

굴, *Crassostrea gigas* 정자의 냉동보존

박미선¹, 민병화¹, 박정준¹, 임현정², 명정인¹, 정민환¹

¹국립수산과학원 양식관리과, ²서해수산연구소 해역산업과

Cryopreservation of Pacific Oyster, *Crassostrea gigas* Sperm

Mi Seon Park¹, Byung Hwa Min¹, Jung Jun Park¹, Hyun Jeong Lim², Jeong-In Myeong¹ and
Min Hwan Jeong¹

¹Aquaculture Management Division, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-902, Korea

²West Sea Fisheries Research Institute, National Fisheries Research and Development Institute, Incheon 400-420, Korea

ABSTRACT

This study aims to find out a suitable cryoprotective agent (CPA) for cryopreservation and its optimum concentration in order to conduct planned artificial seed production of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* and to preserve superior sperm. For this, we tried to understand toxicity and the effect of cryopreservation by CPA type and concentrations first and then looked into cell damage of the sperm after thawing. Toxicity analysis on the sperm of Pacific oyster according to different CPA and immersion time shows that dimethyl sulfoxide (DMSO) comes first when it comes to survival rate and mobility followed by ethylene glycol (EG), glycerol and methanol. To identify the optimum CPA and its level, filtered seawater was used as a diluent before cryopreservation for 30 days. As a result, cryopreserved sperm of Pacific oyster with 15% of DMSO showed the highest survival rate and activation. Also, we observed the cryopreserved and thawed sperm with Scanning electron micrographs by CPAs and concentrations. Consequently, DMSO showed the lowest cell damage followed by EG, methanol, glycerol and the level was 15, 20, 10, 5% respectively. In a nutshell, it is proven that the optimum CPA and its level is 15% of DMSO.

Keywords : *Crassostrea gigas*, sperm, cryopreservation, cryoprotective agents

서 론

우리나라에서 굴, *Crassostrea gigas*은 매우 중요한 양식대상종으로 연간 양식에 필요한 종묘는 약 1,800만연이며, 이중 대부분이 자연채묘에 의한 천연종묘에 의지하고 있다. 그러나 최근 굴 인공종묘 생산기술 개발 및 보급으로 연간 약 10-15% 정도를 인공종묘로 대체하고 있다 (Hur *et al.*, 2008). 현재 국내에서는 40여개의 상업적인 굴 인공종묘배양장이 운영되고 있으며, 대부분의 인공종묘배양장의 채묘율이 20% 미만으로

인공종묘의 생산단가를 높이는 주요인으로 작용하고 있다 (Jeon *et al.*, 2012). 인공종묘는 천연종묘 보다 생산단가가 높고 대량생산이 어려움으로 단위면적당 생산량을 높여 생산 단가를 낮추는 것이 매우 중요하다. 따라서 안정적으로 저렴한 인공종묘를 보급하기 위해서는 생산단가를 줄일 수 있는 기술 개발이 매우 시급하다. 인공종묘의 생산단가를 줄이기 위해서는 우선 효율적인 인공채묘기술 및 대량생산기술 개발이 필요하다. 이 외에 생산단가를 줄일 수 있는 방안으로는 모패의 사육관리에 소요되는 경비를 줄이거나, 우량 굴의 배우자를 사용하여 건강한 종묘를 생산, 생산량을 증가시키는 방법이 있다. 정자냉동보존은 모패의 사육관리 소요비용 절감과 우량 개체간의 종 보존 및 선택교배를 한 번에 해결할 수 있는 방법이다.

최근 양식산업에 유용한 어패류 및 멸종위기 종의 배우자 저장기간 보존하려는 연구가 세계 각국에서 진행되고 있으며, 이중 정자냉동보존에 관한 연구는 이미 오래 전부터 활발히 진행되어왔다 (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

Received: September 3, 2013; Accepted: September 25, 2013

Corresponding author : Min Hwan Jeong

Tel: +82 (51) 720-2431 e-mail: mjeong5920@gmail.com
1225-3480/24494

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

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 |

$$SAI = \text{score} \times \% \text{ motile sperm} / 100.$$

채란채정의 비동시화 문제를 해결할 수 있으며, 수컷 어미의 사육관리에 소요되는 노력과 경비를 절약할 수 있다. 또한 우량 개체간의 선택교배를 가능하게 하고 우량종과 유전공학에 의해 생산된 신품종을 격리·보존하거나 멸종위기에 놓인 재래종의 보존을 간편하게 할 수 있는 장점을 가지고 있다 (Chang *et al.*, 1997; Choi *et al.*, 2007).

