 개체를 이용하여 채정을 실시하였다. 우선 2-phenoxyethanol (Sigma Co., USA) 300 ppm 농도의 해수에 마취시킨 후, 부드러운 천을 이용하여 생식공과 배뇨공 주위의 해수 및 분비물을 제거하여 오염원 유입에 의한 정자활성 저하를 방지하였다. 채정 시 복부를 부드럽게 압박한 후에 1 mL 주사기를 이용하여 생식공에서 직접 채정을 실시하였으며, 채정된 정액은 즉시 활성분석에 사용하였다.

정액은 활성 분석 후 고속원심분리기를 이용하여 4℃에서 7000 × *g*로 10분간 원심분리하여 상층액을 취한 후, 분리된 상층액을 4℃에서 4000 × *g*로 10분간 원심분리하여 상층의 정장액을 분리하였다. 분리된 정장액은 구성요소 분석 전까지 -80℃에서 보관하였다.

3. CASA system을 이용한 뱀장어 정자의 활성 분석

가. 활성인자 분석

정자의 활성 분석에는 CASA system (IVOS-II, Hamilton throne, USA)을 이용하였다. 채정된 정액은 2 μ L를 덜어 1 mL의 활성유도제(450 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7.5, Ohta and Izawa, 1996)에 500배 비율로 희석하여 정자의 활성을 유도하였다. 활성이 유도된 정자는 2 μ L를 20 μ m 깊이의 정자관찰용 slide (Leja, USA)에 넣어 15초 이내에 총 5장을 촬영하여 활성을 분석하였으며, 각 3번 반복 측정하여 평균값을 이용하였다.

CASA system으로 관측된 활성인자 중 Mot (motility, %), Prog (progressive motility, %), VAP (average path velocity, μ m/s), VSL (straight line velocity, μ m/s), VCL (curvilinear velocity, μ m/s), ALH (amplitude of lateral head displacement, μ m), LIN (linearity VSL/VCL, %), STR (straightness VSL/VAP, %), BCF (beat cross frequency, Hz)를 주요 평가인자로서 사용하였다(Fig. 1). 우선 각 정액 시료는 일반적으로 사용되어지는 활성 표지인자인 Mot 및 Prog 값을 기준으로 (A) 0-10%, (B) 10-40%, (C) 40-70%, (D) 70-100%의 4그룹의 분류하여 VAP, VSL, VCL, ALH, LIN, STR, BCF 값과의 상관성을 분석하였다(Fig. 2).

CASA system에서 활용한 소프트웨어의 설정은 Table 1에 나타내었다.

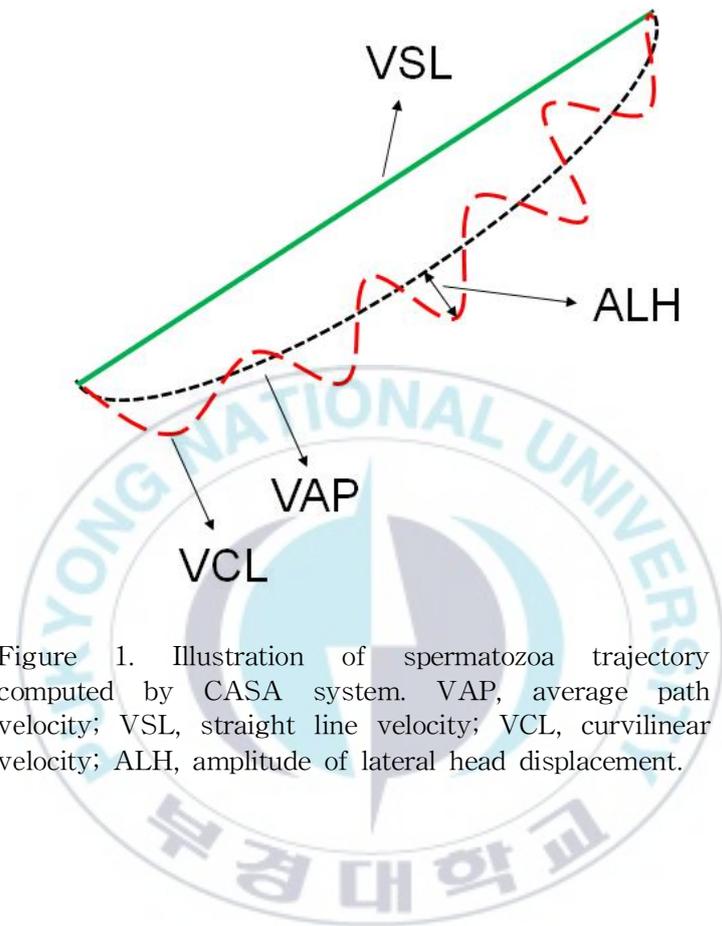


Figure 1. Illustration of spermatozoa trajectory computed by CASA system. VAP, average path velocity; VSL, straight line velocity; VCL, curvilinear velocity; ALH, amplitude of lateral head displacement.

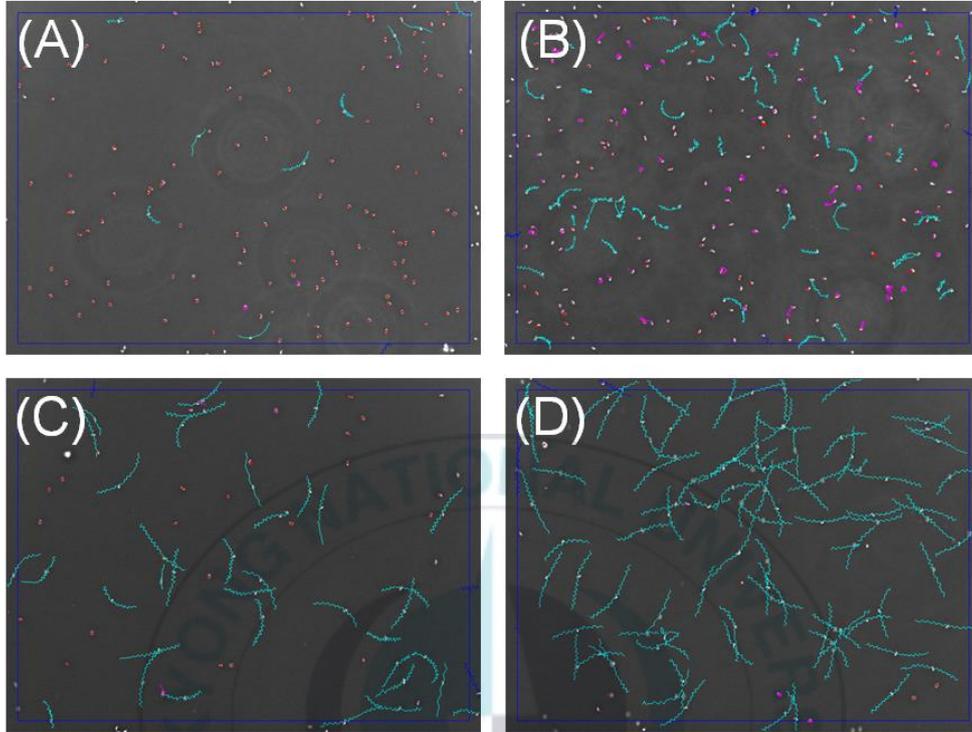


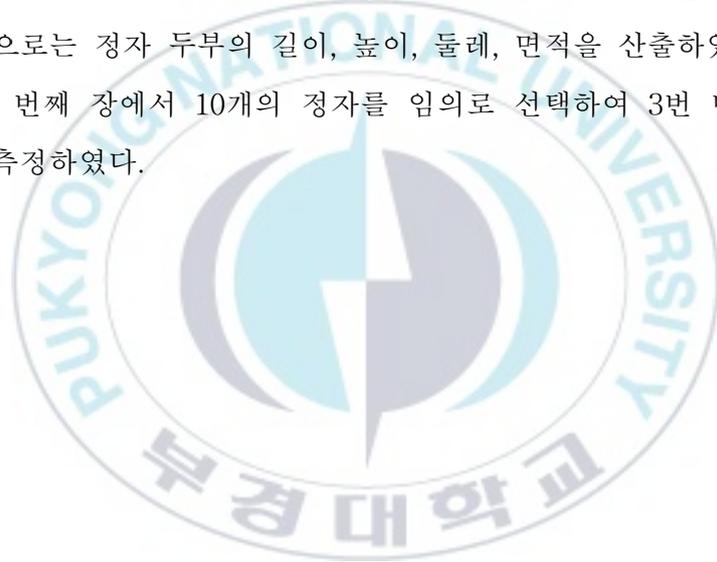
Figure 2. Observation of eel sperm activity under CASA system. Sperm motility : (A) 0-10%, (B) 10-40%, (C) 40-70%, (D) 70-100%. Status : Green(progressive), Purple(slow), Red(static) spermatozoon.

Table 1. Software setup information for CASA system.

| | |
|------------------------------|--------------------|
| Capture speed | 60 Hz |
| Intensity visible | 2337 |
| Progressive STR | 45 % |
| Progressive VAP | 45 $\mu\text{m/s}$ |
| Slow VAP | 20 $\mu\text{m/s}$ |
| Slow VSL | 30 $\mu\text{m/s}$ |
| Static VAP | 4 $\mu\text{m/s}$ |
| Static VSL | 1 $\mu\text{m/s}$ |
| DMR droplet to tail end max | 5 μm |
| DMR tali length max | 5 μm |
| Droplet proximal head length | 20 μm |
| Elongation max | 100 % |
| elongation min | 1 % |
| Head size max | 40 μm^2 |
| Head size min | 3 μm^2 |

나. 정자의 활성별 형태학적 분석

뱀장어 정자의 형태학적 분석은 CASA system으로 촬영된 프레임을 바탕으로 진행하였다. 각 시료는 Mot 및 Prog 활성도를 기준으로 (A) 0-10%, (B) 10-40%, (C) 40-70%, (D) 70-100%의 4그룹으로 분류하여 활성별 형태학적 차이를 비교하였다. 또한, 각 프레임의 정자들을 정적인 (Static) 개체들 및 활동적인 (Motile) 개체들로 분류하여 그룹간 (Inter) 뿐만 아니라 그룹내 (Intra)에 있어서도 활성에 따른 형태적 차이를 관찰하였다. 측정 항목으로는 정자 두부의 길이, 높이, 둘레, 면적을 산출하였고, 촬영한 5장 중 첫 번째 장에서 10개의 정자를 임의로 선택하여 3번 반복으로 총 30개체를 측정하였다.



다. 활성별 정장액의 무기원소 조성 분석

뱀장어 정자의 활성별로 정장액을 조성하는 무기원소 함량의 비교 분석을 위하여 Mot 값을 기준으로 (A) 0-10%, (B) 10-40%, (C) 40-70%, (D) 70-100% 4그룹으로 분류하여 시료를 수집하였다. 분류된 정장액의 무기원소 분석은 원자흡광분석기(Atomic absorption spectrometry) Novaa 300 (Analytikjena, Germany)을 이용하였다. 나트륨함량 분석을 위하여 정장액 1 μ L를 10 mL의 DW에 희석하여 1:10000의 비율로 분석을 진행하였고, 이외의 무기원소(칼륨, 칼슘, 마그네슘, 구리, 철, 아연)는 정장액 10 μ L를 10 mL의 DW에 희석하여 1:1000의 비율로 분석하였다. 각 원소의 표준시료(standard)는 시판되고 있는 나트륨(AANA1, inorganic ventures, USA), 칼륨(AAK1, inorganic ventures, USA), 칼슘(AACA1, inorganic ventures, USA), 마그네슘(AAMG1, inorganic ventures, USA), 구리(AACU1, inorganic ventures, USA), 철(AAFE1, inorganic ventures, USA), 아연(AAZN1, inorganic ventures, USA)을 이용하였다. 검출 한계선에 따라 마그네슘, 칼슘, 구리, 철, 아연은 0.1, 0.5, 1.0 ppm을 기준으로 분석을 진행하였고, 나트륨, 칼륨은 0.5, 1.0, 1.5 ppm 기준으로 분석하였다. 분석 파장은 마그네슘 285.2 nm, 칼슘 422.7 nm, 나트륨 589.0 nm, 칼륨 766.5 nm, 구리 324.8 nm, 철 248.3 nm, 아연 213.9 nm이었다.

