

개 정액의 보존시 glycerol 첨가 및 정장제거가 정자의 성상에 미치는 영향

김 계 성

서울대학교 수의과대학
(1993년 5월 20일 접수)

Effects of glycerol and seminal plasma in characteristics of preserved canine spermatozoa

Kye-seong Kim

College of Veterinary Medicine, Seoul National University

(Received May 20, 1993)

Abstracts : Multiple ejaculates were collected from four male mongrel dogs. The second fraction and the small volume of third fraction from the ejaculates were divided and treated as follows : control; addition of the egg-yolk Tris extender to the semen at 37°C. group I; Removal of seminal plasma, group II; addition of the glycerolated extender at 4°C, group III Removal of seminal plasma and addition of glycerolated extender at 4°C. The semen cooled to 4°C was equilibrated for 2hrs and preserved in refrigerator at 4°C. The preserved semen was evaluated for kinetics, morphology, motility and thermoresistance daily for 3 days.

1. The kinetics after preserved days 2 and 3 of group I was significantly higher than that of control($p < 0.05$).
2. There were no significant difference in abnormal morphology of each group between the periods of storage.
3. The motility after preserved day 1 and days 3 of group I was significantly higher than that of others($p < 0.05$), and the motility after preserved days 2 of group I and III was significantly higher than that of others($p < 0.05$).
4. When the motility of preserved semen was measured during incubation at 37°C, the motility of four groups was declined at similar rates. There was no effect of removal of seminal plasma and glycerol addition on thermoresistance.

Key words : canine spermatozoa, glycerol, seminal plasma, preservation.

서 론

동물의 인공수정은 Spallanzani(1780)가 처음으로 개의 신선정액을 암캐에 주입하여 수태에 성공한 이래 이에 관련하여 연구가 수행되어 왔다.¹ 산업동물인 소에서는 이미 동결정액의 사용이 일반화되어 있으나 개에서는 아직도 실용화 단계에 이르지 못하고 있다.

개의 인공수정에 사용되는 정액은 신선정액, 단기간 보존한 정액 그리고 동결정액 등으로 나눌 수 있다. 정액을 단기간 보존하기 위한 방법으로 Davis² 등은 여러 종류의 희석액으로 정액을 희석후 냉각시켜 수일동안 보존한후에도 수정능이 보존될 수 있다고 하였다. 냉각정액을 이용한 인공수정은 교배를 위해 암캐를 운반하는 수고나 정액을 동결하는데 소요되는 복잡한 과정과

비용을 줄일 수 있다. 최근에는 동결정액에 의한 낮은 수태율때문에 정액의 단기보존에 관하여 관심이 증가되고 있다. 먼저 동결과정에 기인하는 손상이 없고, 압개의 생식도관내에서 더 오래 생존하여 수정이 이루어질 기회가 많아지기 때문이다. 그러나 장기간 보존하는 데에는 정액을 동결하는 것이 더 유리하다.³

개 정액을 20% egg yolk extender를 사용해서 2~4일 동안⁴ 또는 4~8일 동안^{2,5} 냉각보존하여 50%의 운동성이 유지되었다는 보고가 있으며, Seager와 Fletcher⁶는 1~4일간 저장한 정액으로 수정하여 53%의 수태율을 보고하였다.

Foote⁷등은 5°C에서 소 정액을 보존시 회석액에 glycerol을 첨가하는 것이 정자의 수정능 유지에 유의하다고 보고하였다. Wilmit과 Polge⁸는 돼지정액을 5%나 10% glycerol이 첨가된 회석액에서 보존시에 20°C에서 6시간 배양한 후에는 수정능이 유의성있게 감소하였으나 5°C에서 6시간, 20°C에서 30분동안 보존한 후에는 수정능에 대한 영향이 없었다고 하였다. Province⁴등은 개정액을 5°C에 보존시 회석액 내에 6% glycerol을 첨가하였을때 정자의 운동성을 억제하고, 3% glycerol을 첨가시에는 정자의 운동성에 영향을 미치지 않으므로 첨가하지 않는 것이 좋다고 보고하였다.

