

Thoroughbred 정액의 액상 보존에 관한 연구

고태혁 · 김한섭 · 이상호* · 송해범**

한국마사회

Preservation of Extended Thoroughbred Semen at Low Temperature

Ko, T.H., H.S. Kim, S.H. Lee* and H.B. Song**

Korean Horse Affairs Association

SUMMARY

Equine semen was analysed for its survival after storage under different conditions. Total 12 ejaculates from 2 Thoroughbred were analysed for general characteristics and preservation at low temperature. The sperm fraction, concentration, and the rate of motile spermatozoa were 57.9ml per ejaculate, 2.18×10^8 /ml and 74.1%, respectively. The survival rate of spermatozoa was highest when diluted semen with E-Z Mixin was stored at 7~8°C.

The optimum survival rate(>54%) can be obtained upto 24h at 7~8°C. However only 10% spermatozoa survived after 5h storage at 7~8°C without use of E-Z Mixin. Other ranges of temperature(15°C and room temperature) gave less survival rates(<25%).

These results indicate that the extender could be used as a basic solution for the preservation of equine spermatozoa at low temperature. It also provides a practical method for short-term storage of collected equine semen in a simple manner.

I. 서론

가축에 대한 인공수정은 경제적 효용가치가 높은 소, 돼지 및 닭 등에서는 연구가 활발히 진행되어 왔고 실용화되어 널리 이용되고 있으나, 기계화 문명이 발달되어 상대적으로 효용가치가 떨어진 마필에 대한 연구는 비교적 활발하게 이루어지지 않고 있다. 그러나 1776년 Spallanzini에 의한 마필 정자의 저온처리 효과에 대한 연구가 이루어진 이래 마필 정자의 보존에 대한 연구가 부분적으로 이루어져 보존기간 연장에 필요한 여러 가지 요인들에 대한 연구가 수행되어 왔다. 특히 마필 정액의 희석액에 대한 연구는 우유, 난황 및 셀라틴 등을 기초로 하여 기본적인 염용액에 에너지 공급원인 glucose와 냉해 보호제인 glycerol 첨가 등으로 다양

한 희석액의 조성이 보고되어 있다(Ebertus, 1963; Nishikawa et al., 1968; Rajamannan et al., 1968; Hughes & Loy, 1970; Anderson, 1971; McCall & Sorensen, 1971).

이들 다양한 희석액은 마필의 번식능력 향상을 위한 정액의 희석, 보존 등에 이용되어 실제적으로 이용되어 왔다. 우리 나라에서도 소에 대한 인공수정은 실용화가 되어 있고, 돼지에 있어서도 일부 실용화되어 있으나 말에 대해서는 전무한 실정이다. 그러나 국민소득 증대에 따른 레저산업 발달에 힘입어 경마산업이 증가일로에 있으며, 이에 따른 마필의 수요도 증가되고 있어 마필의 자급, 재래마의 보존 및 번식능력 향상을 위한 점진적인 연구로 그 수요에 대응하여야 할 것이다.

본 연구는 국내 마필 생산의 활성화의 일환으로 인공

*고려대학교 축산학과(Dept. of Anim. Sci., Korea University)

**대구대학교 축산학과(Dept. of Anim. Sci., Taegu University)

수정실험을 위한 기초실험으로서 마린 정액의 일반성상 검사 및 동결보존의 예비적 기술축적을 위해 일정한 상 임용 희석액을 이용하여 Thoroughbred 정액의 단기 저장을 위한 시험에 착수하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시동물

공시동물로는 5~6세령의 종모마(Thoroughbred) 2마리를 사용하였으며, 사양관리는 NRC 사양 표준(1977)에 맞추어 실시하였다.

2. 정액의 채취

정액은 인공질(CSU Model EAVK 100, ARS 사, U.S.A.)을 이용하여 5월부터 7월까지 1주 간격으로 오전 10~11시 사이에 채취하였으며, 인공질 내통의 온도는 47~49℃로 조절하고 내통의 유회액은 K Y Jelly(Johnson & Johnson, U.S.A.)를 사용하였다.