정자의 냉동보존 시 냉동/해동 후 정자의 생존율 및 운동성을 유지하기 위하여 다양한 희석액, 결빙억제제 (cryoprotective agent, CPA), 평형시간, 냉동률 및 해동온도 등에 대한 중별 최적조건을 탐색하게 되는데, 이중 CPA는 정자의 냉동/해동 시 빙결정형성 및 동해를 억제하는 핵심적인 역할을 한다. 정자의 냉동보존 시 주로 사용하는 CPA로 dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol (EG), propylene glycol (PG), glycerol, methanol 등이 있으며, 각각의 CPA는 독성이 있어 정자의 생존율 및 운동성을 감소시킨다. 따라서 연구대상 중별로 적정 CPA의 종류 및 농도 등의 조사가 필수적이다.

본 연구에서는 굴의 계획적인 인공종묘생산 및 우량형질의 정자 보존을 위하여 냉동보존 시 적정 CPA 및 농도를 탐색하고자, CPA 종류 및 농도별 독성 및 냉동보존 효과를 파악하고 해동 후 정자의 세포 손상을 조사하였다.

재료 및 방법

실험에 사용한 굴은 경상남도 거제시 둔덕면 학산리에 위치한 굴 인공종묘배양장에서 모패로 사용 중인 2년생 굴 (각장 90.9 ± 2.5 mm, 전중 62.3 ± 3.0 g, 30마리) 을 부산 기장군 국립수산물과학원 양식관리과 사육실로 수송하여 사용하였다. 패각을 분리한 후 생식소를 절개하여 채취한 정액은 1.5 mL 튜브에 넣어 얼음을 채운 용기에 보관하였다. 이후 채취한 정액 중 일부를 10 μ m 하우징 필터로 여과한 여과해수 (33 psu) 에 정액을 희석하여 정자의 생존율이 99% 이상으로, 운동성이 매우 활발한 정액만 실험에 사용하였다.

굴 정자의 CPA 종류 및 농도별 독성평가 분석을 위하여 CPA는 DMSO, EG, glycerol, methanol, 농도는 CPA의 최종농도가 각각 5, 10, 15, 20%가 되도록 하였다. CPA 종류

및 농도별 굴 정자의 독성평가를 위하여 각각의 CPA가 농도별로 첨가된 희석액에 정액을 100 : 1 넣고 정자의 생존율 및 운동성을 0, 20, 40, 60분 간격으로 측정하였다. 정자의 생존율 측정은 각각의 실험구별 정액을 5% eosin-10% nigrosin (Blom, 1950; Fribourgh, 1966) 에 염색한 다음, 정자의 염색 정도에 따라 생존 여부를 판별하였으며, 광학현미경으로 각각 3회 반복 측정하여 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 μ L씩 분주하여 cover slide 없이 광학현미경으로 관찰하였다. 정자의 운동성은 Table 1의 운동지수에 따라 점수를 부여하고, 각각의 운동점수와 운동정자의 비율에 따라 Strussmann *et al.* (1994) 의 방법을 변형하여 정자활성지수 (sperm activity index, SAI) 로 나타내었다.

CPA 종류 및 농도에 따른 굴 정자의 냉동보존 효과를 비교하기 위하여 희석액으로 여과해수, CPA는 DMSO, EG, glycerol 및 methanol를 사용하였으며, 농도는 각각 5, 10, 15 및 20%로 하였다. CPA가 농도별로 첨가된 희석액에 정액을 4 : 1의 비율로 희석하여 3분간 평형시간을 준 다음, 0.5 mL straw에 봉입한 이후 각 straw를 액체질소 증기 (-76°C) 로 3분간 1차 냉각 한 후, 액체질소 (-196°C) 로 급속 냉각하였다. CPA 종류 및 농도별로 냉동된 정액 straw를 액체질소에 보존 한 30일째에 25°C의 항온수조에 30초간 급속 해동한 후 정자의 생존율 및 운동성을 측정·비교하였다.

CPA 종류 및 농도별 해동 정자의 세포 손상 정도를 파악하기 위하여 냉동보존 중인 굴 정자를 25°C의 항온수조에 30초간 급속 해동한 후, 유리섬유 여과지 (pore size 0.45 μ m) 위에 흡착 시킨 다음 주사전자현미경 (scanning electron microscope, SEM) 관찰을 위한 전처리를 하였다. 전처리는 냉동/해동 정자를 0.1 M 인산완충액으로 수세하고, 2.5% glutaraldehyde로 1시간 동안 전 고정한 다음, 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5) 로 20분 동안 2-3회 수세하였다. 그 다음 샘플들을 경화시키기 위해 1% osmium tetroxide (OsO₄, Sigma) 로 1-2시간 고정한 후, 0.1 M 인산완충액으로 20분 동안 2-3회 세척하고, ethanol을 이용하여 70%부터

