

한국재래산양에서 계절이 정소기능, 정자의 내동성 및 수정능력에 미치는 영향

I. 정액성상과 정자의 내동성 및 난자침입능력의 계절적 변화

김창근·정영채·김광식·윤종택*·이장희**·정영호***·최선희****·김홍률·김 수·권처진
중앙대학교 산업대학 축산학과

Effect of Season on Testis Function and Freezing and Fertilizing Ability of Spermatozoa in Korean Native Goat I. Seasonal Changes in Semen Characteristics and Freezing and Penetrating Ability of Sperm

Kim, C.K., Y.C. Chung, K.S. Kim, J.T. Yoon*, J.H. Lee**, Y.H. Chung***, S.H. Choi****

H.Y. Kim, S. Kim and C.J. Kwon

College of Industrial Studies, Chung-Ang University

SUMMARY

This study was conducted to observe seasonal and individual changes in semen characteristics and sperm freezability, and sperm penetration into zona-free hamster eggs in Korean native goats. Buck response and change in semen characteristics to electrical stimulations was evaluated for four seasons throughout 2 years and percentage of motile sperm and normal apical ridge acrosome was investigated after equilibration and thawing for 4 seasons with 5 bucks. Sperm penetration rate was evaluated for 4 bucks.

1. Probe insertion at depth of 7cm and repeated stimulation for 3 sec was more effective($P < 0.05$) in buck response and semen collection than those of other conditions.
2. Semen characteristics from electroejaculation was significantly($P < 0.05$) higher in spring and fall for semen volume, in spring and summer for sperm concentration and in fall for sperm motility than those in other seasons, respectively. However, there were no differences in total sperm among seasons.
3. Buck response to electrical stimulation showed significant difference($P < 0.05$) among individuals in all 3 seasons except winter. Significant individual difference in semen volume was only in spring and summer, but there was no individual difference in sperm concentration and total sperm in all season.
4. Washing of semen before freezing treatment was greatly($P < 0.05$) beneficial to sperm mo-

본 연구는 1991년도 한국과학재단의 기초연구지원에 의하여 수행되었음.

*안성산업대학교(An Seong National Polytechnical University)

**국립종축원(National Animal Breeding Institute)

***중부대학교(Joongbu University)

****중앙대학교 유전공학연구소(Institute of Genetic Engineering, Chung-Ang University)

tility after thawing, no matter whether ejaculates exhibit egg yolk coagulation or not.

5. Sperm motility after glycerol equilibration was significantly ($P < 0.05$) low in summer semen and motility after thawing was greatly ($P < 0.05$) higher in winter semen than in other seasons. Freezability of unwashed sperm was significantly difference among bucks, but a yearly freezability of washed sperm after chilling and thawing were no differences among bucks and percentage of normal apical ridge acrosome were not different among seasons and bucks.
6. There was no significant difference in sperm motility after thawing between egg yolk levels in summer, although 20% level gave more higher motility than 5% level.
7. In summer, 3.2% glycerol and 3-h equilibration gave greatest percentage ($P < 0.05$) of sperm motility and normal apical ridge acrosome after thawing.
8. Sperm penetration rate into zona-free hamster eggs was not different between bucks and seasons.

Overall, it is concluded that to obtain maximum sperm output and successive semen freezing by electroejaculation method, buck selection with good response in all season could be basically considered and that seasonal effect on sperm freezability was more greater than that of individual bucks.

(Key words : semen characteristics, sperm freezability, penetration rate, electroejaculation, native goat)

I. 서 론

한국재래산양 사육이 더욱 소득이 높아지고 약용 또는 보신용으로서 소비자의 요구에 알맞는 재래가축으로 정착되기 위해서는 현재 저조한 산양의 생산성을 보다 향상시키고 소비자가 원하는 품종고유의 특성을 계속 유지할 수 있는 개량증식방법이 강구되어야 할 것이다. 이를 위해 앞으로 우수한 종모산양의 동결정액을 이용한 인공수정기술이 개발되어야 하며 그 중에서도 특히 종모산양의 정액생산능력과 정액동결성에 영향을 주는 요인에 대한 연구는 우수한 종모산양의 이용 효율을 극대화시키고 우수 유전자원의 장기보존을 위해서 무엇보다 선행되어야 할 주요 연구과제이다.