3. 정액 성상 검사

1) 정액량

Gel fraction 및 sperm rich fraction은 Nylon filter(pore size 37 μ m, SAVF-101, ARS 사, U.S.A.)를 사용하여 분리시킨 후 그 양을 측정하였다.

2) 정자농도

소량의 sperm rich fraction을 증류수로 200배 희석시킨 후 haemocytometer(AO 사, U.S.A.)를 사용하여 정자수를 계산하였다.

3) 정자의 생존성

실온으로 조절된 희석액으로 정액을 혼합하여 38℃로 가운치킨 glass slide 위에 10 μ l를 취하여 cover slip

으로 덮은 다음 활발한 운동성을 보이는 정자를 조사하였다.

4. 정자의 보존

E-Z Mixin(NFDMS Glucose) 희석액(Table 1)을 사용하여 희석한 후 워터 냉각에 의해 각각 7~8℃, 15℃ 및 22℃(실온)에서 일정 시간동안 저장한 후 그 생존성을 검토하였다.

Table 1. Composition of E-Z Mixin*

Ingredients	g/100ml
Glucose monohydrate	4.90g
Non fat dry milk(Sanalac)	2.40g
Sodium bicarbonate	0.15g
Polymixin B sulfate	10 ⁶ IU

*pH was adjusted to 6.99 \pm 0.2.

The range of osmolarity was 372 \pm 2mOsm kg.

III. 결과 및 고찰

1. 채취 정액의 일반적 성상

정액 채취후 나타난 일반적인 정액 성상은 Table 2와 같다.

정액량, 정자농도, 활력 및 기형율은 각각 57.9ml, 2.18 \times 10⁶/ml, 74.1% 및 43.8%로 나타났으며, 채취 기간 중 비록 그 값의 범위는 상당히 차이가 있는 것이 있었으나 Dovesett와 Pattie(1982)가 발표한 번식계절 중의 정액 성상 검사치와 유사한 경향을 보였으며, Rousset 등(1987)이 발표한 비번식계절 중의 성상 검사치와 비교하여 볼 때, 본 실험은 기형율이 43.8%인데 반해 Rousset는 28.6%로서 본 실험의 결과가 높

Table 2. Various parameters of Thoroughbred semen used in this study*

Parameters	Mean	Range
Total volume(ml)	65.7	25 ~ 110
Gel free volume(ml)	57.9	20 ~ 90
Gel volume(ml)	10.7	5 ~ 20
Sperm conc. (10 ⁶ /ml)	218.0	93 ~ 256
Motile spermatozoa(%)	74.1	65 ~ 82
Normal morphology(%)	56.2	43.7~63.5
Abnormal morphology(%)	43.8	36.5~57.3

*The results were obtained from 3 replicates.

았다.

이를 제외한 다른 항목들에서는 본 실험의 결과보다 바람직한 정상 결과를 보였는데 이는 본 실험에서 적절한 계절을 선택했기 때문인 것으로 추정된다. 즉 정액성상은 계절(Pickett et al., 1976, 나이(Amann et al., 1983), 사용빈도(Sullivan & Pickett, 1975) 및 개체차와 추정오차(Palmer & Fauquerot, 1985) 등에 영향을 받는다고 하였으며, 이에 따라 진정한 정액 성상은 정확하게 측정하기 곤란하며 정액성상 검사치에 따른 종모마의 번식능력을 예측하기는 어렵다고 하였다(Dowesett & Pattie, 1982).

또한 Kenney 등(1971)은 배란시기의 정확한 예측, 생식도관의 감염 여부 및 종모마의 중부횡수(사용빈도) 등이 번식율에 영향을 준다고 하였고, 정액량은 그 농도와 양으로서 총 정자수를 결정하게 되며, 종모마의 번식능력을 판정하는 객관적인 지표가 될 수 있다고 보고하고 있다.

한편 종모마의 연령에 따른 번식능력은 10~13세까지 번식능력이 증가 또는 유지되며, 14세 이후부터 서서히 감소된다고 하였으나(Saunders, 1926; Merket et al., 1979), Voss 등(1981)은 정자의 활력 및 형태 등의 측면에서 마릴의 번식능력과 상관관계가 적다고 보고하였다. 그러므로 이와 같은 정액성상 검사는 보다 객관성 있는 평가를 추구함과 더불어 이와 같은 검사 결과는 현재로서는 번식능력의 일면만을 보여주는 것으로 수용하는 것이 올바른 논리일 것이다. 즉 마릴의 정액성상은 종모마로 사용하기 위한 가장 기초적인

판단의 자료로 사용하는 것이 타당할 것이다(Dowesett & Pattie, 1982).