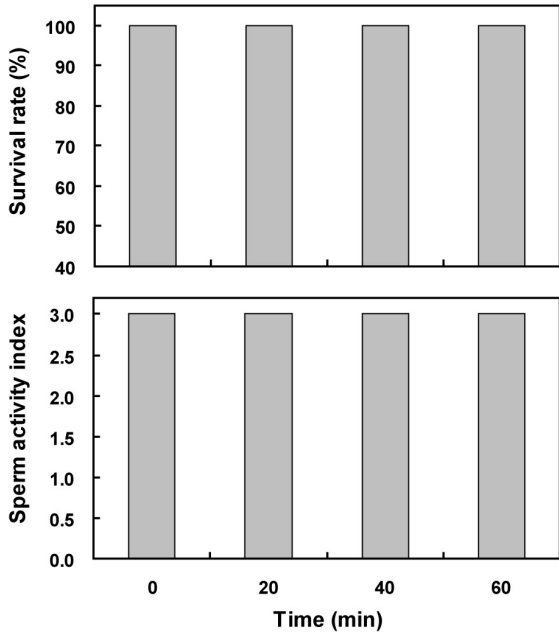


Fig. 1. Survival rate, sperm activity index and duration of activation of diluted fresh sperm of Pacific oyster with filtered seawater.

100%까지 각각 30분 동안 단계별로 탈수하였다. 이후 표본들은 amyl acetate로 30분씩 2회 치환하고, CO₂ 가스로 임계 건조 한 다음, 60초 동안 금이온 증착하여 SEM (S-3000N, Hitachi, Japan) 으로 관찰하였다.

모든 측정값은 평균±표준오차로 나타내었으며, 유의차는 SPSS-통계패키지 (version 12.0) 를 이용하여 one-way ANOVA-test (Duncan's multiple range test) 에 의해 검정하였다 ($P < 0.05$).

결 과

1. CPA 종류 및 농도별 침지시간에 따른 독성평가

CPA 종류 및 농도별 독성평가 전, 굴 정자의 운동지속시간을 측정하기 위하여 여과해수에 정액을 희석하여 생존율과 운동성을 측정 한 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이 1시간 이상 생존율과 운동성은 변화가 없었다.

CPA 종류 및 농도별 침지시간에 따른 굴 정자의 생존율은 Fig. 2에 나타낸 바와 같다. 5, 10, 15 및 20%의 DMSO, EG 및 glycerol에 침지한 굴 정자는 침지 60분까지 모두 100%의 생존율을 보였다. 5% methanol에 침지한 굴 정자는 침지 60

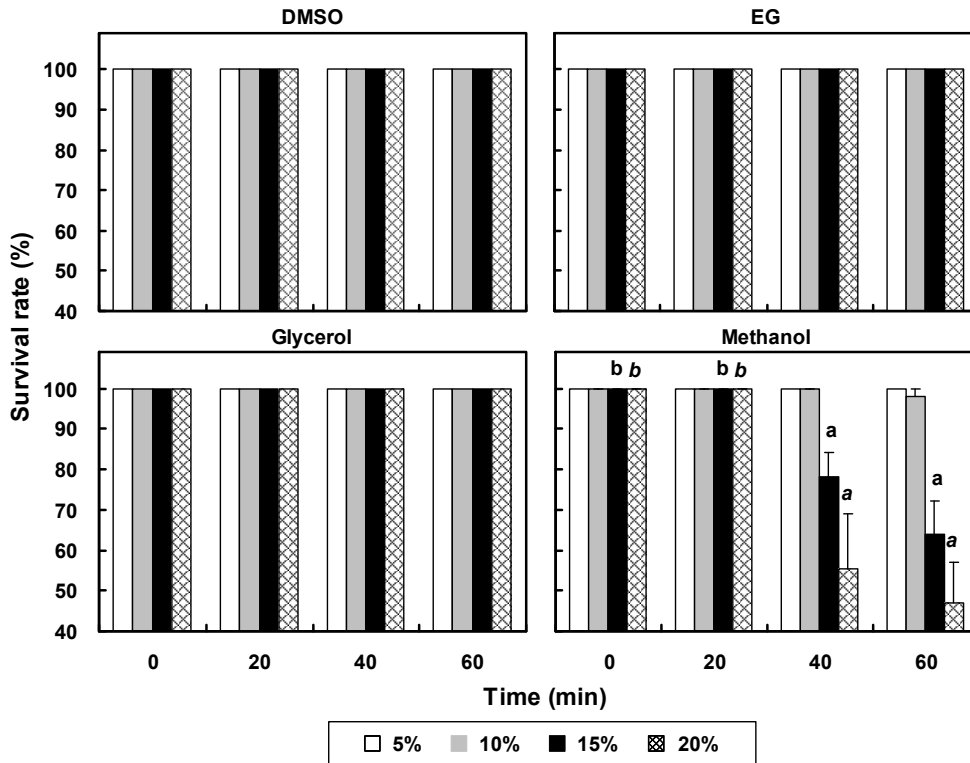


Fig. 2. Effects of cryoprotective agents, concentrations and immersion time on survival rate of fresh sperm of pacific oyster. Different small letters indicate significant differences between fresh sperm in each CPA concentration ($P < 0.05$). DMSO: dimethyl sulfoxide, EG: ethylene glycol.