산양정액의 일반성상에 대하여 다수의 보고가 있으며 (Eaton과 Simmons, 1952; Mann, 1981; Mendoza 등, 1989; Carter 등, 1990) 한국재래산양에서는 박과 이(1972), 박(1973) 및 강과 정(1976)의 보고가 있다. 정액성상에 영향을 주는 요인으로는 인공질법과 전기자극법간의 비교가 산양(Austin 등, 1968)과 면양(Cupps 등, 1960)에서 보고되었다. 계절간의 차이는 산양(Eaton과 Simmons, 1952; 강과 정,

1976; Mann, 1981; Mendoza 등, 1989)과 면양(Cupps 등, 1960)에서 보고되었다. 특히 정액성상의 계절적 차이가 품종(Dacheux 등, 1981; Mann, 1981)에 따라 다르며 또한 정액성상의 품종간 차이도 산양(Eaton과 Simmons, 1952; Mann, 1981)과 면양(Dacheux 등, 1981)에서 보고된 점은 한국재래산양에서도 정액생산능력에 고유한 특성이 있을 수 있음을 제시해 주고 있다. 정액동결성에 있어서 개체간의 차이가 산양(Ritar 등, 1990; Tuli 등, 1991)과 소(析田, 1983)에서 보고되었고 동결에 따른 침체손상이 면양의 경우 소보다 월등히 높게 보고되어 있다 (Watson과 Mattin, 1972). 또한 동결성에 대해 계절의 영향이 큰 것으로 산양(Evans와 Maxwell, 1987)과 소(Tuli와 Singh, 1983)에서 보고되었는데 동결성에 대한 개체와 계절간 차이의 상대적 영향 정도에 대해서는 아직 명확히 규명되어 있지 못하다. 또한 정액동결성은 동결회석액의 조성, 회석방법, 난황농도 및 glycerol첨가수준과 평형시간 등에 따라 다르게 나타나 있다. 산양정액 동결에서 난황첨가회석액을 이용할 때 정장내 난황농도효소가 동결성의 저하요인이 되며 (Iritani 등, 1961) 이 효소함량은 개체보다는 계절 즉, 번식계절과 연속 채취에서 더욱 높으며 (Iritani

등, 1964) 또한 전기자극채취에서 더욱 높은 것으로 보고되었다(Evans와 Maxwell, 1987). 이러한 영향을 줄이기 위하여 정액의 세정(Iritani와 Nishikawa, 1963; Ritar와 Salamon, 1982) 또는 저농도의 난황첨가(Iritani, 1980; Ritar 등, 1990)가 권장되고 있다. 그러나 Waide 등(1977), Abdelhakeam 등(1991)은 20% 난황농도에서도 양호한 결과를 보고한 바 있다. Glycerol수준과 평형시간에 있어서는 면산양의 경우 소보다 낮은 수준에서 효과적이었고(Watson과 Martin, 1975; Tasseron 등, 1977; Salamon과 Ritar, 1982; Deka와 Rao, 1986; 박 등, 1989), glycerol 없이도 동결이 가능한 것으로 보고되었다(Abelhakeam 등, 1991). 평형시간은 2단계 회색에서 2~3시간(Ritar 등, 1990)과 6~18시간(Waide 등, 1977), 1단계회색에서는 4시간(Van der Westhuysen, 1978)이 효과적인 것으로 보고되었으나 Sahni와 Roy(1972)와 Ritar 등(1990)은 1~5시간 사이에 차이가 없다고 하였다. 특히 Waide 등(1977)은 난황용고가 일어나는 개체나 정액에서는 6~8시간으로 평형시간의 단축이 효과적이라고 하였다. 산양정자의 체외수정율은 개체간차이가 있을 뿐만 아니라 체외수정시 정자활력이 매우 중요한 요인으로 보고되었다(Bou와 Hanada, 1985; Pavlok와 Flechon, 1985).

본 연구는 전기자극법에 의한 정액채취시 효과적인 전기자극방법을 찾음과 동시에 정액성상과 정액동결성의 개체 및 계절적 변이를 조사하여 전기자극반응이 우수한 개체를 선발하고 정액생산능력의 저하요인을 최소화하며 정액동결성을 개선하는데 필요한 기초자료를 얻고자 시도하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시산양과 사양관리

체중 18~23kg의 성숙 한국재래 수산양 10두를 실험에 공시하였고 사육장소는 야외에 간단하게 비와 바람막이를 한 상태에서 2년간(91. 4~93. 6) 사육하였으며 모두 한 우리에서 군사하였다. 사료급여는 청초기에 농후사료 1일1두 100g정도와 충분한 양의 청초급여, 그 이외의 시기에는 농후사료를 1일1두 150~200g와 볏짚 및 중국산 떡갈잎을 충분한 양을 급여하였고

광물질은 시판 mineral block(Rincal block, 대한신약주식회사)을 자유섭취토록 하였다.