4. 뱀장어 인공정장액 조성별 정자의 활성변화 분석

가. 주요 무기원소 조성별 인공정장액 제작

Ohta et al.(1997)가 보고한 기존의 뱀장어 인공정장액 조성(NaCl 149.3 mM, KCl 15.2 mM, MgCl₂ 1.6 mM, CaCl₂ 1.3 mM, NaHCO₃ 20 mM, pH 8.2)을 바탕으로, 본 연구에서 얻어진 활성별 무기원소 조성 분석결과를 대입하여 주요 무기원소들의 농도조절에 따른 정자의 활성변화를 분석하였다. 뱀장어 인공정장액내 주요 무기원소인 나트륨과 칼륨, 칼슘, 마그네슘의 조성비를 다음의 표와 같이 조절하여 그 효과를 관찰하였다(Tables 1-4).

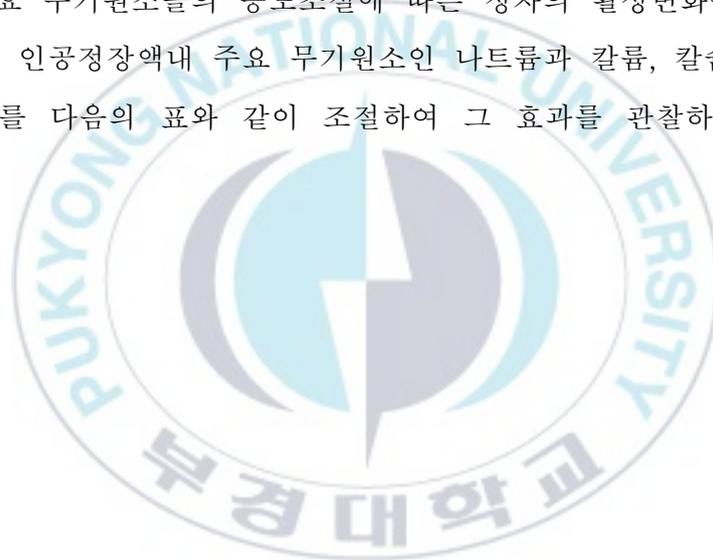


Table 2. Regulation of Ca²⁺ in formula for eel's artificial seminal plasma.

| Group | Ion composition | pH |
|-------|---|-----|
| 0 mM | NaCl 149.3 mM, KCl 15.2 mM, MgCl ₂ 1.6 mM, CaCl₂ 0 mM , NaHCO ₃ 20 mM | 8.2 |
| 2 mM | NaCl 149.3 mM, KCl 15.2 mM, MgCl ₂ 1.6 mM, CaCl₂ 2 mM , NaHCO ₃ 20 mM | 8.2 |
| 4 mM | NaCl 149.3 mM, KCl 15.2 mM, MgCl ₂ 1.6 mM, CaCl₂ 4 mM , NaHCO ₃ 20 mM | 8.2 |

Table 3. Regulation of Mg²⁺ in formula for eel's artificial seminal plasma.

| Group | Ion composition | pH |
|-------|---|-----|
| 0 mM | NaCl 149.3 mM, KCl 15.2 mM, MgCl₂ 0 mM , CaCl ₂ 1.3 mM, NaHCO ₃ 20 mM | 8.2 |
| 2 mM | NaCl 149.3 mM, KCl 15.2 mM, MgCl₂ 2 mM , CaCl ₂ 1.3 mM, NaHCO ₃ 20 mM | 8.2 |
| 4 mM | NaCl 149.3 mM, KCl 15.2 mM, MgCl₂ 4 mM , CaCl ₂ 1.3 mM, NaHCO ₃ 20 mM | 8.2 |

Table 4. Regulation of Na⁺ in formula for eel's artificial seminal plasma.

| Group | Ion composition | pH |
|--------|--|-----|
| 120 mM | NaCl 120 mM , KCl 18.2 mM, MgCl ₂ 1 mM, CaCl ₂ 1 mM, NaHCO ₃ 20 mM | 8.2 |
| 130 mM | NaCl 130 mM , KCl 18.2 mM, MgCl ₂ 1 mM, CaCl ₂ 1 mM, NaHCO ₃ 20 mM | 8.2 |
| 140 mM | NaCl 140 mM , KCl 18.2 mM, MgCl ₂ 1 mM, CaCl ₂ 1 mM, NaHCO ₃ 20 mM | 8.2 |
| 150 mM | NaCl 150 mM , KCl 18.2 mM, MgCl ₂ 1 mM, CaCl ₂ 1 mM, NaHCO ₃ 20 mM | 8.2 |

Table 5. Regulation of K⁺ in formula for eel's artificial seminal plasma.

| Group | Ion composition | pH |
|-------|--|-----|
| 10 mM | NaCl 120 mM, KCl 10 mM , MgCl ₂ 1 mM, CaCl ₂ 1 mM, NaHCO ₃ 20 mM | 8.2 |
| 20 mM | NaCl 120 mM, KCl 20 mM , MgCl ₂ 1 mM, CaCl ₂ 1 mM, NaHCO ₃ 20 mM | 8.2 |
| 30 mM | NaCl 120 mM, KCl 30 mM , MgCl ₂ 1 mM, CaCl ₂ 1 mM, NaHCO ₃ 20 mM | 8.2 |
| 40 mM | NaCl 120 mM, KCl 40 mM , MgCl ₂ 1 mM, CaCl ₂ 1 mM, NaHCO ₃ 20 mM | 8.2 |

나. 무기원소 조성에 따른 정자활성 변화 분석

각 무기원소의 조성별 활성변화 분석을 위하여 제작된 인공정장액 9.8 mL에 채취한 정액 200 μ L를 1:50의 비율로 희석시킨 후 4 $^{\circ}$ C 냉장고에 보존하였다. 보존 후 0, 1, 3, 5, 7일간 동일한 시간에 CASA system (IVOS-II)을 이용하여 분석을 진행하였다. 분석 시 인공정장액 50 μ L를 450 μ L의 활성유도제(450 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7.5, Ohta and Izawa, 1996)에 1:10 비율로 희석하여 정자의 활성을 유도하였다. 활성 유도된 정자는 상술한 바와 같이 20 μ m의 측정용 slide (Leja, USA)를 이용하여 15초 이내에 총 5장의 프레임을 촬영한 후 분석하였으며, 각 3 반복 측정하여 평균값을 이용하였다. 측정 항목과 분석을 위한 system 설정은 상기와 동일하다.

5. 통계처리

측정값은 평균±표준오차로 나타냈으며, 유의성 확인을 위하여 SPSS software ver. 18.0 (SPSS inc., USA)를 이용하여 One-way ANOVA test를 실시하였다. 등분산성 검정을 위해 Levene test를 실시한 후, 등분산이 가정되었을 때 Tukey HSD로 사후검정을 실시하였고, 등분산이 가정되지 않았을 때 Dunnett T3로 사후검정하였다($p < 0.05$).



Ⅲ. 결 과

1. CASA system을 활용한 뱀장어 정자의 활성 평가

가. 운동속력 변화

정자의 활성평가 인자 중 뱀장어 정자의 운동속력을 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. Mot 기준으로 활성이 낮은 A와 B 그룹의 VAP는 $42.8 \pm 6.1 \mu\text{m/s}$, VSL은 $30.8 \pm 5.3 \mu\text{m/s}$, VCL은 $104.0 \pm 14.1 \mu\text{m/s}$ 의 속력을 나타냈다. 활성이 높은 C와 D 그룹에서는 VAP $75.2 \pm 3.3 \mu\text{m/s}$, VSL $59.8 \pm 3.4 \mu\text{m/s}$, VCL $166.1 \pm 3.0 \mu\text{m/s}$ 로 나타났다. Prog 기준으로 활성이 낮은 A와 B 그룹의 VAP는 $52.6 \pm 9.1 \mu\text{m/s}$, VSL $39.6 \pm 7.9 \mu\text{m/s}$, VCL $126.6 \pm 11.4 \mu\text{m/s}$ 였으며, 활성이 높은 C와 D 그룹에서는 VAP $120.3 \pm 2.5 \mu\text{m/s}$, VSL $104.9 \pm 3.0 \mu\text{m/s}$, VCL $190.8 \pm 2.8 \mu\text{m/s}$ 로 Mot와 Prog 기준으로 분류한 그룹 모두 활성이 증가함에 따라 운동속력(VAP, VSL, VCL)도 증가하는 경향을 나타냈다. 또한, 높은 활성도로 분류된 C그룹과 D 그룹이 모든 관찰항목에서 유의하게 높은 값을 보였으며($p < 0.05$), Mot과 Prog 기준 모두 모든 그룹에서 VCL이 가장 높은 속력을 나타냈다. 관측된 운동성 인자인 Mot와 Prog의 활성별 속력을 비교하였을 때 Mot 기준의 그룹보다 Prog를 기준으로 분류한 그룹이 전체적으로 높게 나타났다.

Mot와 Prog 값으로 분류되어진 각 활성 그룹들과 운동속력 인자들과의 상관관계를 측정한 결과는 Table 6과 같다. Mot 기준에서는 활성이 가장 낮았던 A 그룹과 가장 높았던 D 그룹에서 각 속력인자들과 양의 상관관계

가 확인되었고, 중간 활성그룹인 B와 C는 VCL을 제외하고는 모두 음의 상관관계를 나타내었다. 반면, Prog의 기준에서는 C 그룹의 VCL를 제외한 모든 그룹에서 속력인자들과 양의 상관관계가 확인되었다.



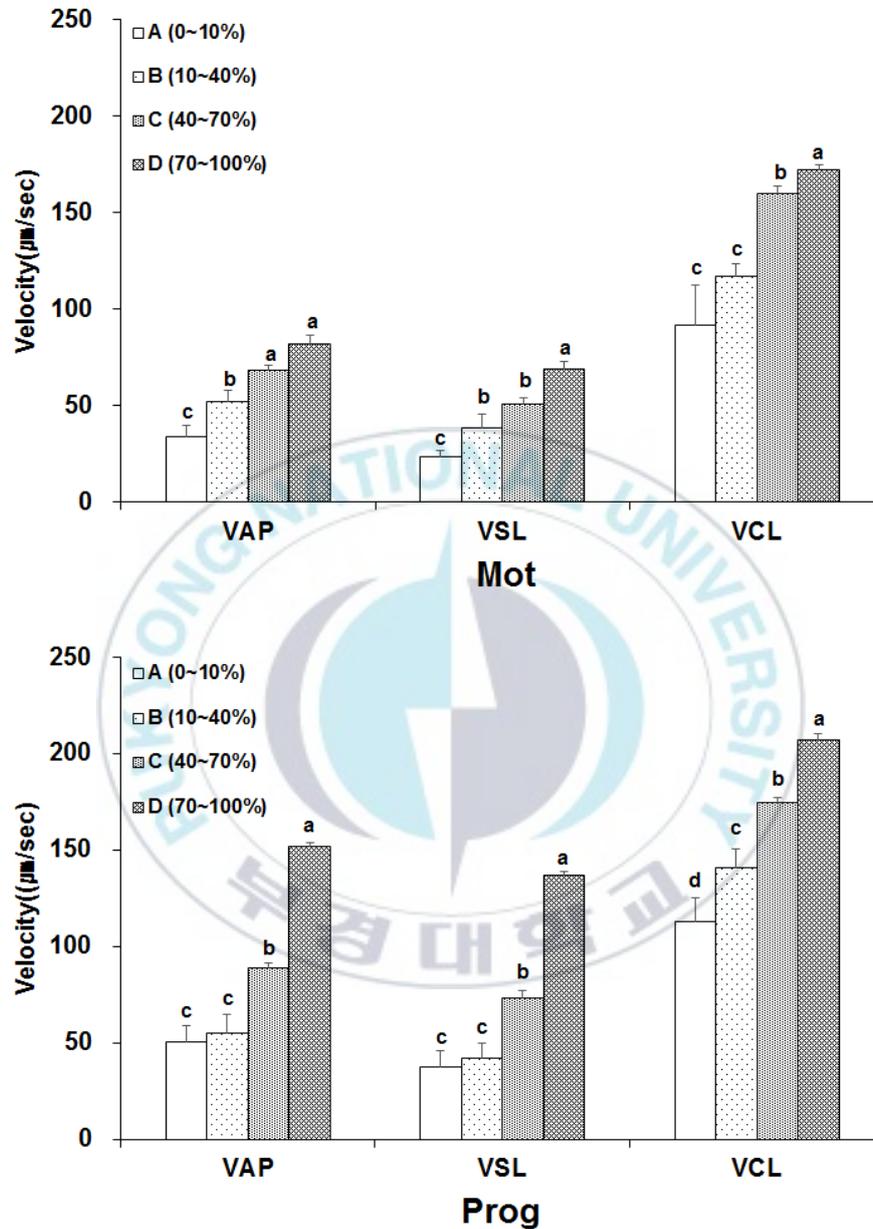


Figure 3. Comparisons of sperm velocity factors (VAP: average path velocity, VSL: straight line velocity, VCL: curvilinear velocity) with motile and progressive groups divided into (A) 0-10%, (B) 10-40%, (C) 40-70% and (D) 70-100%. Data are expressed as mean±SEM. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