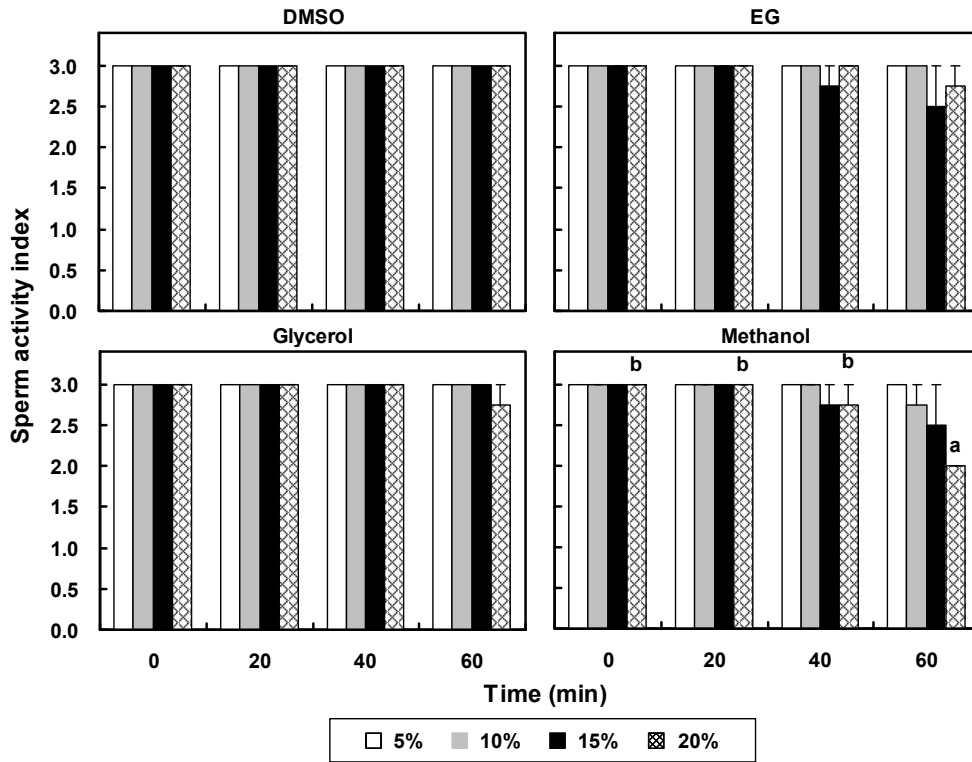


Fig. 3. Effects of cryoprotective agents, concentrations and immersion time on sperm activity index of fresh sperm of Pacific oyster. Different small letters indicate significant differences between fresh sperm in each CPA concentration ($P < 0.05$). DMSO: dimethyl sulfoxide, EG: ethylene glycol.

분까지 100%의 생존율을 보였으며, 10%에 침지한 굴 정자는 침지 40분까지 100%의 생존율을 나타내다가 침지 60분에 생존율이 $96.0 \pm 2.0\%$ 로 감소하였다. 15 및 20% methanol에 침지한 굴 정자는 침지 20분까지 100%의 생존율을 나타냈으나, 침지 40분부터 생존율이 유의하게 감소하였으며 ($P < 0.05$), CPA 농도가 높을수록 생존율은 크게 감소하였다.

CPA 종류 및 농도별 침지시간에 따른 굴 정자의 운동성은 Fig. 3에서 나타낸 바와 같이 DMSO에 침지한 굴 정자는 모든 농도에서 침지 60분까지 대조구인 fresh 정자와 같이 높은 SAI를 보였다. 5 및 10% EG 및 glycerol에 침지한 굴 정자는 침지 60분까지 SAI가 3.0으로 fresh 정자와 비슷하였다. 15 및 20% EG 및 glycerol에 침지한 굴 정자는 침지 40분부터 SAI가 다소 감소하였으나, 유의한 차이는 없었다 ($P > 0.05$). 5% methanol에 침지한 굴 정자는 침지 60분까지 SAI가 3.0으로 높았으며, 10 및 15% methanol에 침지한 굴 정자의 SAI는 침지 40분부터 감소하였으나 유의한 차이는 없었다 ($P > 0.05$). 20% methanol에 침지한 굴 정자는 침지 20분까지 SAI가 3.0으로 높았으나, 침지 40분부터 감소하여 침지 60분에는 SAI가 2.0으로 유의하게 감소하였다 ($P < 0.05$).

2. CPA 종류 및 농도별 냉동보존 효과

CPA 종류 및 농도별 냉동보존 굴 정자의 해동 후 생존율은 Fig. 4에 나타난 바와 같이 DMSO로 냉동보존 한 굴 정자의 생존율이 모든 농도에서 50% 이상의 생존율을 나타내었다. 특히 15% DMSO로 냉동보존 한 굴 정자의 해동 후 생존율은 $84.4 \pm 4.0\%$ 로 다른 농도 보다 유의하게 높았다 ($P < 0.05$). EG로 냉동보존 한 굴 정자의 생존율은 농도 15% ($62.2 \pm 4.0\%$)를 제외하고는 50% 이하로 낮았다. Glycerol과 methanol을 사용하여 냉동보존 한 굴 정자의 생존율은 모든 농도에서 20% 이하로 매우 낮았다.