정액의 대부분을 구성하는 정장은 정자에 유해한 효소를 가지고 있으며, 정장내에 유리되어 있는 원형질소적은 많은 lysosomal enzyme을 포함하고 있어 이를 제거하지 않고 정액을 보존할 경우 정자의 생존성에 유해한 것으로 알려져 있다.⁹⁻¹² 또한 정액의 첫번째와 세번째 분획에 존재하는 정장에 의해 회석된 신선정액의 인공수정시 수태율은 감소하지 않았으나 체외에서 정자를 보존시 정장에 의한 생존성의 감소가 나타났다고 하였다.¹³ 정장이 포함된 회석액에서 양과 염소의 신선정액을 37°C에서 2시간동안 배양할 경우 응고가 일어나며 정자의 생존성에 유해한 환경을 조성한다고 보고하였다.¹⁴ 또한 Roy¹⁵는 정장을 제거한 염소의 정액을 3°C에서 보존시 생존성과 운동성이 정장을 제거하지 않은 군보다 장기간동안 유지된다고 하였으며, Aalseth와 Saacke¹⁶는 소 정액을 4°C에서 1일동안 보존하였을때 정장으로 인해 정자의 apical ridge가 종창되는 형태학적 이상을 일으킨다고 하였다.

이상에서 살펴본 바와 같이 정액의 단기보존에 관하여 여러 동물에서 다양한 결과가 보고되었으며, 개 정액의 단기보존시 glycerol첨가 및 정장의 제거가 정자의 성상에 미치는 영향에 관해서도 서로 다른 결과가 제시된 바가 있다. 이에 저자는 개 정액의 단기보존시에 4°C에서 glycerol첨가 및 정장제거가 정자의 성상에 미치는 영향을 조사하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

공시동물 : 공시동물로는 성숙한 잡종견 4두를 구충과 예방접종을 실시하고, 3주간 기초사육 후 실험에 이용하였다.

실험설계 : 실험설계는 각 2두로 부터 채취한 정액을 pooling하여 4부분으로 나누어 대조군; 회석액만을 이용하여 냉각보존하였으며, glycerol첨가군; glycerol의 영향을 알아보고자 4°C에서 glycerol을 첨가하였고, 정장제거군; 정장제거 효과를 알아보고자 회석전에 정장을 제거하였으며, glycerol-정장 복합처리군; 정장제거군과 glycerol첨가군의 상호작용을 알아보고자 두 군의 처치를 모두 하여 4개군으로 만들어 수행하였다.

정액채취 : 정액의 채취는 Boucher 등¹⁷의 방법에 준하여 3일에 한번씩 음경의 digital manipulation으로 실시하였다.

정액은 정자농도가 높은 제 2분획과 정장함유량이 많은 소량의 제 3분획을 이용하였다.

정액의 냉각 및 보존

1) 회석액 : 정액은 Table 1과 같이 조성하여 15ml 뚜껑이 달린 원심분리관(Costar, U.S.A.)에 10ml씩 분주하여 -20°C에서 냉동보존하였다.

Table 1. Composition of egg-yolk Tris extender with glycerol levels of 0.4%(V/V)

Component	Glycerol(V/V)	
	0%	4%
D.W.(ml)	80	76
Tris(hydroxymethyl)aminomethane(M)	0.020	0.020
Citric acid monohydrate(M)	0.006	0.006
Glucose(M)	0.005	0.005
Egg yolk(ml)	20	20
Streptomycin sulfate(μg)	100.000	100.000
Penicillin. K ion salt(IU)	50.000	50.000
Glycerol(ml)	0	4

2) 냉각 : 대조군은 정액을 채취직후 정액검사용 항온관(FHK, Japan) 위에 놓고 미리 37°C로 데운 egg-Yolk tris extender로 회석하여 정자수가 약 $40 \times 10^6/ml$ 가 되도록 하였다.

냉각은 Olar¹⁸ 등의 방법에 준하여 회석정액을 원심관에 넣어 200ml의 37°C 온수가 들어있는 250ml Erlenmeyer flask에 넣어서 4°C로 유지되는 냉장고에 정치시킴으로써 0.3°C/min으로 냉각되게 하였으며, 냉각수 4°C에서 검사시까지 보존하였다.

glycerol 첨가군은 정액채취후, 전 회석용량의 반을 glycerol이 포함되지 않은 egg-yolk Tris extender로 회석하였다. 회석정액을 4°C까지 냉각한 후 10분 간격으로 3

회에 걸쳐 전 회석용량의 나머지 반을 8% glycerol 농도를 4%가 되도록 맞추었다.