Table 6. Relative correlations with several sperm velocity factors and sperm activity groups. Motile and progressive groups classified as follows, (A) 0-10%, (B) 10-40%, (C) 40-70%, (D) 70-100%. E : Equilibrium, + : positive, - : negative.

| | Mot | | | | Prog | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|----|-----|
| | A | B | C | D | A | B | C | D |
| VAP | +++ | --- | -- | +++ | ++ | +++ | ++ | +++ |
| VSL | ++ | --- | -- | +++ | ++ | +++ | ++ | ++ |
| VCL | +++ | -- | +++ | +++ | +++ | +++ | E | ++ |

나. 방향인자 변화

정자활성 분석의 방향성 인자인 ALH, BCF, LIN, STR를 측정된 결과는 Table 7에 나타났다. Mot 운동성 기준 그룹에서 ALH 값은 활성이 높아질수록 유의하게 증가하였으나($p < 0.05$), BCF 및 LIN, STR 값은 모든 그룹에서 유의한 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$). Prog 운동성 기준 그룹에서 ALH 값은 활성이 낮은 A그룹에서 $4.2 \pm 0.3 \mu\text{m}$ 로 가장 낮았고, 활성이 높은 D그룹에서 $5.4 \pm 0.1 \mu\text{m}$ 로 가장 높은 값을 나타내 활성이 높아질수록 유의하게 증가하는 경향을 보였다($p < 0.05$). LIN와 STR은 활성이 높은 D그룹에서 $64.4 \pm 0.8\%$, $87.3 \pm 0.4\%$ 로 가장 높게 나타났으며, ALH와 동일하게 활성이 높을수록 유의하게 증가하는 경향을 나타냈다($p < 0.05$). 반면, BCF는 활성이 높은 D그룹에서 $43.4 \pm 0.7 \text{ Hz}$ 로 유의하게 가장 낮은 값을 나타내($p < 0.05$), 다른 방향성 인자들과 반대 경향의 변화를 보였다.

Table 7. Comparisons of sperm directional factors (ALH: amplitude of lateral head displacement, BCF: beat cross frequency, LIN: linearity, STR: straightness) with motile and progressive groups divided into (A) 0-10%, (B) 10-40%, (C) 40-70% and (D) 70-100%. Data are expressed as mean±SEM. Different letters indicate significant differences ($p<0.05$).

| | Mot | | | | Prog | | | |
|---------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | A | B | C | D | A | B | C | D |
| ALH(μ m) | 4.03±0.27 ^c | 4.25±0.22 ^c | 5.07±0.09 ^b | 5.44±0.14 ^a | 4.15±0.32 ^c | 4.87±0.18 ^{bc} | 5.22±0.06 ^{ab} | 5.40±0.07 ^a |
| BCF(Hz) | 67.3±11.85 ^a | 54.88±5.16 ^a | 73.20±9.05 ^a | 56.19±3.73 ^a | 55.12±6.41 ^a | 64.44±5.11 ^a | 55.60±4.20 ^a | 43.35±0.74 ^b |
| LIN(%) | 39.68±4.31 ^a | 40.42±4 ^a | 34.86±2.18 ^a | 41.96±3.30 ^a | 41.06±3.97 ^b | 35.30±1.92 ^b | 44.51±2.88 ^b | 64.36±0.79 ^a |
| STR(%) | 67.96±3.44 ^a | 69.89±3.32 ^a | 66.4±2.69 ^a | 71.84±1.75 ^a | 70.37±2.19 ^d | 67.34±2.41 ^{bd} | 75.53±1.82 ^{cd} | 87.31±0.43 ^a |

다. 정자 두부 형태의 변화

정자의 형태를 측정한 결과는 각 항목에 따라 Figs. 4-7에서 나타냈다. Mot 운동성 그룹에서는 두부의 높이는 static 정자가 $3.95 \pm 0.13 \mu\text{m}$, motile 정자가 $4.27 \pm 0.16 \mu\text{m}$ 이었으며, 폭은 static 정자가 $2.55 \pm 0.05 \mu\text{m}$, motile 정자가 $2.70 \pm 0.09 \mu\text{m}$ 로 motile 정자가 높게 나타났다. 이와 같이 둘레는 static 정자가 $11.19 \pm 0.23 \mu\text{m}$, motile 정자가 $12.11 \pm 0.40 \mu\text{m}$ 이었으며, 면적은 static 정자가 $7.34 \pm 0.31 \mu\text{m}^2$, motile 정자가 $8.53 \pm 0.55 \mu\text{m}^2$ 로 motile 정자가 static 정자보다 높이, 폭, 둘레, 넓이 모두 유의하게 높은 값을 나타내었다($p < 0.05$).

Prog 운동성 그룹에서는 활성이 낮은 A그룹과 B그룹의 static 정자의 두부 높이는 $3.77 \pm 0.09 \mu\text{m}$, 폭은 $2.51 \pm 0.05 \mu\text{m}$, 둘레는 $10.94 \pm 0.20 \mu\text{m}$, 넓이는 $7.11 \pm 0.26 \mu\text{m}^2$ 으로 나타났으며, motile 정자의 두부 높이는 $4.37 \pm 0.13 \mu\text{m}$, 폭은 $2.70 \pm 0.08 \mu\text{m}$, 둘레는 $12.29 \pm 0.33 \mu\text{m}$, 넓이는 $8.64 \pm 0.47 \mu\text{m}^2$ 로 Mot 운동성 기준과 동일하게 motile 정자에서 높은 값이 확인되었다. 활성이 높은 C그룹과 D그룹에서도 static 정자의 높이는 $3.93 \pm 0.12 \mu\text{m}$, 폭 $2.60 \pm 0.12 \mu\text{m}$, 둘레 $11.34 \pm 0.36 \mu\text{m}$, 넓이 $7.69 \pm 0.57 \mu\text{m}^2$ 으로 나타났으며, motile 정자의 두부 높이 $4.57 \pm 0.19 \mu\text{m}$, 폭 $2.90 \pm 0.10 \mu\text{m}$, 둘레 $12.83 \pm 0.60 \mu\text{m}$, 넓이 $9.62 \pm 0.90 \mu\text{m}^2$ 로 static 정자보다 모두 유의하게 높은 값을 나타내었다($p < 0.05$). motile 정자가 static 정자보다 높이, 폭, 둘레 넓이의 형태적 특성에서 모두 유의하게 높은 값을 나타냈으며($p < 0.05$), 활성이 높아질수록 정자 두부의 크기가 증가하는 것을 알 수 있었다.

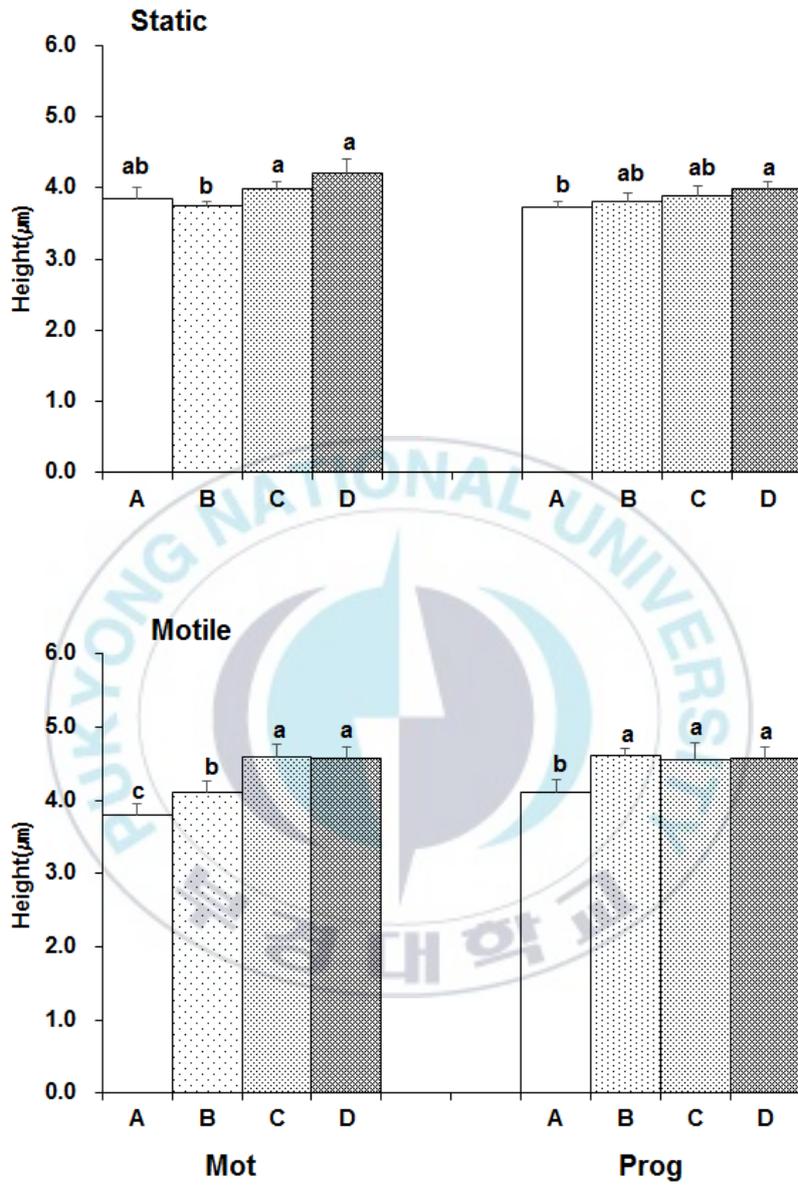


Figure 4. Comparisons of spermatozoa head height with motile and progressive groups divided into (A) 0-10%, (B) 10-40%, (C) 40-70% and (D) 70-100%. Data are expressed as mean±SEM. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