CPA 종류 및 농도별 냉동보존 굴 정자의 해동 후 운동성은 Fig. 5에서 보는 바와 같이 DMSO로 냉동보존 한 굴 정자의 해동 후 SAI는 모든 농도에서 1.0 이상 이었다. 특히 15% DMSO로 냉동보존 한 굴 정자의 해동 후 SAI는 2.5로 다른 농도 보다 유의하게 높았다 ($P < 0.05$). EG로 냉동보존 한 굴 정자의 해동 후 SAI는 모든 농도에서 1.0 전후로 농도별 유의한 차이는 나타나지 않았다 ($P > 0.05$). Glycerol과 methanol을 사용하여 냉동보존 한 굴 정자의 해동 후 SAI는 모든 농도에서 0.5 이하로 매우 낮았다.

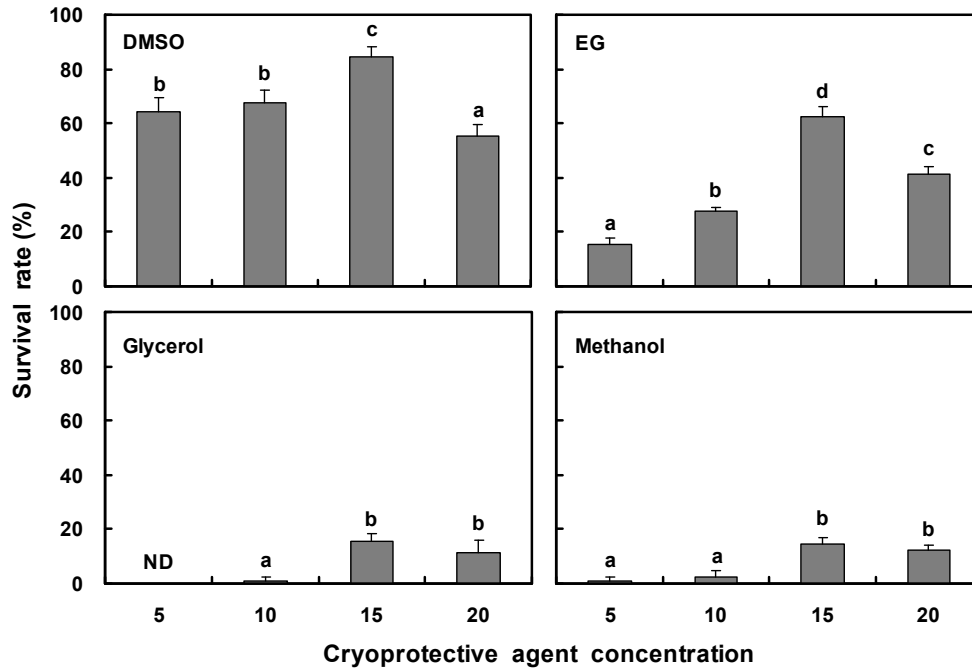


Fig. 4. Effects of cryoprotective agents and concentrations on survival rate of post-thawed sperm of Pacific oyster. Different small letters indicate significant differences between post-thawed sperm in each CPA concentration ($P < 0.05$). DMSO: dimethyl sulfoxide, EG: ethylene glycol.