정장제거군은 정액을 생리식염수로 액 10배 희석한 후 실온에서 700 g 로 10분 동안 원심분리하여 정장을 제거하였다. 이후의 냉각과정은 대조군과 동일하게 수행하였다.

glycerol-정장 복합처리군은 채취한 정액을 생리식염수로 약 10배 희석한 후 실온에서 700 g 로 10분 동안 원심분리하여 정장을 제거하였다. 전 회석용량의 반을 glycerol이 포함되지 않은 egg-yolk Tris extender로 희석하였다. 회석정액을 4℃까지 냉각한 후, 전 회석용량의 나머지 반을 8% glycerol을 포함한 회석액으로 10분 간격으로 3회에 걸쳐 희석하여 최종 glycerol 농도를 4%가 되도록 조절하였다.

정자의 심상검사: 정액을 단기보존한 후 1, 2 및 3일째에 냉각고에서 꺼내어 37℃ incubator 내에서 5분간 배양후에 정자의 활력, 운동성 및 염색하여 형태학적 평가를 실시하였다.

1) 정자의 활력 및 운동성 검사: 활력은 정액을 Petri dish에 넣어 잘 섞은 후 정액 한방울을 미리 가운데된 slide에 떨어뜨려 coverslip을 덮고 400×의 도립현미경(Leitz, Germany)하에서 정자의 운동양상 및 속도에 의거하여 활력이 전혀 없는 것을 0으로 활력이 가장 왕성한 것을 5로 판정하여 6등급으로 나누었고 운동성은 표본당 200개의 정자를 계산하여 움직이는 정자의 백분율을 산정하였다.

2) 온도저항성(thermoreistance): 온도저항성을 측정하기 위해 보존된 정액을 1, 2 및 3일째에 37℃에서 5, 30 및 60분간 배양하면서 운동성을 측정하여 운동성의 유지능력을 평가하였다.

3) 정자의 염색: 동결과 용해과정 중에 정자에 일어난 변화를 관찰하기 위해 Spermac stain을 사용하여 염색하였다.

용해후 정액을 3% Na-citrate로 1:1로 희석한 후 slide에 도말하여 공기중에서 충분히 건조시켰다. 건조후 바로 도말표본을 고정하고, Spermac*stain으로 염색하였다.¹⁹

염색된 slide glass를 광학현미경(1000×) 하에서 표본당 100개씩의 정자를 세어, 정상형태를 지닌 정자와 이상정자를 분류하였다.²⁰

통계처리: 실험결과치는 general linear model(GLM)/SAS로 통계 처리하여 각 실험군간의 유의성을 검정하였다.

결 과

개 정액의 단기보존시 glycerol 첨가의 영향과 정장제거의 효과를 알아보기 위하여 실험한 결과는 다음과 같다.

정자의 활력성: 각 군의 정액을 냉각보존 후 1, 2 및 3일째의 활력은 Table 2와 같다. 냉각보존 후 1일째에는 정장제거군이 3.8의 활력을 보여 glycerol 첨가군(3.3) 및 glycerol-정장 복합처리군(3.3)보다 유의적으로 높은 활력을 나타내었다($p < 0.05$). 냉각보존 후 2일째에는 정장제거군이 3.3의 활력을 보여 다른 세군에 비해 유의적으로 높았다($p < 0.05$). 또한 3일째에는 정장제거군이 2.6의 활력을 보여 대조군(1.8) 및 glycerol 첨가군(1.8)보다 유의적으로 높은 활력을 보였다($p < 0.05$).

Table 2. Effects of glycerol and seminal plasma on the kinetics(mean±SD) of preserved canine spermatozoa

	Periods of storage(days)		
	1	2	3
Control	3.4±0.5	2.5±0.5	1.8±0.6 ^b
Group I	3.8±0.4 ^a	3.3±0.6 ^a	2.6±0.5 ^a
Group II	3.3±0.5 ^b	2.5±0.5 ^b	1.8±0.4 ^b
Group III	3.3±0.5 ^b	2.6±0.5 ^b	2.3±0.5 ^b

a, b, c : Different superscripts denote significant difference within column($p < 0.05$)

group I : Removal of seminal plasma, group II : Glycerol addition at 4℃, group III : Removal of seminal plasma and glycerol addition at 4℃

Table 3. Effects of glycerol and seminal plasma on the abnormal morphology of preserved canine spermatozoa

	Periods of storage(days)		
	1	2	3
Control	16.4±1.2	16.5±1.4	18.9±1.4
Group I	16.6±1.9	16.9±1.2	18.1±1.2
Group II	16.1±1.2	18.0±1.5	18.4±1.1
Group III	15.7±1.9	16.6±1.5	17.7±1.3

group I : Removal of seminal plasma, group II : Glycerol addition at 4℃, group III : Removal of seminal plasma and glycerol addition at 4℃

정자의 형태학적 검사: 냉각정액을 37℃ incubator내에서 5분간 배양후 Casarett's 염색을 실시하여 정자의 형태를 검사하여 백분율로 나타낸 결과는 다음과 같다(Table 3). 비정상 정자율은 대조군, glycerol 첨가군, 정장제거군 및 glycerol-정장 복합처리군에게 각각 1, 2 및 3일째에 처리군간에 유의차를 발견할 수 없었다.