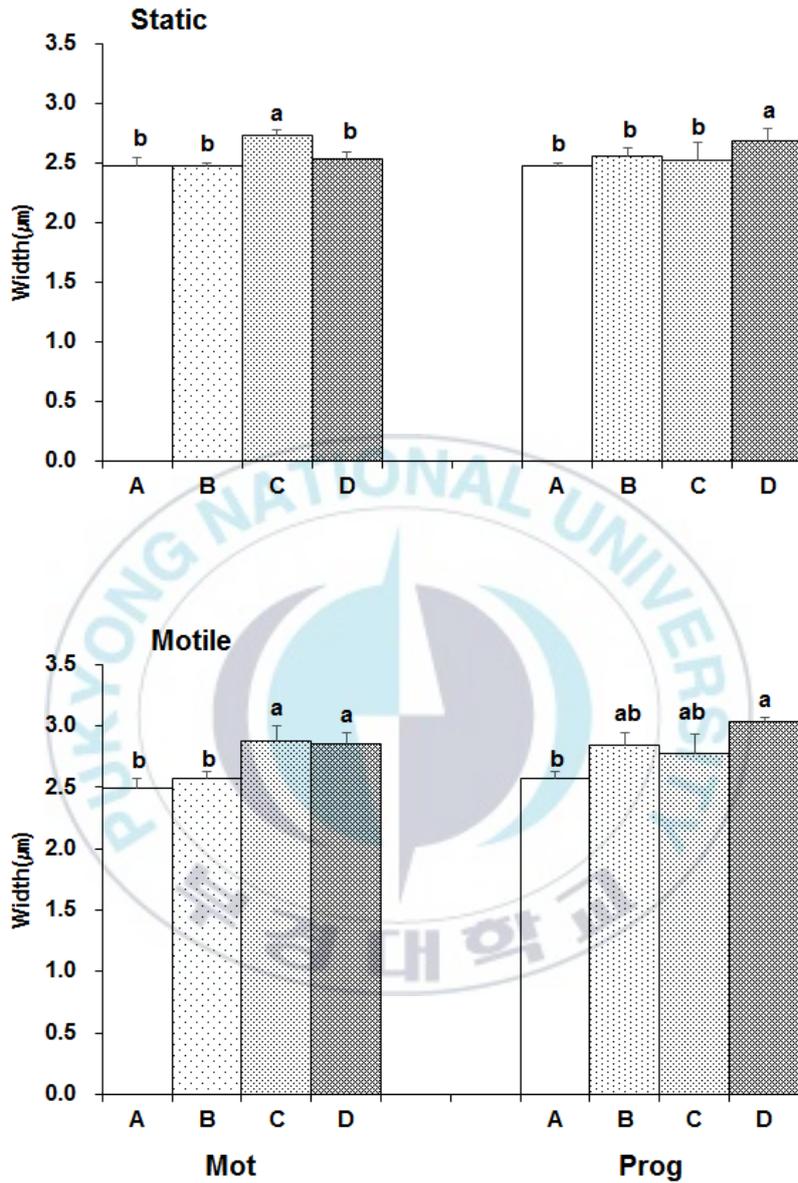


Figure 5. Comparisons of spermatozoa head width with motile and progressive groups divided into (A) 0-10%, (B) 10-40%, (C) 40-70% and (D) 70-100%. Data are expressed as mean±SEM. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

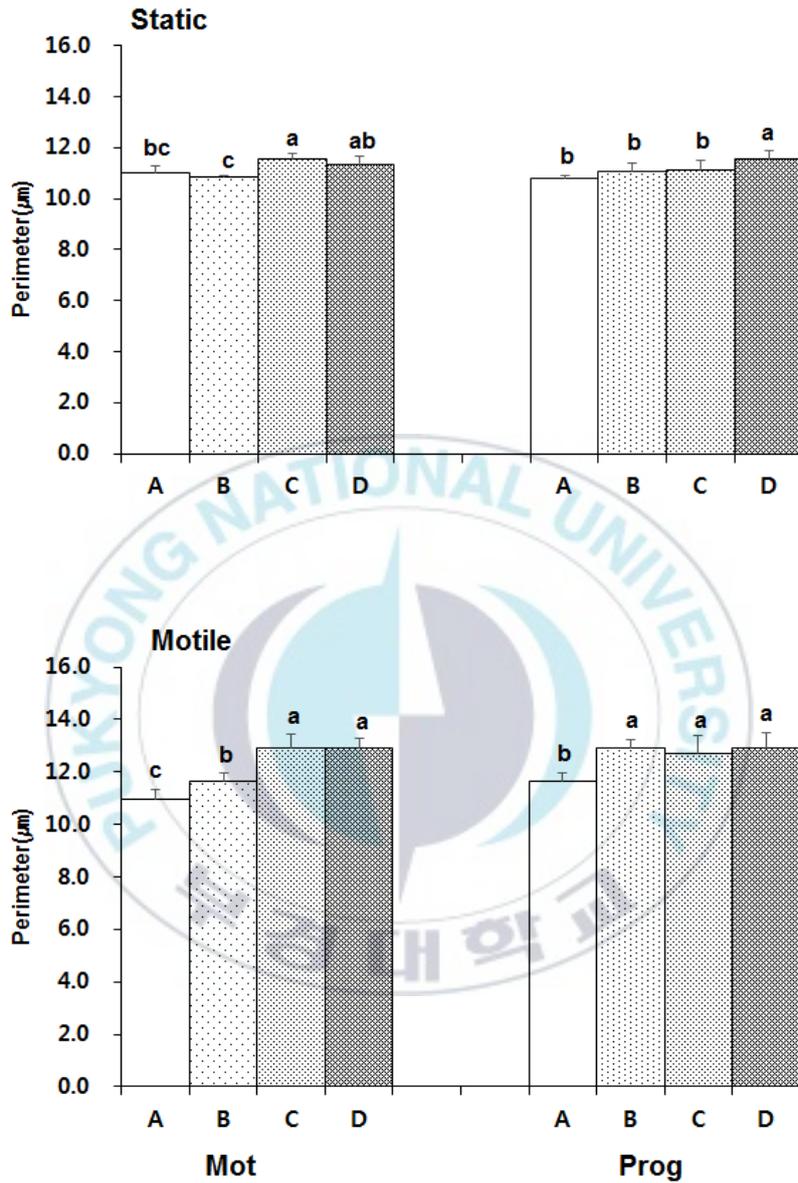


Figure 6. Comparisons of spermatozoa head perimeter with motile and progressive groups divided into (A) 0-10%, (B) 10-40%, (C) 40-70% and (D) 70-100%. Data are expressed as mean±SEM. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

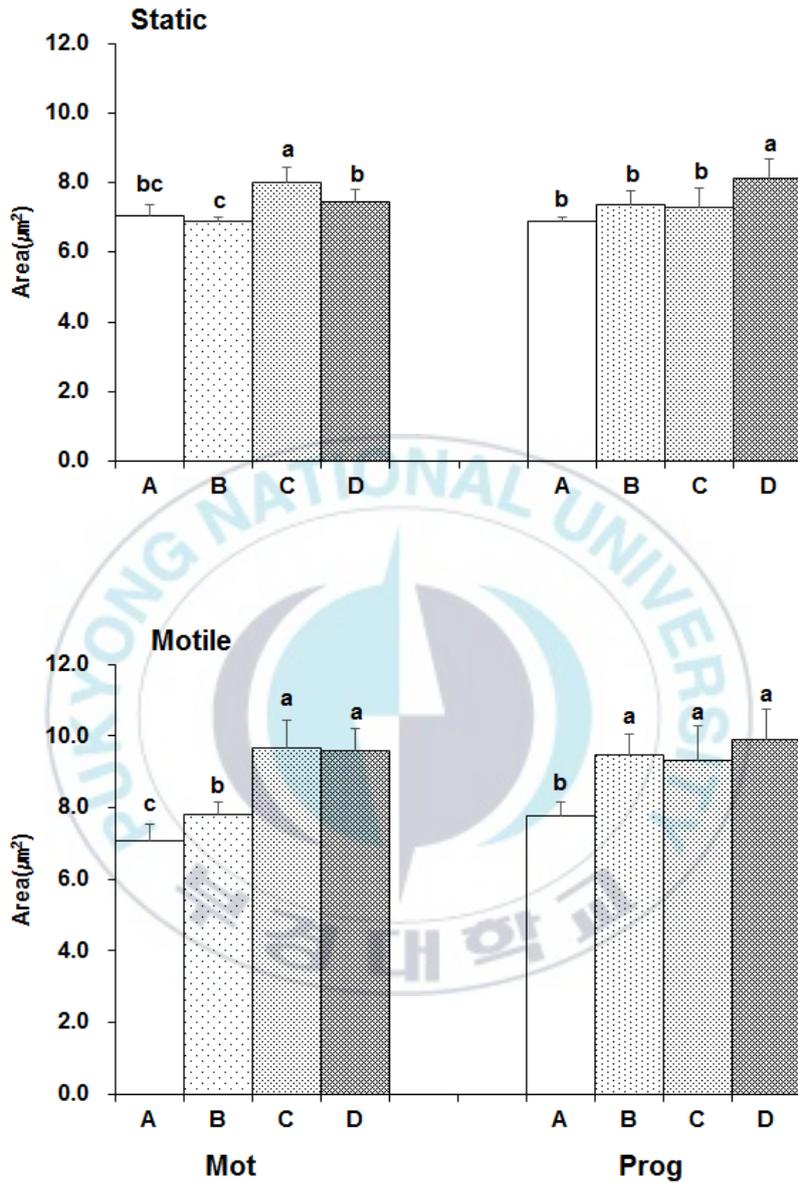


Figure 7. Comparisons of spermatozoa head area with motile and progressive groups divided into (A) 0-10%, (B) 10-40%, (C) 40-70% and (D) 70-100%. Data are expressed as mean±SEM. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

라. 무기원소 조성의 변화

Mot 운동성을 기준으로 활성별 무기원소 조성차이를 관찰한 결과는 Table 8과 같다. 활성별로 나트륨 함량은 $140 \pm 5.8 - 154.9 \pm 12.3$ mM이었으며, 칼륨 함량은 $12.6 \pm 2.6 - 18.8 \pm 1.0$ mM으로 나타났다. 하지만 두 원소에서 활성별로 유의한 차이는 관찰되지 않았다($p > 0.05$). 마그네슘은 활성이 높은 D그룹에서 검출되지 않았으나, 활성이 낮은 A그룹에서 3.6 ± 1.5 mM으로 유의하게 높은 값을 나타내며($p < 0.05$), 활성이 높아질수록 감소하는 경향을 보였다. 칼슘함량은 D그룹에서 9.5 ± 0.3 mM으로 가장 높았으며, 활성이 낮은 A그룹에서 4.9 ± 0.6 mM으로 유의하게 낮은 값을 나타내나($p < 0.05$), 활성이 높아질수록 증가하는 경향을 나타냈다. 철의 함량은 D그룹에서 21.7 ± 1.1 mM으로 가장 높았으며, 활성이 낮은 A그룹에서 6.3 ± 1.1 mM으로 유의하게 낮은 값을 나타내나($p < 0.05$), 활성이 높아질수록 증가하는 경향을 보였다. 구리는 A그룹에서 0.34 ± 0.04 mM으로 가장 높았으며, 활성이 높은 D그룹에서 0.06 ± 0.01 mM으로 유의하게 낮은 값을 나타내나 ($p < 0.05$), 활성이 높아질수록 감소하는 경향을 보였다. 아연은 모든 구간에서 검출되지 않았다.

Table 8. Ionic composition in seminal plasma of *Anguilla japonica* evaluated with motile (Mot) activity groups following, (A) 0-10%, (B) 10-40%, (C) 40-70% and (D) 70-100%.

| (mM) | Group A | Group B | Group C | Group D |
|------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| Na | 154.9±12.3 ^a | 140±5.8 ^a | 146.2±8.3 ^a | 151.4±3.3 ^a |
| K | 12.6±2.6 ^a | 14.4±2.7 ^a | 18.8±1 ^a | 18.2±2.2 ^a |
| Mg | 3.6±1.5 ^a | 1.2±0.5 ^{ab} | 0.6±0.4 ^{ab} | N.D. |
| Ca | 4.9±0.6 ^b | 6.2±1 ^{ab} | 8.1±0.3 ^a | 9.5±0.3 ^a |
| Fe | 6.3±1.1 ^b | 9.8±1.4 ^b | 17.1±1.4 ^a | 21.7±1.1 ^a |
| Cu | 0.34±0.04 ^a | 0.18±0.03 ^b | 0.09±0.01 ^{bc} | 0.06±0.01 ^c |
| Zn | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |

3. 인공정장액내 무기원소 조성에 따른 정자활성 변화

가. 칼슘 조성 조절에 따른 활성 변화

인공정장액 내 칼슘의 조성 농도를 조절한 후 활성변화를 관찰한 결과는 Fig. 8와 같다. Mot는 모든 조건에서 1일 이후 급격하게 낮아졌고 5, 7일차에 칼슘 0 mM 그룹이 비교적 높은 값을 나타냈으나, 각 그룹간의 유의한 차이는 나타나지 않았다($p>0.05$). Prog는 모든 조건에서 0일차에 $46.4 \pm 3.0\%$ 에서 3일차 $20.2 \pm 2.2\%$ 으로 급격하게 낮아졌으며, 7일차에 $9.92 \pm 1.2\%$ 로 낮은 값을 나타냈다. 각 그룹간의 유의한 차이는 관찰되지 않았다($p>0.05$).