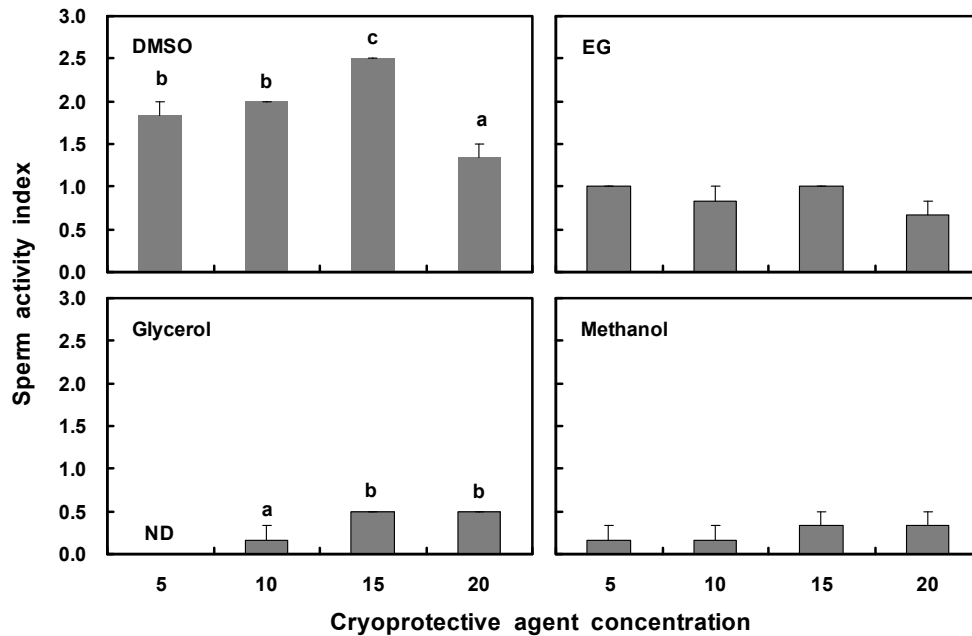


Fig. 5. Effects of cryoprotective agents and concentrations on sperm activity index of post-thawed sperm of Pacific oyster. Different small letters indicates significant differences between post-thawed sperm in each CPA concentration ($P < 0.05$). DMSO: dimethyl sulfoxide, EG: ethylene glycol.

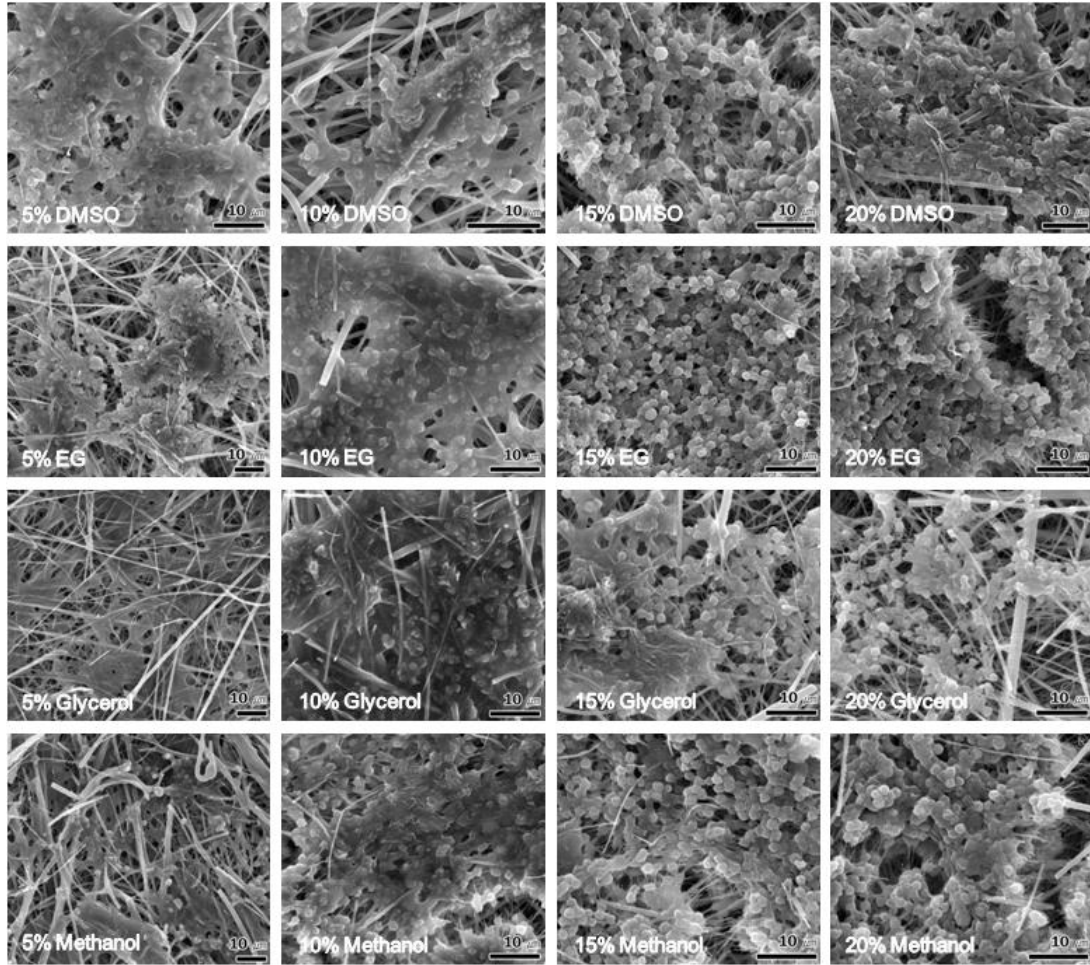


Fig. 6. Scanning electron micrographs images of post-thawed sperm of Pacific oyster by cryoprotective agents and concentrations. Bars: 10 µm. DMSO: dimethyl sulfoxide, EG: ethylene glycol.