정액의 보존기간에 따른 운동성: 냉각정액을 1, 2 및 3일째에 incubator 내에서 5분간 배양후 운동성을 검사한 결과는 Table 4와 같다. 보존 1일 후에 정장제거군이 85.5%의 운동성을 보여 다른 세군보다 유의적으로 높았으며, glycerol-정장 복합처리군(75.5%)이 대조군

Table 4. Effects of glycerol and seminal plasma on the preservation at 4°C

	Periods of storage(days)		
	1	2	3
Control	72.7±1.9 ^b	67.2±1.4 ^{ab}	50.6±1.6 ^b
Group I	85.5±2.8 ^a	75.6±1.5 ^a	53.9±1.5 ^a
Group II	70.3±2.1 ^b	55.5±1.2 ^c	40.5±1.5 ^d
Group III	75.5±2.3 ^c	76.2±1.7 ^a	44.5±1.5 ^c

a,b,c : Different superscripts denote significant difference within column(p<0.05)

group I : Removal of seminal plasma, group II : Glycerol addition at 4°C, group III : Removal of seminal plasma and glycerol addition at 4°C

(72.7%) 및 glycerol 첨가군(70.3%)보다 유의적으로 높은 운동성을 보였다. 보존 2일째에는 정장제거군 및 glycerol-정장 복합처리군이 각각 75.6% 및 76.2%의 운동성을 나타내어 다른 두 군보다 유의적으로 높았다(p<0.05). 보존 3일째에는 정장제거군(53.9%), 대조군(50.6%), glycerol-정장 복합처리군(44.5%) 및 glycerol 첨가군(40.5%)순으로 높은 운동성을 보였다(p<0.05).

정자의 온도저항성 : 단기보존한 정액을 1, 2 및 3일째에 37°C에서 배양하면서 30분 간격으로 운동성을 측정한 결과 대조군, glycerol 첨가군, 정장제거군 및 glycerol-정장 복합처리군의 경과시간에 따른 운동성의 저하비율은 Fig 1과같이 유사하게 나타났다.

고 찰

개에 있어서 인공수정의 의의는 암캐와 수캐에서 기인하는 교배문제의 해결과 암캐와 수캐가 지역적으로 격리되어 있을 경우의 문제점을 극복할 수 있다는 점이다.²¹ 인공수정시에 사용하는 정액은 채취직후의 신선정액, 단기보존한 냉각정액 및 장기보존이 가능한 동결정액 등이다. 개의 경우 최근에는 동결정액에 의한 낮은 수태율 때문에 정액의 단기보존에 관하여 관심이 증가되고 있다.²²

본 실험에서는 대조군과 glycerol 첨가군간의 정자의 활력성은 전보존기간을 통하여 유의성이 인정되지 않아 glycerol 첨가가 정자의 활력에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 또한 정장제거군은 다른 군에 비해 비교적 높은 활력을 나타내어 Wales와 Wallace²³ 및 Allen과 England¹²의 결과와 일치하는 것으로서 본 실험에서의 정장의 제거는 정액의 단기보존시 정자의 활력유지에 도움을 주는 것으로 나타났다.

냉각보존한 정액을 1, 2 및 3일째에 염색후 비정상형태를 지닌 정자의 비율을 산출한 결과 주로 중편부기형 및 미부기형이 발견되었으며 특히 미부선회가 다수 발견되었다. 그러나 이러한 미부선회가 단기보존시 영향

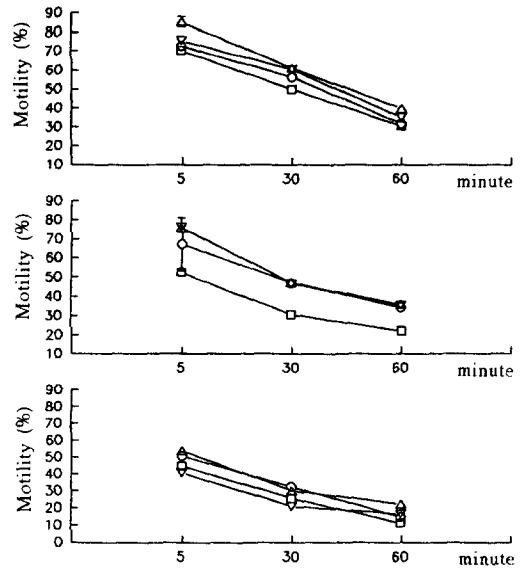


Fig 1. Sequential change of motility during incubation at 37°C after up to 3days preservation. The motility of control(○-○), glycerol addition at 4°C(△-△), removal of seminal plasma(□-□) and Removal of seminal plasma and glycerol addition at 4°C(▽-▽) were declined at similar rates.