2. 정자의 보존

채취한 정액(sperm rich fraction)을 10분 이내에 38°C로 가온시킨 E Z Mixin을 사용하여 희석시킨 후 각각의 보존시간에 따른 생존율을 검사한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다.

Table 3에서 보는 바와 같이 가장 뚜렷한 현상은 모든 온도조건에서 원정액의 경우 5시간 보존에 10~20%의 생존율을 보여 거의 사멸한데 비하여 희석 정액의 경우에는 7~8°C에서 4일간 보존하였을 때 유사한 생존율을 보이고 있어 희석액의 정자운동 보존성은 매우 우수한 것으로 간접적으로 알 수 있다.

특히 24시간 보존 후에도 거의 50%이상의 생존성을 보이고 있어 이와 같은 시간 및 온도조건에서의 보존은 동결을 이용하지 않는 매우 실용적이고 간단한 보존방법으로 용이하게 어느 곳이나 이용될 수 있으리라고 생각된다. 특히 이 같은 온도를 서하시키지 않고도 15°C 및 실온에서 약 5시간까지는 아무런 문제없이 55% 이상의 생존성을 보여서 마릴의 번식 관리 및 업무의 연결성을 위해 단시간 보존할 수 있는 가능성을 암시해주는 결과이다.

이상의 결과는 Hillmann 등(1980)이 보고한 38°C에서 보존 후의 결과와 유사한 경향을 보였으나, Bobart와 Mayer(1950)에 의한 6~8°C에서 24시간 보존 후 사멸하였다고 보고와는 상이한 결과를 나타내

Table 3. The rate of survival of stored Thoroughbred spermatozoa under different conditions

Periods of storage (hr)	% survival of spermatozoa stored at					
	7~8°C		15°C		RT	
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)*	(+)**
1	40	65	50	62	50	64
5	10	64	20	63	10	55
12	0	58	10	47	0	15
24	0	54	0	25	0	0
48	0	25	0	14	0	0
72	0	18	0	0	0	0
96	0	12	0	0	0	0

*(-) : Undiluted semen

**(+): Diluted semen

고 있다.

본 실험의 경우 7~8°C에서 12시간 보존 후의 생존율 58%는 Douglas-Hamilton 등(1984)이 보고한 10~13시간 후의 생존율 약 76%에 비해서는 다소 낮았으나, 15°C에서 보존 후의 생존율은 40~50%로서 Francel 등(1987)이 보고한 19~38%의 생존율보다는 높은 경향을 나타내었다.

이와 더불어 지적될 사항은 24시간 보존 후의 생존율은 7~8°C 및 15°C에서 각각 54.3% 및 20~30%를 나타내어 7~8°C에서 보존시 높은 성적을 나타내고 있으나 상온에서는 모두 사멸한 결과와 원정액이 각 보존온도에서 단시간 밖에 생존치 못하는 이유로는 희석액에는 에너지원 및 항생물질을 포함하고 있는 데 반하여 원정액 내에는 제한된 대사물질과 항생물질의 부재에 따른 오염 미생물의 증식으로 인한 정액의 성상변화 가능성을 생각할 수 있으나 이를 구명하기 위해서는 별도의 실험 설계에 의한 해명이 필요할 것으로 생각된다.

이상의 결과에서 보듯이 마필의 정자는 15°C 및 상온에서 보존시켰을 때보다 7~8°C에서 보존시 생존율 및 보존기간이 증가하였다. 그러나 이 결과는 Province 등(1985)이 보고한 결과와는 상반된 경향을 보인 것이며, 이와는 반대로 Householder 등(1981)이 발표한 보존온도 증가는 생존율의 저하를 초래한다는 결과와 유사한 경향을 나타내고 있다.