3. CPA 종류 및 농도별 해동 정자의 세포 손상

CPA 종류 및 농도별 냉동보존 굴 정자의 해동 후 세포 손상을 조사한 결과는 Fig. 6에 나타난 바와 같다. DMSO를 사용하여 냉동보존 한 굴 정자의 해동 후 세포 손상은 모든 농도에서 거의 관찰되지 않았다. 15, 20% EG를 사용하여 냉동보존 한 굴 정자의 해동 후 세포 손상은 거의 관찰되지 않은 반면, 5, 10% EG로 냉동보존 한 굴 정자는 해동 후 핵의 변형과 꼬리 절단이 일부 관찰되었다. Glycerol을 사용하여 냉동보존 한 굴 정자의 해동 후 세포 손상은 모든 농도에서 관찰되었으며, 5% glycerol로 냉동보존 한 정자는 대부분 핵과 꼬리가 절단되어 있었다. Methanol을 사용하여 냉동보존 한 굴 정자는 15, 20%에서는 세포 손상이 적었으나, 5% methanol로 냉동보존 한 굴 정자는 5% glycerol로 냉동보존 한 굴 정자와 비슷한 경향을 보였다. CPA별 해동 후 굴 정자의 핵의 변형과 꼬리 절단 등 세포 손상은 glycerol이 가장 심각하였으며, methanol, EG, DMSO 순으로 세포 손상이 적었다. 각각의

CPA 농도별 굴 정자의 해동 후 세포 손상은 모든 CPA에서 5% 농도가 가장 많았으며, 10, 20, 15% 순으로 세포 손상이 적었다.

고찰

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 외부로 방출되면 수분에서 수신편 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 인공해수 (artificial seawater, ASW), 인공정장 (artificial seminal plasma, ASP), glucose, Ringer's solution, MFRS

(marine fish Ringer's solution), sucrose 등 여러 가지 희석액을 농도를 달리하여 사용하고 있다. 본 연구에서 굴 정자의 운동지속시간을 측정하기 위하여 여과해수를 사용한 결과, 1시간 이상 생존율과 운동성에 변화가 없어 희석액으로 여과해수를 사용하였다.

CPA는 정자냉동보존 시 가장 중요한 요소로 세포 내 삼투질농도와 빙결정형성 등을 완화·조절하는 역할을 한다 (Jamiseon, 1991). 따라서 CPA는 중성물질이어야 하며, 친수성이 강하고, 세포막에 대한 투과성이 높고, 세포에 대한 독성이 적어야 한다 (Kuвано and Saga, 2000). 그러나 현재 사용하고 있는 CPA는 각각의 독성을 가지고 있으며, 이러한 독성이 증가다 작용하는 특이성을 가지고 있기 때문에 적합한 CPA 종류 선택 및 농도 탐색은 매우 중요하다. 본 연구에서 CPA의 독성이 굴 정자의 생존율 및 운동성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 독성평가를 실시한 결과, DMSO, EG 및 glycerol의 독성은 굴 정자의 생존율 및 운동성에 큰 영향을 미치지 않았다. 그러나 고농도의 methanol에 노출시킨 굴 정자는 노출시간이 길어질수록 생존율과 운동성이 급격히 감소하는 경향을 보여 methanol의 독성이 굴 정자에 영향을 미치는 것으로 판단된다.

Dong *et al.* (2005) 은 굴 정자의 냉동보존 연구에서 calcium-free Hank's balanced salt solution (C-F HBSS, 1,000 mOsm/kg) 을 희석액으로 사용하여 6% methanol로 분당 -5°C 씩 냉동보존 한 정자의 운동성과 수정률을 조사한 결과, 각각 70%, 98%로 DMSO나 PG 보다 좋았다고 보고하였다. Yang *et al.* (2012) 은 버지니아 굴, *Crassostrea virginica* 정자의 냉동보존 연구에서 C-F HBSS를 희석액으로 사용하여 10% DMSO로 냉동보존 한 정자의 운동성과 수정률이 각각 34%, 77%로 10% methanol이나 10% PG보다 좋았다고 보고하였다. 본 연구에서 여과해수를 희석액으로 사용하여 15% DMSO로 냉동보존 한 굴 정자의 해동 후 생존율과 SAI는 각각 84.4%, 2.5로 매우 높은 것으로 나타났다. 그러나 glycerol과 methanol을 사용하여 냉동보존 한 굴 정자의 해동 후 생존율과 SAI는 모두 20% 미만, 0.5 이하로 매우 낮았다. SEM을 이용하여 CPA 종류 및 농도별로 30일간 냉동보존 한 정자의 해동 후 상태를 관찰한 결과, DMSO를 사용하여 냉동보존 한 정자는 핵의 변형 및 꼬리 절단 등 세포 손상이 적었다. 그러나 glycerol과 methanol을 사용하여 냉동보존 한 정자는 CPA의 농도가 낮을수록 세포 손상이 많이 관찰되어, 본 연구의 CPA 종류 및 농도별 해동 정자의 생존율 및 운동성 결과와 일치하였다. 따라서 굴 정자의 냉동보존 시 희석액을 여과해수로 사용할 경우, 정자의 세포 손상을 최소화하고 생존율과 운동성을 최적으로 유지하는 CPA 및 농도는 15% DMSO로 판단된다.