2. 정액채취와 정액의 일반성상 조사

1) 전기자극법에 의한 정액채취

5. 4볼트 건전지 2개가 들어있는 면산양용의 Bailey electronic ejaculator(Western-Instrument Co., USA)를 이용하여 전기자극법으로 정액을 채취하였다. 산양을 보정틀에 보정한 후 포피내와 음경주위를 생리식염수로 2~3회 세척하여 세균오염을 최소화 하였다. 가장 효과적인 전기자극법을 찾기 위하여 먼저 electrical probe의 직장내 삽입깊이(7cm와 10cm)와 전기통전방법(통전시간: 3초와 6초, 통전중지 시간: 3~6초)을 달리한 조건에서 이들 전기자극방법간의 정액성상을 비교하였으며, 이중 가장 우수한 삽입 깊이와 통전방법(7cm삽입, 3초간자극)을 택하여 본 실험에 계속 이용하였다.

2) 정액의 일반성상 조사

각 계절마다 2주간 동안 2~3일 간격으로 정액을 채취하여 정액의 주요 일반성상을 조사하였다.

(1) 정액량: 전기자극후 첫사정에서부터 전기자극의 주기(통전과 중지)를 3회 계속 반복하여도 사정되지 않을 때까지 채취된 총사정량을 정액량으로 하였다.

(2) 정자농도: 채취한 정액을 혼합한 후 haemocytometer로 1ml당 정자수를 계산하였다.

(3) 총정자수: 1ml당 정자수에 정액량을 곱하여 1일 채취당 총정자수로 하였다.

(4) 정자활력: 37°C 가온판위에서 전진운동을 갖는 정자의 백분율을 5%단위까지 측정하였다.

(5) 정상첨체율: 정자채취 후 또는 동결전후에 정액을 슬라이드에 도말하고 더운 공기로 건조시킨 후 Watson과 Martin(1972)의 방법에 따라 염색하고 첨체상태를 검사하였다. 염색방법은 중성 formal-saline(5% nature formaldehyde)용액에 15분간 고정시킨 후 tap-water에서 행군 다음 건조하였으며 염색액(3ml Giemsa, 2ml Sorensen buffer, 40ml 증류수)으로 염색하였다. 염색후 1000배하에서 200개 정자중 정상첨체를 갖는 정자의 백분율로 계산하였다.

3. 정액동결과 동결성 조사

1) 희석액의 조성

사용된 희석액은 난황 tris액을 기본으로 한 2 종류의 동결희석액이었다. 먼저 정액의 계절 및 개체별의 동결성 비교와 정액의 세정효과 및 희석액중의 난황첨가수준에 따른 동결성비교를 위하여 사용된 희석액(희석액 A)은 Arriola와 Foote(1987)의 egg yolk-tris-fructose액을 약간 수정한 것으로서 희석액 조성은 2차증류수 100ml내에 tris aminomethane 3.078g, fructose 1.0g, citric acid 1.78g, egg yolk 20ml(v/v, 20%), glycerol 최종농도 6.8%였다. 한편 동결희석액중의 glycerol농도와 glycerol평형시간에 따른 동결성비교를 위해서는 Evans와 Maxwell(1987)에 의해 추천된 egg yolk-tris-fructose액(희석액 B)으로서 증류수 100ml내에 tris aminomethane 3.634g, fructose 0.5g, citric acid 1.99g, egg yolk 5ml(v/v, 5%)이었고 glycerol최종농도는 3.2% 또는 6.4%이었다.

2) 정액동결과 융해

동결희석액 A에 의한 희석동결에서는 2단계 희석법에 준하였다. 정액채취후 37°C에서 glycerol무첨가 희석액으로 1:2로 희석하고 5°C에서 1.5시간 냉각시킨 다음 glycerol함유 희석액으로 최종희석배율(1:8)에 달하도록 4회 분할첨가 희석하였으며 0.5-ml 스트로에 분주봉인한 다음 액체질소가스 5cm위에서 5분간 예비동결시킨 후 액체질소에 직접 침적동결하였다. 동결희석액 B에 의한 희석동결에서는 Salamon과 Ritar(1982)의 1단계희석법으로 동결하였다. 채취정액을 30°C에서 glycerol함유 동결희석액으로 1:8로 희석한 후 0.5-ml 스트로에 분주봉인하고 5°C에서 1.5 또는 3시간의 glycerol 평형시간을 준 다음 액체질소가스 5cm위에서 5분간 예비동결후 액체질소에 직접 침적동결하였다. 동결정액의 융해는 37°C에서 12~15초간 융해하였다.