방향인자인 BCF은 모든 조건에서 0일차 51.4 ± 2.5 Hz에서 1일차에 58.2 ± 1.9 Hz로 증가한 후, 가장 높은 함량인 4 mM은 점차 감소하였으나 0 mM과 2 mM은 3일차에 감소 후 다시 반등하였다. 각 그룹간의 유의한 차이는 나타나지 않았다($p>0.05$).

운동속력인자인 VAP는 모든 조건에서 0일차 89.5 ± 8.4 $\mu\text{m/s}$ 에서 1일차 65.58 ± 1.8 $\mu\text{m/s}$ 로, VSL은 0일차 73.3 ± 8.4 $\mu\text{m/s}$ 에서 1일차 48.5 ± 1.7 $\mu\text{m/s}$ 로 급격하게 감소한 후 서서히 감소하는 유사한 경향을 나타냈다. VCL은 모든 조건에서 0일차에 163.3 ± 4.6 $\mu\text{m/s}$ 에서 7일차 114.2 ± 3.0 $\mu\text{m/s}$ 로 서서히 감소하는 경향을 보였고, 각 그룹간의 유의한 차이는 나타나지 않았다($p>0.05$).

모든 관찰인자들에서 칼슘조성별 활성변화의 차이는 보이지 않았고 유사한 경향을 나타냈다.

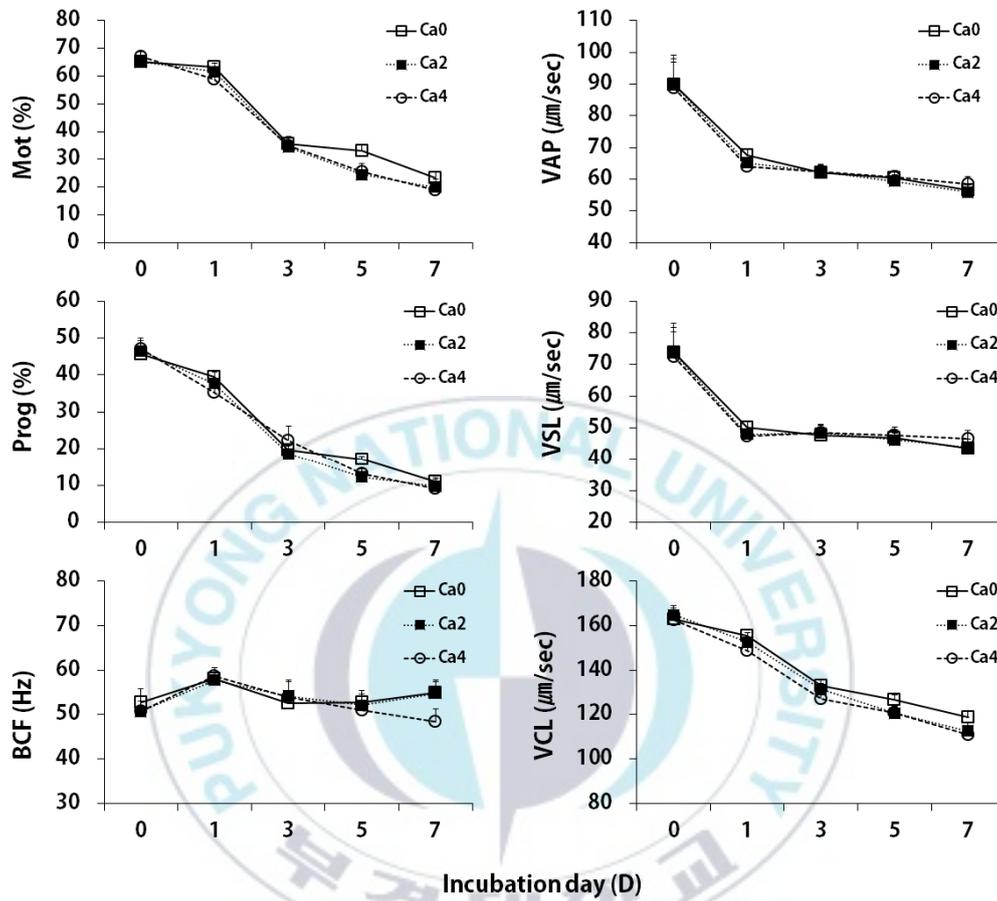


Figure 8. Effects of variations in concentration of Ca^{2+} ions composed in artificial seminal plasma with several sperm activity parameters for 7 days.

나. 마그네슘 조성 조절에 따른 활성 변화

인공정장액 내 마그네슘의 조성 농도를 조절한 후 활성변화를 관찰한 결과는 Fig. 9와 같다. Mot 값은 모든 조건에서 1일 이후 급격하게 낮아졌고, 각 그룹간의 유의한 차이는 나타나지 않았다($p>0.05$). Prog 값 또한 모든 조건에서 1일 이후 급격하게 낮아졌으며, 7일차에 $8.4 \pm 1.2\%$ 로 낮은 값을 나타냈다. 각 그룹간의 유의한 차이는 나타나지 않았다($p>0.05$).

방향인자인 BCF는 모든 조건에서 0일차 51.8 ± 2.2 Hz에서 1일차에 56.4 ± 2.1 Hz로 증가하였으며, 이후 감소하였다. 7일차에 모든 조건에서 49.7 ± 2.6 Hz로 반등하였으나, 각 그룹간의 유의한 차이는 나타나지 않았다($p>0.05$).

운동속력인자인 VAP는 모든 조건에서 0일차 86.8 ± 8.5 $\mu\text{m/s}$ 에서 1일차 67.3 ± 1.6 $\mu\text{m/s}$ 로, VSL은 0일차 70.5 ± 8.5 $\mu\text{m/s}$ 에서 1일차 50.4 ± 1.5 $\mu\text{m/s}$ 로 급격하게 감소하였으며, 그 이후는 서서히 감소하였다. VCL은 모든 조건에서 0일차 162.1 ± 4.7 $\mu\text{m/s}$ 에서 7일차 113.1 ± 3.1 $\mu\text{m/s}$ 로 서서히 감소하였으며, 그룹간의 유의한 차이는 나타나지 않았다($p>0.05$).

칼슘조성에 따른 결과와 마찬가지로 모든 관찰인자들에서 마그네슘 조성별 활성변화의 차이는 보이지 않았고 유사한 경향을 나타냈다.

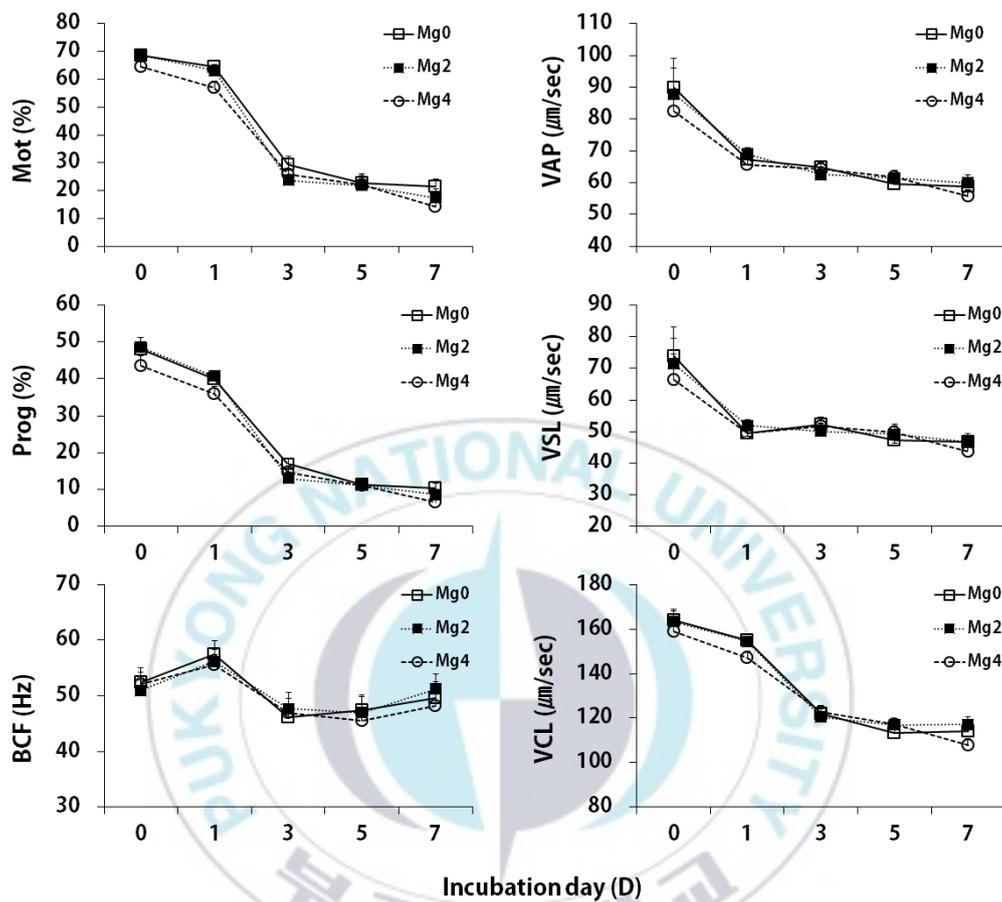


Figure 9. Effects of variations in concentration of Mg²⁺ ions composed in artificial seminal plasma with several sperm activity parameters for 7 days.

다. 나트륨 조성 조절에 따른 활성 변화

인공정장액 내 나트륨의 조성 농도를 조절한 후 활성변화를 관찰한 결과는 Fig. 10와 같다. Mot 값은 가장 낮은 농도인 나트륨 120 mM에서 서서히 감소한 후, 7일차에 $31.5 \pm 3.9\%$ 로 모든 군에서 가장 높게 나타났다. 반면, 가장 높은 농도인 150 mM에서는 1일차에 급격하게 활성이 감소하였고 7일차에 $22.2 \pm 3.8\%$ 로 가장 낮은 값을 보였다. Prog 값 또한 가장 낮은 120 mM에서 서서히 감소하는 경향이 관찰되었으며, 7일차에 $19.4 \pm 3.1\%$ 로 가장 높았다. 150 mM에서는 0일차 $32.2 \pm 2.8\%$ 에서 1일차 $13.5 \pm 3.8\%$ 로 급격하게 감소하였으며, 7일차에 $10.4 \pm 1.7\%$ 로 유의하게 가장 낮은 값을 나타냈다($p < 0.05$).

방향인자인 BCF는 120 mM에서 0일차에 60.9 ± 1.9 Hz의 값을 보였고 7일차에 35.6 ± 0.9 Hz로 급격하게 감소하였다. 150 mM에서는 0일차에 63.6 ± 1.6 Hz에서 7일차에 48.9 ± 2.8 Hz로 서서히 감소하며 유의하게 낮은 값을 나타냈다($p < 0.05$). Mot와 Prog 값이 가장 낮은 나트륨 농도에서 높았던 것에 반해 BCF는 가장 낮은 농도에서 낮은 값을 나타냈다.

운동속력인 VAP는 모든 농도에서 1일차에 0일차와 유사한 값을 유지하다가 가장 낮은 120 mM에서 5일차까지 81.2 ± 5.5 $\mu\text{m/s}$ 로 급격히 증가한 후 7일차에 감소하였고, VSL 또한 유사하게 120 mM에서 5일차에 67.1 ± 5.7 $\mu\text{m/s}$ 로 증가한 후 감소하였다. VCL은 모든 조건에서 서서히 감소하는 경향을 나타냈으나 가장 낮은 120 mM에서 7일차에 120.0 ± 4.8 $\mu\text{m/s}$ 로 유의하게 가장 높은 값을 나타냈다($p < 0.05$).