이는 냉각속도의 차이에서 기인된다고 추정되는 데, Province 등이 연구한 $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 냉각조건에서는 20°C에서의 보존성적이 좋았던 반면, 본 실험의 $-0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 조건에서는 7~8°C에서의 보존성적이 더 우수하였다. 이는 보존온도와 생존율과의 차이는 냉각속도와 개체차에 기인될 수 있다는 Pickett 등(1987)의 발표에서도 알 수 있다.

따라서 마필 정자의 저온 보존시 적정보존온도, 보존가능기간 및 보존에 영향을 주는 요인들에 대한 연구가 보다 깊이 이루어져야 한다고 추정되며, 특히 Francel 등(1987)은 액상정액에 의한 수정란 회수율이 활력이 38 및 17%일 때 각각의 회수율이 50.0 및 61.7%라고 하였고, 또한 Voss 등(1981)의 정자활력과 마필의 번식능력간의 상관관계가 적었다는 보고는 불 때 활력이 높다고 번식능력이 우수하다고 단정 지을 수 없으며, 정자의 수정능력을 평가할 수 있는 분석방법들을 고려하여 결정되어야 할 것이다.

예를 들면 투명대 제거 난자의 침입율이나 난포란의

침입율 및 직접적인 인공수정에 의한 임신유기 등의 방법으로 그 상관관계가 연구되어야 할 것이며, 그와 같은 연구가 현재 진행중이므로 이들의 결과를 지켜보아야 할 것이다.

이상의 결과에서 E-Z Mixin 희석액을 사용하여 저온보존할 경우 약 12~24시간 동안 정자의 생존율이 원정액에 비해 크게 떨어지지 않는 수준으로 보존될 수 있으며, 이와 같은 결과는 정자의 동결보존을 위한 기초자료로서 이용될 수 있을 것이다. 이와 더불어 동결 희석액의 개선 및 화립을 위한 연구에 기초 조성 희석액으로 이용 가능성을 보여준 것이다.

IV. 적 요

경주마의 인공수정을 실시하기 위한 예비실험으로서 정액의 일반적 성상 및 액상보존시 온도와 시간에 따른 정자의 보존성을 검토하였다. 2두의 종모마에서 채취한 정액의 일반적인 성상은 1회 채취정액량 57.9ml, 정자농도 $2.18 \times 10^6/\text{ml}$ 및 생존 정자는 74.1%였다.

동결보존의 기초자료를 마련하기 위한 실험에서 상업용 희석액인 non-fat dried milk-solids glucose (NFDMS-Glu)를 이용, 여러가지 희석배율(0, 5, 10, 20 및 25배) 및 온도(7~8, 15 및 22°C)에서 정자의 액상보존시 최적조건을 결정하였다. 7~8°C에서의 액상보존이 최대의 생존성을 보였으며 희석배율간에는 큰 상이점이 없었다.

정자의 생존지속시간은 온도가 높을수록 감소하여 7~8, 15 및 22°C에서 각각 96, 48 및 12시간이었다. 각 온도별 운동정자의 비율은 12시간 보존의 경우 7~8, 15 및 22°C에서 각각 58, 47 및 15%를 보여 7~8°C에서 생존지속시간이 가장 길고 운동성이 높은 것으로 나타났다.

이상의 결과는 NFDMS-Glu 희석액을 이용하여 액상보존을 할 경우, 약 12시간 동안 정자의 생존성 및 운동성이 원정액과 동등한 수준으로 보존할 수 있다는 가능성을 보여준 것이며 정자의 동결보존시 기초자료로 이용될 수 있을 것이다.