3) 동결성 조사

정액의 동결성을 조사하기 위하여 동결직전(gly-

cerol평형직후)과 동결융해후(융해후 37°C에서 0, 2, 4, 시간배양)의 정자활력과 정상침체율을 조사하였으며 정자활력과 정상침체율의 조사는 앞에서 언급한 방법에 준하였다.

4. 정자의 난자침입을 조사

1) 정자의 체외수정능획득

비동결정자의 수정능획득은 Song과 Iritani(1985)의 방법에 따라 사출정액을 20~25°C 반함기상태에서 18시간 유지한 다음 mKRB액(1mg/ml BSA함유)으로 1회세정하고 mKRB액(4mg/ml BSA함유)으로 재부유하여 정자농도 40~50 × 10⁷/ml로 조정후 37°C, 5%CO₂ 배양기에서 5~6시간 전배양하였다. 동결융해한 정자는 Bou와 Hanada(1985)방법에 따라 BO액(2mM caffeine함유,BSA불포함)으로 세정후 재부유시켜 정자농도 2.5 × 10⁶/ml로 조정한 다음 0.5 M의 ionophore A23187을 2분간 처리하였다.

2) 투명대제거 햄스터난자와 수정

성숙 햄스터에 PMSG 25IU와 HCG 25IU으로 과배란처리하고, HCG주사후 16~17시간에 채란하여 0.3% hyaluronidase(5~10분간)와 0.1% pronase(2~5분간)로 투명대를 제거하였고 BO(4mg/ml BSA함유)에서 5~6시간 체외수정시킨후 2.5% acetic acid로 고정하고 1% aceto-orcein으로 염색하여 정자침입여부(정자두부의 팽대 또는 전핵형성여부)를 조사하였다.

5. 통계처리방법

실험결과는 완전임의배치법의 분산분석에 따라 통계분석하였으며 평균치간의 유의성검정은 Duncan의 다중검정(Steel과 Torrie, 1980)에 준하였다. 정자농도와 총정자수 및 정자활력(%)과 정상침체율(%)에 대한 성적은 실험치를 변형한 후 통계처리하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 정액의 일반성상

1) 전기자극채취방법에 따른 정액성상

전기자극사정기의 직장내 삽입깊이와 통전시간을 달리하여 채취한 정액성상은 Table 1과 같다.

7cm삽입 후 3초간씩의 반복 전기자극에서 유의성은 없었으나 정액성상이 더욱 양호하였으며 그 외의 전기자극방법에서는 비슷한 정액성상을 보였다. 통전회수에서는 7cm삽입의 경우 통전 3~5회부터 사정이 시작되어 총 9~13회 통전까지 채취가 가능하였다. 10cm 삽입에서는 7cm삽입보다 사정개시까지의 통전수와 총통전수가 증가되는 경향이 있었고, 특히 총통전수에서는 전기자극방법간에 통계적 유의차가 있었다($P < 0.05$).

이상의 결과에서 전기자극 정액채취에서는 probe의 삽입깊이와 통전시간이 매우 중요한 요인으로 작용하였다. 7cm삽입, 3초간씩 통전주기의 채취결과는 박과이(1972)에서 5초 통전 15초 중지 주기로 4회 전기자극에 의한 정액성상과 비교했을 때 정액량은 약간 작았으나 채취된 정자농도와 총정자수는 상당히 높았으며, 한편 Carter등(1990)이 Cashmere산양에서 3~5초 간격으로 3~4분동안 채취한 결과보다 정액량과 정자농도 및 총정자수에서 역시 많았다. 이러한 성상의 차이원인중 일부는 전기자극회수와 채취계절이 다른 데 기인된 것으로 사료되었다.

2) 계절별 정액성상

Probe의 7cm삽입과 3초간의 주기적 전기자극으로 채취된 정액의 계절별 변화를 보면 Table 2와 같다. 여름에 정액량이 가장 적었고 봄 가을에 정액량이 많

았으나 유의적 차이는 아니었다. 정자농도는 여름과 봄이 다른 계절보다 높았으며 겨울이 가장 낮았다 ($P < 0.05$). 총정자수는 봄과 여름이 높았으나 유의성은 없었다. 한편 정자활력은 가을에서 현저히 높았다 ($P < 0.05$). 대체로 여름에 정액성상의 변이가 타계절보다 컸으며 총정자수에서 더욱 큰 변이를 보였다. 침체이상울에서는 계절간에 차이가 없었다.