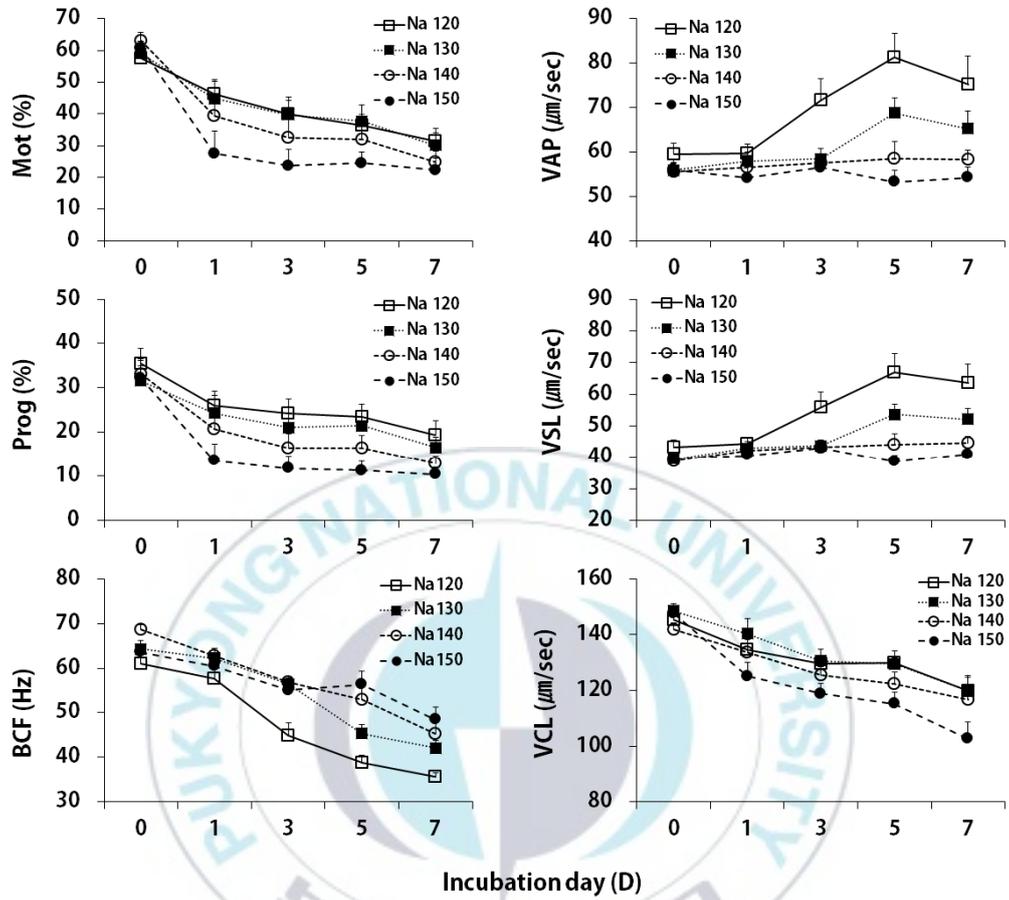


Figure 10. Effects of variations in concentration of Na⁺ ions composed in artificial seminal plasma with several sperm activity parameters for 7 days.

라. 칼륨 조성 조절에 따른 활성 변화

인공정장액 내 칼륨 조성의 영향을 관찰한 결과는 Fig. 11에 나타났다. Mot는 가장 낮은 농도인 10 mM에서 1일차에 급격히 감소하여 7일차에 $6.8 \pm 2.7\%$ 로 모든 농도에서 유의하게 가장 낮은 값을 나타냈고($p < 0.05$), 그 이외 농도들은 유사한 변화를 보였으나 30 mM에서 7일차에 $46.2 \pm 1.8\%$ 로 가장 높은 값을 나타냈다. Prog 값 또한 가장 낮은 10 mM에서 1일차에 급격히 감소하여 7일차에 $2.9 \pm 1.3\%$ 로 모든 농도에서 유의하게 가장 낮은 값을 나타냈다($p < 0.05$). 40 mM에서 3일차 $46.4 \pm 3.0\%$ 로 가장 높았으며, 30 mM에서 7일차 $27.1 \pm 1.8\%$ 로 가장 높은 값을 나타냈다.

방향인자인 BCF은 역으로 10 mM에서 0일차 49.4 ± 2.4 Hz에서 7일차 42.0 ± 3.4 Hz로 큰 변화를 보이지 않으며 서서히 감소하였으나, 높은 농도인 30 mM과 40 mM에서는 지속적으로 감소하여 7일차에 각각 34.2 ± 0.5 Hz, 32.5 ± 0.8 Hz로 유의하게 낮은 값을 나타냈다($p < 0.05$).

운동속력인 VAP는 20 mM, 30 mM, 40 mM에서 3일차까지 증가하다 감소하였다. 10 mM에서 1일차에 급격하게 감소하였고, 7일차 43.6 ± 2.8 μ m/s로 가장 낮은 값을 나타냈다. VSL 또한 유사하게 10 mM에서 1일차에 급격하게 감소하였고, 7일차 32.5 ± 2.1 μ m/s로 가장 낮은 값을 나타냈다. VCL은 모든 농도에서 감소하는 경향을 나타냈으나 10 mM에서 1일차 급격하게 감소하여 7일차에 85.5 ± 5.7 μ m/s로 유의하게 가장 낮은 값을 나타냈다($p < 0.05$).

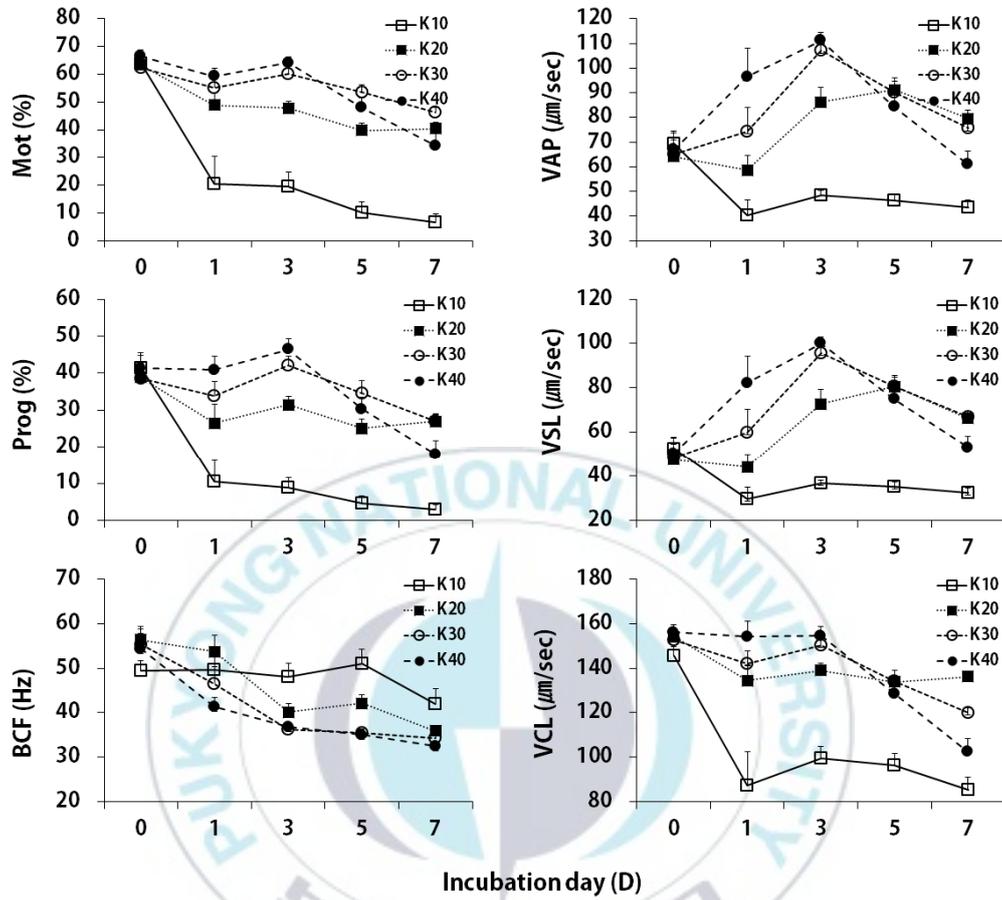


Figure 11. Effects of variations in concentration of K⁺ ions composed in artificial seminal plasma with several sperm activity parameters for 7 days.

IV. 고찰

CASA system을 이용한 정자의 활성분석 기법은 객관적인 해석이 가능하고 결과의 변동성이 적으며, 빠르고 정확한 분석이 가능하다. 또한 현미경을 통한 육안관찰 시에 놓칠 수 있는 정자의 운동속력 변화 및 운동형태, 외형의 분석이 가능하다(Verstegen et al., 2002; Rurangwa et al., 2004). 본 연구에서는 이와 같은 CASA system의 장점을 이용하여 우량한 뱀장어 수정란 생산에 있어 필수적인 운동성 접합배우자인 정자의 활성을 평가할 수 있는 기준을 마련하고자 하였고, 그 기준을 바탕으로 정액을 구성하는 정장액의 주요 조성 무기질들의 함량 변화를 관찰하고 활성유지에 적합한 조성 조절을 통하여 활용성을 개선한 새로운 뱀장어 정장액의 조성비를 제시하고자 하였다.

우선 CASA system을 통하여 산출되는 주요 활성표지 인자(parameter)인 Motility (Mot)와 Progressive (Prog) 운동성 기준으로 뱀장어 정자의 활성도 차이를 비교한 결과, Mot 보다 Prog를 기준으로 했을 때 주요 속력인자들인 VAP, VSL, VCL의 값이 활성변화에 따라 뚜렷한 유의적인 차이를 나타냈고, 평균 운동속력도 Mot를 기준으로 했을 때 보다 약 25-75 $\mu\text{m/s}$ 더 빠르게 나타났다. 또한, 모든 속력인자들의 값은 정자의 활성이 증가함에 따라 증가하는 경향을 보였다. 이와 유사하게, 담수어인 잉어 *Cyprinus carpio* (Lahnsteiner et al., 1998) 및 무지개송어 *Oncorhynchus mykiss* (Linhart et al., 2000), 해수어인 Spotted wolffish *Anarhichas minor* (Kime and Tveiten, 2002) 등에서도 정자의 운동속력이 높을수록 수정률이 증가한다는 보고가 있으며, 이종인 포유동물에서도 정자의 운동

속력과 수정률의 상관관계가 잘 알려져 있다(Moore and Akhondi, 1996; Nagy et al., 2015). Kime and Tveiten (2002)에 따르면, 많은 담수어(연어과, 잉어과, 메기과)에서 정자의 VCL과 VSL의 속력값이 비슷하게 나타났다. 이에 반해, 해수어들의 정자는 낮은 평균 운동속력을 나타낸다고 알려져 있고 대구의 경우 평균 75 $\mu\text{m/s}$ 의 운동 속력이 보이나, 순간적으로 1000 $\mu\text{m/s}$ 이상의 속력을 나타내기도 한다고 보고된 바 있다(Trippel and Neilson, 1992). Spotted wolffish의 경우 VCL 40-50 $\mu\text{m/s}$, VSL 4-14 $\mu\text{m/s}$, VAP 13-20 $\mu\text{m/s}$ 로 낮은 운동 속력을 나타낸다고 보고되었으며(Kime and Tveiten, 2002), 대서양 연어(*Salmo salar*)는 약 VCL 178.4 $\mu\text{m/s}$, VSL 114.8 $\mu\text{m/s}$ 의 운동속력을 나타낸다고 보고된 바 있다(Dziewulska et al., 2011). 본 연구에서 뱀장어 정자의 운동속력 인자들은 VCL에서 모든 활성별로 가장 높은 값을 나타냈고, Prog를 기준으로 하였을 때 가장 활성이 높은 군에서는 평균 200 $\mu\text{m/s}$ 이상의 속력이 관찰되었다. 이상의 결과로 생각하면 뱀장어 정자의 활성을 분류하는 기준으로는 활성이 높은 개체들만을 검출대상으로 삼아 다양한 속력인자들과의 양의 상관관계를 보이는 Prog 값이 유효할 것으로 생각되며, 뱀장어 정자의 운동속력은 보고되어진 담수어 및 해수어 정자들의 평균 VCL 값보다 높게 나타나는 경향을 보여 난과 마찬가지로 뱀장어 종 특이적인 번식전략이 있음이 추측되어진다.