에 의한 것인지는 확실치 않았으며, 처리군간의 비정상 형태를 지닌 정자의 비율 차이는 발견할 수 없었으므로 glycerol 첨가 및 정장제거는 정액의 단기보존시 형태학적 이상에 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

정액의 동결보존시 가장 보편적인 동결보호제로 사용되고 있는 glycerol이 단기보존시에 미치는 영향과 정액보존시에 첨가될 수 있는 정장이 운동성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험을 실시하였다. 채취된 정액을 4°C로 냉각하여 1일간 보존후 운동성을 검사한 결과 정장제거군(85.5%)이 정장을 제거하지 않은 두군(대조군과 glycerol 첨가군; 각각 72.7, 70.3%)보다 유의성있게 높았으며 보존 2, 3일째에도 이와 유사한 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 정장을 제거하였을 경우 생존성과 운동성의 유지에 유익하다는 보고^{12,14,16}와 일치하는 결과였으며, glycerol이 수정능에 미치는 영향이 없다는 보고^{4,5}와는 연구결과가 일치된 경향을 나타냈으나 glycerol이 수태율 유지에 있어서 유의하다고 한 보고^{4,8}와는 상이한 결과를 얻었다. 개정액의 각 분획별 생리학적인 기능은 잘 알려져 있지 않다. 일반적으로 제 1분획은 요도를 세척하고 제 3분획은 제 2분획이 암컷의 경관을 잘 통과하도록 도와주는 것으로 알려져 있다.¹² 또한 정상적인 교배시 정자는 빠르게 정액을 벗어나게 되고 정장으로부터의 가능한 유해한 환경을 벗어나는 것으로 알려져 있다.¹³ 본 실험에서 정액의 냉각보존시 1 및 2일까지는 glycerol이 운동성에 유의성있는 영향을 미치지 않았으나 3일째에는 glycerol 첨가군이 대조군에 비해

유익적으로 낮은 운동성을 나타내어 glycerol이 운동성에 영향을 미친 것으로 판단된다. 또한 각 처리군에서 공히 3일째 부터는 급격히 운동성이 저하되는 것으로 나타나 3일 이상의 정액보존시에는 이러한 문제를 해결할 수 있는 방법이 모색되어야 할 것으로 판단된다.

온도저항성은 정액을 37°C에서 배양하는 중에 운동성의 유지능력을 측정하는 방법으로 수태율의 한 지표로 사용되고 있다. 사람, 소, 양 및 돼지의 정자는 37°C에서 배양시 수시간동안 생존하지만 개에서는 1~2시간이면 거의 모든 운동성이 소실되는 것으로 알려져 있다.^{3, 12} 본 실험에서는 30분 간격으로 1시간까지의 운동성을 측정하였다. 단기보존한 후 정액을 37°C에서 배양시에 대조군, glycerol 첨가군, 정장제거군 및 glycerol-정장 복합처리군의 경시별 운동성의 저하비율은 유사하게 나타났다.

이상의 실험결과를 종합검토하면 정장의 제거는 단기보존한 정자의 활력과 운동성에 좋은 영향을 주었으며 glycerol 첨가는 정액보존중 정자의 운동성 유지에 유해한 영향을 미치기 때문에 단기보존시에는 정장을 제거하고 glycerol을 첨가하지 않는 것이 정자의 정상유지에 유익할 것으로 판단된다.

결 론

개정액의 단기보존시 glycerol 첨가 및 정장제거의 영향을 알아보고자 대조군, glycerol 첨가군, 정장제거군 및 glycerol-정장 복합처리군으로 구분하여 실험한 결과는 다음과 같다.

1. 단기보존 2 및 3일째에 정장제거군은 대조군에 비해 유의적으로 높은 활력성을 보였으며, glycerol 첨가 및 glycerol-정장 복합처리군은 대조군과 유사한 활력을 보였다.