V. 인용문헌

1. Anderson, E.W. 1971. Equine semen

- extenders. M.S. Thesis. Colorado State Univ., Fort Collins, Colorado, U.S.A.
2. Amann, R.P., P.R. Loomis and B.W. Pickett. 1983. Improved filter system for an equine artificial vagina. *J. Equine Vet. Sci.* 3: 120-125.
 3. Bielanski, W. 1975. The evaluation of stallion semen in aspects of fertility control and its use for artificial insemination. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 23: 19-24.
 4. Catanzaro, T.E. 1975. Collection of stallion semen. *Vet. Med. Small Anim. Clin.* 70: 333-336.
 5. Dovesett, K.F. and W.A. Pattie. 1982. Characteristics and fertility of stallion semen. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 32: 1-8.
 6. Ebertus, R. 1963. The dilution of stallion semen with whole cow milk. *Anim. Breeding Abstr.* 31: 313.
 7. Francel, A.T., R.P. Amann, E.L. Squires and B.W. Pickett. 1987. Motility and fertility of equine spermatozoa in a milk extender after 12 or 24hr at 20°C. *Theriogenology* 27: 517-535.
 8. Froman, D.P. and R.P. Amann. 1983. Inhibition of motility of bovine, canine and equine spermatozoa by artificial vagina lubricants. *Theriogenology* 20: 357-361.
 9. Hillman, R.B., T.T. Olar, E.L. Squires and B.W. Pickett. 1980. Temperature of the artificial vagina and its effect on seminal quality and behavioral characteristics of stallion. *J. Am. Vet. Med. Assn.* 177: 70
 10. Hughes, J.P. and R.G. Loy. 1970. Artificial insemination in the equine: A comparison of natural breeding and artificial insemination of mares using semen from six stallions. *Cornell Vet.* 60: 463.
 11. Kenny, R.M., R.S. Kingston, A.H. Rajamannon and C.F. Rambers. 1971. Stallion semen characteristics for predicting fertility. *Proc. 17th Ann. Conv. Am. Ass. Equine Pract.*, Chicago, pp.53-67.
 12. McCall, J.P., Jr. and A.M. Sorensen, Jr. 1971. Evaporated milk as an extender for stallion semen. *A.I. Digest.* 19: 8-10.
 13. Merket, H., K.O. Jacobs and E. Aukes. 1979. An analysis of stallion fertility rates (foals born alive) from the breeding documents of the Landgestut Celle over a 158-year period. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 27: 73-77.
 14. Nishikawa, Y., Y. Waide and S. Shinomiya. 1968. Studies on deep freezing of horse spermatozoa. *Proc. VI. Internat. Congr. Anim. Reprod. A.I.* 2: 1589.
 15. N.R.C. 1977. Nutrition requirement of horse. The National Academy of Science. Washington, D.C., U.S.A.
 16. Pickett, B.W., J.J. Sullivan and E. Seidal, Jr. 1975. Reproductive physiology of the stallion: V. Effect of frequency of ejaculation on seminal characteristics and spermatozoal output. *J. Anim. Sci.* 40: 917-923.
 17. Pickett, B.W., L.C. Faulkner, G.E. Seidel, W.E. Berndston and J.L. Voss. 1976. Reproductive physiology of the stallion: IV. Seminal and behavioral characteristics. *J. Anim. Sci.* 43: 617-625.
 18. Pickett, B.W. and R.P. Amann. 1987. Extension and storage of stallion semen: A review. *Equine Vet. Sci.* 7: 289-302.
 19. Province, C.A., R.P. Amann, B.W. Pickett and E.L. Squires. 1984. Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5°C. *Theriogenology* 22: 409-415.
 20. Province, C.A., E.L. Squire, B.W. Pickett & R.P. Amann. 1985. Cooling rate, storage temperature and fertility of extended equine spermatozoa. *Theriogenology* 23: 925-934.
 21. Rajamannan, A.H., J.R. Zemjanis & J.

- Ellery. 1968. Freezing and fertility studies with stallion semen. Proc. VI. Internat. Congr. Anim. Reprod. A. 1. 2: 1601.
22. Rousset, H., Ph. Chanteloube, M. Magistrini & E. Palmer. 1987. Assessment of fertility and semen evaluation of stallion. J. Reprod. Fert., Suppl. 35: 25-31.
23. Sanders, H.G. 1920. On the fertility of stallion. J. Agric. Sci. (Cambridge) 16: 466-491.
24. Voss, J.L., B.W. Pickett & E.L. Squires. 1981. Stallion spermatozoal morphology and motility and their relationship to fertility. J. Am. Vet. Med. Assn. 178: 287-289.
25. White, I.G. & R.G. Wales. 1960. The susceptibility of spermatozoal to cold shock. Int'l. J. Fert. 5: 175-201.