어류 정자의 평균이동경로와 실제이동경로와의 측방거리차인 측두거리를 나타내는 ALH값 및 정자의 운동 시 선형도를 나타내는 LIN과 STR값이 수정에 미치는 영향은 구체적으로 알려진 바가 없으나, 무지개송어의 ALH 값은 9.6 μm , 대서양연어에서는 5.7 μm , 대서양대구(*Gadus morhua*)는 7.3-9.1 μm 로 보고 된 바 있으며(Tuset et al., 2008; Dziewulska et al., 2011; Judycka et al., 2016), 대서양 대구에서는 정자의 활성이 높아질수록

LIN 값이 71.7-91.6% 증가한다는 보고되어졌다(Tuset et al., 2008). 한편, 정자의 STR과 LIN의 값이 클수록 직선형 운동을 하는 것으로 알려져 있으며, Felip et al. (2009)는 정자의 진동수는 수정과 연관이 있는 중요한 인자라고 언급하였다. 본 연구에서 뱀장어의 정자는 활성이 높은 군에서 ALH 5.0 μm 이상이었으며, LIN은 45%, STR은 75% 이상으로 관찰되었다. 이를 종합하면, 뱀장어의 정자는 활성이 높을수록 직선형의 운동 방향성을 갖는 것으로 추측되며, 높은 활성에서는 BCF가 50 Hz 이하로 나타나 정자의 활성이 높아질수록 진동수는 감소하는 것으로 나타났다.

대부분의 경골어류들은 정자에 침체가 존재하지 않는 것으로 알려져 있으며, 다양한 수중환경에 적응하여 진화해왔기 때문에 종에 따라 정자두부(Head)의 모양이 다양하다(Billard and Cosson, 1992). 또한, 정자형태의 기형은 정자의 활성과 수정에 영향을 끼친다고 보고가 되어있다(Rurangwa, 2004). Penaranda et al. (2010)에 따르면 유럽산뱀장어(*Anguilla Anguilla*)에서는 정자의 활성이 감소할수록 정자 두부의 둘레와 면적이 감소한다고 하였으며, 포유류인 염소에서도 활성이 없는 정자의 크기가 활발한 정자보다 상대적으로 크기가 작다고 보고되어졌다(Hidalgo et al., 2006). 대서양 대구와 무지개송어에서는 정자의 크기가 클수록 높은 함량의 ATP를 가지고 있어 정자의 운동속력이 증가한다고 보고되어졌다(Tuset et al., 2008a; Tuset et al., 2008b). 이번 연구의 결과에서는 정자의 활성이 감소할수록 정자의 두부의 높이, 폭, 둘레, 면적 또한 뚜렷하게 감소하는 것으로 나타났다. 즉, 크기가 큰 정자가 작은 정자보다 활성과 운동속력이 높았다. 즉, 극동산뱀장어에서는 정자 두부의 크기가 정자의 활성과 운동속력에 크게 영향을 미치는 것으로 판단된다.

정장액은 정자 보존에 있어 최적의 환경을 만들어주며, 정자의 생존율과 활성을 유지 시켜주는 역할을 한다(Ohta and Izawa, 1996; Bozkhurt et

al., 2008). 또한, 정자의 기능에 영향을 주는 다양한 물질을 포함하고 있고, 그 중 무기원소는 정자의 활성화에 중요한 역할을 가지고 있다(Rurangwa et al., 2004). 정장의 무기원소는 어류에 따라 다양하게 나타난다. 해수어인 강섬돔 *Acanthopagrus schlegelii* 정장액에는 나트륨 177.0 ± 3.0 mM, 칼륨 4.6 ± 0.1 mM, 마그네슘 0.3 ± 0.1 mM, 칼슘 1.3 ± 0.3 mM (Jeong and Chang, 2011)이 조성되어 있으며, 말쥐치 *Thamnaconus modestus*는 나트륨 164.0 ± 4.0 mM, 칼륨 9.8 ± 0.9 mM, 마그네슘 7.2 ± 0.1 mM, 칼슘 14.9 ± 0.6 mM (Le et al., 2007)으로 나타났다. 담수어인 잉어 *Cyprinus carpio*의 정장액에는 나트륨 75.0 ± 3.2 mM, 칼륨 82.4 ± 3.33 mM, 마그네슘 0.8 ± 0.04 mM, 칼슘 2.0 ± 0.18 mM (Morisawa, 1983)이 함유되어 있으며, 묵납자루 *Acheilognathus signifer*에서는 나트륨 86.6 ± 3.0 mM, 칼륨 75.5 ± 5.5 mM, 마그네슘 5.9 ± 2.0 mM, 칼슘 4.1 ± 1.2 mM (Jeong et al., 2014)이 정장액에 포함된 것으로 나타났다. 극동산뱀장어에서도 Ohta et al. (1997)에 의해 나트륨 149.3 ± 3.2 mM, 칼륨 15.2 ± 0.8 mM, 칼슘 1.3 ± 0.1 mM, 마그네슘 1.6 ± 0.3 mM로 정장액내 무기원소 조성이 보고되어졌으며, 본 연구에서 분석한 활성화그룹 C에서 나타난 조성과의 유사한 결과였다. 하지만, 본 연구에서 가장 높은 활성을 나타낸 D그룹의 조성인 나트륨 151.4 ± 3.3 mM, 칼륨 18.2 ± 2.2 mM, 칼슘 9.5 ± 0.3 mM, 마그네슘 미검출과는 차이를 보였다. Asturiano et al. (2004)의 연구에 따르면, 유럽산뱀장어에서는 정자의 활성이 높아질수록 정장액내 칼륨의 농도는 증가하고, 칼슘과 마그네슘은 감소하는 경향이 나타난다고 하였다. 본 연구의 극동산뱀장어에서도 정자의 활성화별 조성에서 칼륨의 농도는 유의한 차이를 나타내지는 않았지만 활성이 높아질수록 칼륨이온도 증가하는 경향을 보였고, 이는 Ohta et al. (2001)의 보고와 같이 뱀장어 정자의 활성을 조절하는데 있어 칼륨의 역할이 매우 중요함을 시사하는 결과이며, 뱀장어

종 전반적인 현상으로 추측된다. 한편, 본 연구에서의 정자 활성이 높아질수록 마그네슘 이온이 감소하는 경향은 유럽산뱀장어와 일치하는 결과를 나타냈지만, 칼슘의 농도는 반대로 유의적으로 증가하는 경향을 나타내 뱀장어 종(species) 간의 조성 차이를 나타냈다. Wojtezak et al. (2007)의 연구에 따르면 잉어에서 철 이온은 트랜스페린(Transferrin)과 함께 분비되며, 이는 정자의 활성과 연관이 있다고 하였다. 이번 연구에서도 이와 유사하게 정자의 활성이 높아질수록 철의 이온이 유의적으로 증가하는 것을 관찰할 수 있었고, 추후 트랜스페린과 뱀장어 정자의 활성간의 관계를 연구해볼 필요가 있을 것으로 생각된다. 정장의 조성에서 구리 이온에 대한 역할은 알려진 바가 없지만, 뱀장어에서는 그 양은 미약하나 활성이 높아질수록 유의적으로 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 또, 대부분 포유동물의 정장에 존재하는 아연이(Hidiroglou, 1984), 이번 연구에서는 어떤 활성그룹에서도 검출되지 않아 이것이 뱀장어 종 특이적인 현상인지, 분석상의 문제인지 재차 조사해봐야 할 것으로 생각된다.

Ohta et al. (1997)의 연구에 따르면 극동산뱀장어의 인공정장액에 칼슘과 마그네슘은 존재하지 않아도 정자의 활성에 영향을 주지 않는다고 하였으며, 유럽산뱀장어에서도 인공정장액에 칼슘과 마그네슘의 이온이 감소함에 따라 정자의 활성을 높게 유지시킨다고 하였다(Asturiano et al., 2004). 이번 연구에서 활성별 무기원소 조성 차이 결과에 따라 칼슘과 마그네슘의 조성을 조절하여 정자의 활성변화를 관찰하였으나, 위의 두 결과와 마찬가지로 실험 농도 안에서는 주목할 만한 차이를 나타내지 않았으며 모든 활성평가 인자들의 값과 변화가 두 그룹 간에 유사하게 나타난 것을 확인할 수 있었다. 이는 상대적으로 두 무기원소의 조성 농도가 낮고, 짧은 보존기간 내에 다른 주요한 무기원소들처럼 뚜렷한 영향을 미치지 않았던 것이 원인으로 생각되나, 정자의 생존과 활성에 미치는 영향이 없다고 단정하기

에는 추후보다 많은 연구를 해 봐야 할 것으로 사료된다. 이에 반해, 이번 연구에서 뱀장어 정장액 조성 나트륨은 정자 활성화에 따라 유의한 차이가 나타나지 않았지만, Asturiano et al. (2004)의 연구처럼 인공정장액내 나트륨 조성을 낮춰 제작하였을 때 1주일간 정자의 활성화와 운동속력이 높게 유지되며 보존이 되는 것으로 나타났으며, 기존에 보고 되어진 조성과는 다른 120 mM이 가장 유효한 것으로 확인되었다. 또, 이번 연구를 통하여 3일의 단기보존 시에는 40 mM의 칼륨 농도가, 7일의 장기보존 시에는 30 mM의 칼륨조성이 인공정장액 활용에 효과적인 것으로 나타나, Ohta and Izawa (1996)가 제시한 인공정장액내 칼륨 조성인 7일 보존 시 15-45 mM, 28일 보존 시 45-75 mM의 다소 넓고 장기간으로 갈수록 높은 농도가 좋다는 결과를 개선하여 보다 명확한 기준을 제시하였다. 이러한 차이는 기존의 연구에서는 Motility 운동성만을 정자활성 평가의 기준으로만 사용하였고, 그 이외의 다양한 활성평가 인자인 운동속력과 진동수 등은 고려하지 못하였기 때문으로 추측된다.

이상의 결과를 종합하여 보면, 극동산뱀장어 정자의 평가는 운동 활성화와 속력인자들과의 상관관계에서 뚜렷하게 양의 상관관계를 나타내는 Prog 운동성을 주요 관측인자로서 VCL의 속도, 정자의 진동수(Hz), 높은 활성의 정자 두부 크기 등을 고려하며 판단하는 것이 적합하며, 인공정장액 제작 시 단기 사용에는 나트륨 120 mM, 칼륨 40 mM의 조성이 유효하며, 장기 보존 시에는 나트륨 120 mM, 칼륨 30 mM 조성이 효과적인 것으로 판단된다. 따라서, 본 연구의 결과로 뱀장어 정자의 활성평가에 유효한 관측인자들이 밝혀졌으며, 이를 바탕으로 정장액을 구성하는 주요 무기원소들이 정자의 활성화에 미치는 영향을 확인하여 우수한 수정란을 생산하기 위해 효과적인 정장액을 조성하는데 참고되는 기초적인 정보를 제공하였다.

요약

뱀장어는 극동아시아 지역의 어류양식 산업 중 매우 큰 부분을 차지하고 있으나, 아직도 전 세계적으로 양식 산업화를 성공시킨 예는 없다. 건강한 종자의 안정적 생산은 양식 산업화의 필수요소이며, 난 뿐만 아니라 정자의 품질을 평가하고 개선할 수 있는 기초적인 연구들이 반듯이 수반되어야 한다. 따라서 본 연구에서는 최신의 CASA system을 사용하여 뱀장어 정자의 품질을 평가할 수 있는 기준을 마련하고자 하였으며, 정장액내 무기원소 조성 조절을 통한 효율적인 인공정장액 제작비를 검토하였다.

일반적으로 정자의 활성을 평가하는 기준인 Motility 및 Progressive를 기준으로 뱀장어 정자의 활성을 (A) 0-10%, (B) 10-40%, (C) 40-70%, (D) 70-100%로 나누어 정자의 속력인자 및 방향성인자, 두부의 형태를 비교 분석한 결과 활성이 높은 정자들만을 기준으로 삼는 Progressive 운동성이 모든 속력인자에서 높은 값을 나타냈고 다양한 관측인자들과 뚜렷한 양의 상관관계를 보였다. 또, 속력인자 중 VCL 나선운동속력이 중요할 것으로 추측되었으며, 가장 높은 값은 207.1 $\mu\text{m/s}$ 로 나타났다. 방향성 인자들에서는 정자의 진동수를 나타내는 BCF 값이 활성이 높은 수록 낮아졌으며 가장 활성이 높은 군에서 43.35 Hz로 나타났다. 정자 두부의 형태는 길이와 면적 모든 면에서 활성이 높을수록 증가하는 경향이 나타났으며, 정자의 활성에 영향을 미치는 정장액내 무기원소로는 나트륨과 칼륨의 역할이 중요한 것이 시사되었다. 또, 단기간 정자를 보관할 시에는 나트륨 120 mM, 칼륨 40 mM 농도가, 장기보관 시에는 나트륨 120 mM, 칼륨 30 mM의 조성이 인공정장액 제작에 유효함이 확인되었다. 이상의 결과로 뱀장어 정자의 활성을 평가하는 중요한 기초 정보를 제공하였

고, 양식 산업화에 중요한 뱀장어 인공정장액의 효율적 조성비를 제시할 수 있었다.