2. 처리군에 따른 형태학적 이상의 차이는 발견할 수 없었다.

3. 단기보존 1 및 3일째에는 정장제거군이 다른 군에 비해 유의적으로 높은 운동성을 보였으며($p < 0.05$), 2일째에는 정장제거군 및 glycerol-정장 복합처리군에서 유의적으로 높은 운동성을 나타내었다.

4. 단기보존한 정액의 온도저항성을 30분 간격으로 측정하였을 때 처리군간의 저하비율은 유사하였다.

이상의 결과로 보아 egg-yolk Tris extender를 이용한 개 정액의 단기보존시 정장제거후 glycerol을 첨가하지 않고 보존하는 것이 정자의 정상에 유익한 효과를 미치는 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

1. Andersen K. Artificial insemination and storage of canine semen. In : Morrow DA. *Current Therapy in Theriogenology*. WB Saunders Company, Philadelphia, USA, 1980;661~665.
2. Davis IS, Brattion RW, Foote Rh, et al. Livability of bovine spermatozoa at 5, 25 and 85°C in Tris-buffered and citrate-buffered yolk-glycerol extenders. *J Dairy Sci* 1963;446:333~336.
3. Concannon PW, Battista M. Canine semen freezing and artificial insemination. In : Krik RW. *Current Veterinary Therapy, small animal practice, Vol.X*. WB Saunders Company, Philadelphia, USA, 1989;1247~1259.
4. Province CA, Ammann RP, Pickett BW, et al. Extenders for preservation on canine and equine spermatozoa at 5°C. *Theriogenology* 1984;22:409~414.
5. Foote RH. Extenders for freezing dog semen. *Am J Vet Res* 1964;104:37~40.
6. Seager SWJ, Fletcher WS. Progress on the use of frozen semen in the dog. *Vet Rec* 1973;92:6~10.
7. Foote RH, Gray LC, Young DC, et al. Fertility of bull semen stored up to four days at 5°C. in 20% egg yolk extenders. *J Dairy Sci* 1960;43:1330~1334.
8. Wilmut I, Polge C. The fertilizing capacity of boar semen stored in the presence of glycerol at 20, 5 and -79°C. *J Reprod Fertil* 1974;38:105~113.
9. Mann T. *The Biochemistry of Semen and of the Male Reproduction Tract* Methuen, London, England, 1964.
10. Dott HM, Dingle JT. Distribution of lysosomal enzymes in the spermatozoa and cytoplasmic droplets of bull and ram. *Exp Cell Res* 1968;52:523.
11. Allison AC, Hartree EF. Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilization. *J Reprod Fert* 1970;21:501.
12. Allen WE, England GCW. Factors affecting the viability of canine spermatozoa, II. Effects of seminal plasma and blood. *Theriogenology* 1992;37(2):373~381.
13. Carlson WD. The successful shipment of dog semen. *North Am Vet* 1954;35:448~449.
14. Ritar AJ, Salamon S. Effect of seminal plasma and its removal and egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. *Aust J Biol Sci* 1982;35:305~312.
15. Roy A. Egg-yolk coagulating enzyme in the semen

- and Cowper's gland of the goat. *Nature* 1957;179:318~319.
16. Aalseth EP, Saacke RG. Morphological change of the acrosome on motile bovine spermatozoa due to storage at 4°C. *J Reprod Fert* 1985;74:473~478.
 17. Boucher JH, Foote RH, Kirk RW, et al. The evaluation of semen quality in the dog and the effects of frequency of ejaculation upon semen quality, libido and depletion of sperm reserves. *Cornell Vet* 1958;48:67~86.
 18. Olar TT, Bowen RA, Pickett BW, et al. Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on postthaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. *Theriogenology* 1989;31:451~461.
 19. Oettle EE. Using a new acrosome stain to evaluate sperm morphology. *Vet Med* 1986;83:263~266.
 20. Hafez ESE. Semen evaluation In : *Reproduction in Farm Animals* Lea & Febiger, Philadelphia, USA, 1987;455~480.
 21. Feldman EC, Nelson RW. Artificial insemination. In : *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction* WB Saunders Company, Philadelphia, USA, 1987;519~524.
 22. Allen WE, England GCW. Factors affecting the viability of canine spermatozoa, I. Potential influences during processing for artificial insemination. *Theriogenology* 1992;37(2):363~371.
 23. Wales RG, Wallace JC. Effects of washing on the metabolism of bull spermatozoa. *J Reprod Fert* 1965;9:261~263.
-