본 연구에서는 굴 정자의 냉동보존 시 적정 CPA는 15% DMSO 이었으나, 동일종의 정자를 냉동보존 한 Dong *et al.* (2005) 의 연구에서는 6% methanol 이 가장 좋은 것으로 보고하고 있다. 이러한 결과의 차이는 희석액으로 사용한 용액의 종류에 의해 나타난 것으로 추정된다. 그러나 단순히 희석액의 종류에 의해 이런 결과가 나타난 것으로 판단하기에는 정자냉동보존 시 평형시간, 냉동률 및 해동온도 등 변수가 많으므로, 굴 정자의 냉동보존 시 적정 희석액, CPA, 평형시간, 냉동률 및 해동온도 등 여러 가지 요인에 대해 보다 세부적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 국립수산과학원 수산시험연구과제인 어항을 활용한 어촌관광형 다영양입체양식 (IMTA) 기술 개발 (RP-2013-AQ-150) 의 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

요 약

본 연구에서는 굴, *Crassostrea gigas*의 계획적인 인공종묘 생산 및 우량형질의 정자를 보존하기 위하여 냉동보존 시 적정 결빙억제제 (cryoprotective agent, CPA) 및 농도를 알아보고자, CPA 종류 및 농도별 독성 및 냉동보존 효과를 파악하고 해동 후 정자의 세포 손상을 조사하였다. CPA 종류 및 농도별 침지시간에 따른 굴 정자의 독성평가를 실시한 결과, 생존율 및 운동성은 DMSO가 가장 좋았으며, 다음으로 EG, glycerol, Methanol 순이었다. 희석액으로 여과해수를 사용하여 CPA 종류 및 농도별 냉동보존 결과, 15% DMSO로 냉동보존 한 정자의 생존율 및 운동성이 가장 높았다. 굴의 냉동/해동 정자를 주사전자현미경으로 관찰한 결과, DMSO, EG, methanol, glycerol 순으로 세포 손상이 적었으며, 농도는 15, 20, 10, 5% 순이었다. 이상의 결과를 종합한 결과, 굴 정자의 냉동보존 시 여과해수를 희석액으로 사용할 경우 적정 CPA는 DMSO이며, 농도는 15%였다.

REFERENCES

- Billard, R., Cosson, J., Noveiri, S.B. and Pourkazemi, M. (2004) Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. *Aquaculture*, **236**: 1-9.
- Blom, E. (1950) A one-minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. *Fertil. Steril.*, **1**: 176-177.
- Chang, Y.J. and Chang, Y.J. (2002) Milt properties of four flatfish species and fine structure of their cryopreserved spermatozoa. *J. Fish. Sci. Tech.*, **5**: 87-96.
- Chang, Y.J., Chang, Y.J. and Lim, H.K. (1997) Cryopreservation of tiger puffer (*Takifugu rubripes*) sperm. *Dev. Reprod.*, **1**: 29-36.

- Choi, Y.H., Jo, P.G., Kim, T.I., Bai, S.C. and Chang, Y.J. (2007) The effects of cryopreservation on fine structures of pearl oyster (*Pinctada fucata martensii*) larvae. *Dev. Reprod.*, **11**: 79-84.
- Dong, Q., Huang, C., Eudeline, B. and Tiersch, T.R. (2005) Systematic factor optimization for cryopreservation of shipped sperm samples of diploid Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Cryobiology*, **51**: 176-197.
- Fribourgh, J.H. (1966) The application of a differential staining method to low-temperature studies on goldfish spermatozoa. *Prog. Fish-Cult.*, **28**: 227-231.
- Hur, Y.B., Min, K.S., Kim, T.E., Lee, S.J. and Hur, S.B. (2008) Larvae growth and biochemical composition change of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*, larvae during artificial seed production. *J. Aquacult.*, **21**: 203-212.
- Jamieson, B.G.M. (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. xiv 319 pp.
- Jeon, C.Y., Hur, Y.B. and Cho, K.C. (2012) The effect of water temperature and salinity on settlement of Pacific oyster, *Crassostrea gigas* pediveliger larvae. *Korean J. Malacol.*, **28**: 21-28.
- 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. pp. 23-40. Science Publishers Inc., New Hampshire.
- Ohta, H. and Izawa, T. (1996) Diluent for cool storage of Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. *Aquaculture*, **142**: 107-118.
- Strussmann, C.A., Renard, P., Ling, H. and Takashima, F. (1994) Motility of pejerrey *Odontesthes bonariensis* spermatozoa. *Fish. Sci.*, **60**: 9-13.
- Yang, H., Hu, E., Cuevas-Urib, R., Supan, J., Guo, X. and Tiersch, T.R. (2012) High-throughput sperm cryopreservation of eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Aquaculture*, **377-349**: 223-230.