감사의 글

2018년 9월에 부경대학교 대학원을 입학하여 2년의 시간이 지나, 제가 학위 논문을 쓰게 되었습니다. 학위기간동안 많은 격려와 도움을 주신 분들에게 감사의 마음을 전하고자 합니다.

먼저, 석사학위동안 올바른 방향으로 이끌어 주시고 많은 조언과 격려를 주신 최윤희 교수님께 감사드립니다. 저의 석사과정 시작과 끝까지 가장 도움을 많이 주신 유용운 박사님께 진심으로 감사드립니다. 바쁘신 와중에 부족한 저의 논문을 심사해주신 김종명 교수님, 김신권 박사님께도 감사드립니다. 대학원 과정 동안 전문적인 지식을 가르쳐 주신 남윤권 교수님, 공승표 교수님, 박정환 교수님께도 감사드립니다.

국립수산과학원에서 연구를 하며, 학업을 이어 갈 수 있게 도와주신 전제천 부장님과 이배익 박사님께 감사의 말씀을 올립니다. 아울러 뱀장어 팀에서 같이 고생하면서 도움을 준 대근이형, 효원이형, 성훈이형, 영완이형에게도 감사의 마음 전합니다. 같이 입학을 하며, 수업, 실험을 하면서 부족한 부분을 채워준 민규형에게 감사드립니다. 또한 부족한 저에게 따끔한 충고를 해준 형준이형에게 감사드립니다. 그리고 같은 실험실에서 연구하고 있는 수진이누나, 지성이형, 현규형, 성준이, 승백이, 수정이에게도 고마운 마음을 전합니다.

대학원 생활동안 힘들 때 응원해주고 가장 큰 힘이 되어 준 유진이게도 사랑하고, 고마운 마음을 전합니다.

마지막으로 저를 키워주시고, 학위과정동안 가장 많은 지원을 해주신 아버지, 어머니, 여동생, 남동생에게 감사하고 사랑한다는 마음을 전하며 감사의 글을 마치겠습니다.

참고문헌

- Asturiano J.F., Perez L., Garzon D.L., Marco-Jimenez F., Penaranda D.S., Vicente J.S. and Jover M. (2004). Physio-chemical characteristics of seminal plasma and development of media and methods for the cryopreservation of European eel sperm. *Fish. Physiol. BioChem.* 30, 283-293.
- Billard R. and Cosson J. (1992). Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater. *J. Exp. Zool.* 261, 122-131.
- Bozkurt Y., Ogretmen F., Ercin U. and Yldz U. (2008). Seminal plasma composition and its relationship with physical spermatological parameters Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) semen : with emphasis on sperm motility. *Aquac. Res.* 39, 1666-1672.
- Bozkurt Y., Ogretmen F. and Ercin U. (2011). Relationships between seminal plasma composition and sperm quality parameters of the *Salmo trutta macrostigma* (Dumeril, 1858) semen: with emphasis on sperm motility. *Czech J. Anim. Sci.* 56, 355-364.
- Brinsko S.P., Crockett E.C. and Squires E.L. (2000). Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology.* 54, 129-136.
- Cejko B.I., Horvath A., Kollar T., Kasa E., Lujic J., Marinovic Z.,

- Urbanyi B. and Kowalski R.K. (2018). Optimisation of sodium and potassium concentrations and pH in the artificial seminal plasma of common carp *Crprinus carpio* L. Fish. Physiol. BioChem. 44, 1435-1442.
- Dott H.M. and Foster G.C.A. (1979). The estimation of sperm motility in semen, on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analysing computer. J. Reprod. Fert. 55, 161-166.
- Dziewulska K., Rzemieniecki A. and Domagala J. (2011). Sperm motility characteristics of wild Atlantic salmon(*salmo salar* L.) and sea trout (*Salmo trutta* m. *trutta* L.) as a basis for milt selection. J. Appl. Ichthyol. 24, 1047-1051.
- Guest W.C., Avault J.W. and Roussel J.D. (1976). Preservation of channel catfish sperm. Trans. Am. Fish. Sic. 3, 464-474.
- Hidiroglou M. (1984). Zinc in mammalian sperm: A review. J. Dairy. Sci. 67, 1147-1156.
- Hidalgo M., Rodriguez I. and Dorado J. (2006). Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometry using the Sperm Class Analyzer. Theriogenology. 66, 996-1003.
- Iuger-ouada M. and Verstegen J.P. (2001). Evaluation of the “Hamilton thorn computer-based automated system” for dog semen analysis. Theriogenology. 55, 733-749.
- Jeong M.H. and Chang Y.J. (2011). Properties of Semen and Sperm Motility of Black Porgy *Acanthopagrus schlegelii* Acclimated in Freshwater. Dev. Rep. 15(2), 151-158.

- Jeong M.H., Min B.H., Park M.S. and Myeong J.I. (2014). Cryopreservation of common korean bitterling *Acheilognathus signifer* sperm. Kor. J. Fish. Aquat. Sci. 47(1), 39-44.
- Judycka S., Cejko B.I., Dryl. K., Dobosz. S., Grudniewska. J. and Kowalski R.K. (2016). The effect of supplementation of a trehalose-based extender with KCl on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm freezability and post-thaw motility. Aquaculture. 465, 303-310.
- Kagawa H., Iinuma N., Tanaka H., Ohta H. and Okuzawa K. (1998). Effects of Rearing Period in Seawater on Induced Maturation in Female Japanese eel *Anguilla japonica*. Fish. Sci. 64(1), 77-82.
- Kime D.E., Van Look K.J.W., Mcallister B.G., Huyskens G., Rurangwa E. and Ollevier F. (2001). Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. Com. Bio. Physio. C130, 425-433.
- Kime D.E. and Tveiten H.T. (2002). Unusual motility characteristics of sperm the spotted wolffish. J. Fish. Biol. 61, 1549-1559.
- Klimowicz M.D., Nizanski W., Batkowski F. and Savic M.A. (2008). The comparison of assessment of pigeon semen motility and sperm concentration by conventional methods and the CASA system (HTM IVOS). Theriogenology. 70, 77-82.
- Kobayashi T., Fushiki S. and Ueno K. (2004). Improvement of sperm motility of sex-reversed male rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by incubation in high-pH artificial seminal plasma. Env. Biol. Fish. 69, 419-425.

- Lahnsteiner F., Berger B., Weismann T. and Patzner R.A. (1996). Motility of spermatozoa of *Alburnus alburnus* (Cyprinidae) and its relationship to seminal plasma composition and sperm metabolism. *Fish. Physiol. BioChem.* 15, 167-179.
- Lahnsteiner F., Berger B., Weismann T. and Patzner R.A. (1998). Determination of semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoal metabolism. *Aquaculture.* 163, 163-181.
- Le M.H., Lim H.K., Min B.H., Kim S.Y. and Chang Y.J. (2007). Milt properties and spermatozoa structure of filefish *Thamnaconus modestus*. *Dev. Reprod.* 11, 227-233.
- Linhart O., Rodina M. and Cosson J. (2000). Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio* : sperm motility and hatching success of embryos. *Cryobiology.* 41, 241-250.
- Morisawa M. (1983). Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. *J. Exp. Biol.* 107, 95-103.
- Morisawa M. (2008). Adaptation and strategy for fertilization in the sperm of teleost fish. *J. Appl. Ichthyol.* 24, 362-370.
- Miura T., Yamauchi K., Takahashi H. and Nagahama Y. (1991). Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Natl. Acad. Sci.* 88, 5774-5778.
- Miura A., Nomura K., Imaizumi H., Jinbo T., Masuda Y., Tanaka H. and Ohta H. (2013). Administration of 17 α -hydroxyprogesterone into

- mature male Japanese eel reduces sperm motility by decreasing potassium ion concentrations in the seminal plasma. *Aquaculture*. 414-415, 217-223.
- Moore H.D.M. and Akhondi M.A. (1996). Fertilizing capacity of rat spermatozoa is correlated with decline in straight-line velocity measured by continuous computer-aided sperm analysis: epididymal rat spermatozoa from the proximal cauda have a greater fertilizing capacity in vitro than those from the distal cauda or vas deferens. *J. Andro.* 17(1), 50-60.
- Mylonas C.C., Duncan N.J. and Asturiano J.F. (2017). Hormonal manipulations for the enhancement of sperm production in cultured fish and evaluation of sperm quality. *Aquaculture*. 472, 21-44.
- Nagy A., Polichronopoulos T., Gaspardy A., Solti L. and Cseh S (2015). Correlation between bull fertility and sperm cell velocity parameters generated by computer-assisted semen analysis. *Acta. Veterinaria. Hungarica*. 63(3), 370-381.
- Ohta H. and Izawa T. (1996). Diluent for cool storage of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. *Aquaculture*. 142, 107-118.
- Ohta H., Kagawa H., Tanaka H., Okuzawa K. and Hirose K. (1996). Changes in fertilization and hatching rates with time after ovulation induced by 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*. 139, 291-301.
- Ohta. H., Ikeda K. and Izawa T. (1997). Increases in concentrations of Potassium and Bicarbonate ions promoted acquisition of motility In vitro by Japanese eel spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 277, 171-180.

- Ohta H., Kagawa H., Tanaka H. and Unuma T. (2001). Control by the environmental concentration of ions of the potential for motility in Japanese eel spermatozoa. *Aquaculture*. 198, 339-351.
- Penaranda D.S., Perez L., Gallego V., Barrera R., Jover M. and Asturiano J.F. (2010). European eel sperm diluent for short-term storage. *Reprod. Dom. Anim.* 45, 407-415.
- Rurangwa E., Kime D.E., Ollevier F. and Nash J.P. (2004). The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*. 234, 1-28.
- Sa S.J., Kim M.J., Cho K.H., Kim D.W., So K.M., Chung K.H., Son J.H. and Kim I.C. (2011). Effect of storage in different commercial semen extenders on the motility, viability and fertility *In vitro* of boar spermatozoa. *Reprod. Dev. Biol.* 35(3), 203-207.
- Takai H. and Morisawa M. (1995). Change in intracellular K⁺ concentration caused by external osmolality change regulates sperm motility of marine and freshwater teleosts. *J. Cell. Sci.* 108, 1175-1181.
- Trippel E.A. and Neilson J.D. (1992). Fertility and sperm quality of virgin and repeat-spawning Atlantic Cod (*Gadus morhua*) and associated hatching success. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49, 2118-2127.
- Tuset V.M., Trippel E.A. and Monserrat J. (2008a). Sperm morphology and its influence on swimming speed in Atlantic cod. *J. Appl. Ichthyol.* 24, 398-405.
- Tuset V.M., Dietrich G.J., Wojtczak M., Slowinska M., Monserrat J. and Ciereszko A. (2008b) Relationships between morphology, motility and

- fertilization capacity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. J. Appl. Ichthyol. 24, 393-397.
- Urbach D., Folstad I. and Rudolfsen G. (2005). Effects of ovarian fluid on sperm velocity in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). Behav. Ecol. Sociobiol. 57, 438-444.
- Verstegen J., Iguer-Ouda M. and Onclin K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. Theriogenology. 57, 149-179.
- Wojtczak M., Dietrich G.J., Imnazarow I., Jurecka P., Slowinska M. and Ciereszko A. (2007). Polymorphism of transferrin of carp seminal plasma : Relationship to blood transferrin and sperm motility characteristics. Fish. Biol. Physiol. 148, 426-431.
- Yamamoto K., Hiroi O. and Morioka T. (1972). Artificial maturation of cultivated male Japanese eels by synahorin injection. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 38, 1083-1090.