정액성상의 이러한 계절적 차이는 강과 정(1976)이 전기자극법으로 조사한 것과 매우 일치된 결과였다. 그러나 Eaton과 Simmons(1952)과 Mendoza 등(1989)이 산양에서 여름에 정자농도가 낮았다고 한 것과는 차이가 있었으며, 또한 Mann(1981)이 가을과 겨울에 정자농도와 총정자수가 여름보다 높다고 한 것 과도 차이가 있었다. Cupps 등(1960)도 면양에서 여름의 정자농도가 겨울보다 현저히 낮다고 하였다. 본 실험에서 여름에 정자농도가 높았던 것은 위의 보고들과 달리 전기자극 채취법의 결과로 사료되며, 또한 한국재래산양이 여름 strees에 비교적 강한 특성을 가진 것 과도 관련이 있는 것으로 생각되었다. 한편 총정자수에서 변이가 컸던 것은 Langford 등(1989)이 면양에서 총정자수의 반복력이 낮았다고 한 보고와 유사한 결과였다.

3) 전기자극반응 및 정액성상의 개체차이

개체차이를 계절별로 조사한 결과는 Table 3과 같다. 전기자극반응에 대한 개체차이가 봄, 여름 및 가을에서 모두 유의성 있게 나타났으며($P < 0.05$), 또한 정액성상에서는 봄과 가을의 정액량에서 유의적인 개

Table 1. Characteristics of semen collected with different rectal probe insertions and electrical stimulations in summer

Probe insertion(cm)	Electrical stimulation			Semen characteristics			
	Period ¹⁾ (sec)	Frequency		Volume (ml)	Concentration (10 ⁹ /ml)	Total sperm (10 ⁶)	Motility (%)
		To 1st ejac.	Total ²⁾				
7	3	4.9±2.3	12.5±2.6 ^b	0.9±0.5	3.54±1.62	3.18±2.33	80.8±16.8
	6	3.5±1.1	9.5±2.9 ^c	0.6±0.4	2.21±1.03	1.40±1.82	78.5±11.6
10	3	6.6±3.4	15.8±2.2 ^a	0.7±0.5	2.14±2.11	1.82±2.70	78.0±16.4
	6	4.7±1.6	8.7±3.3 ^c	0.8±0.3	2.30±1.50	1.80±1.44	73.6±17.5

1) Rest period between electrical stimulations was 3 to 6 sec.

2) Total frequency was added up from 1st to last stimulation unshowing ejaculation in spite of 3 consecutive stimulations.

^{a,b,c} Means with different superscripts in a column differ ($P < 0.05$).

Table 2. Seasonal variation in semen characteristics in electroejaculation

Season	Semen characteristics				
	Volume (ml)	Concentration (10^9 /ml)	Total sperm (10^9)	Motility (%)	NAR ¹⁾ (%)
Spring	1.3±0.4 (33) ²⁾	2.41±0.97 ^{ab} (40)	3.07±1.59 (52)	84.4± 8.9 ^b (11)	81.5
Summer	1.0±0.5 (52)	2.67±1.43 ^a (54)	2.79±2.17 (78)	82.8±12.1 ^b (15)	81.7
Fall	1.3±0.4 (35)	1.85±0.74 ^{bc} (40)	2.28±1.11 (49)	90.7± 5.0 ^a (6)	86.5
Winter	1.2±0.4 (33)	1.60±0.77 ^c (48)	1.94±1.13 (58)	86.5± 6.7 ^b (8)	87.4

1) NAR : Normal apical ridge acrosome of sperm.

2) () : Coefficient of variation.

^{a,b,c} : Means with different superscripts within same column differ (P<0.05).

Table 3. Individual variation in response of electrical stimulation and semen characteristics

Season	Goat No.	Stimulation frequency		Semen characteristics		
		To 1st ejac.	Total ¹⁾	Volume (ml)	Concentration (10^9 /ml)	Total sperm (10^9)
Spring	1	4.5 ^{ab}	15.6 ^{ab}	1.6(24) ^a	2.24(29) ²⁾	3.35(28)
	2	3.8 ^{ab}	14.8 ^{bc}	1.1(39) ^b	1.92(43)	2.08(69)
	3	5.6 ^a	17.0	1.1(33) ^b	2.75(44)	3.13(60)
	4	4.6 ^{ab}	14.7 ^{bc}	1.1(13) ^b	2.29(51)	2.41(53)
	5	2.8 ^b	13.2 ^c	1.5(73) ^a	2.66(31)	4.00(48)
Summer	1	2.9	10.6 ^b	1.2(35)	2.24(39)	2.58(61)
	2	3.8 ^{bc}	10.6 ^b	1.0(53)	2.88(46)	2.95(84)
	3	6.9 ^a	13.6 ^a	0.7(70)	2.38(67)	1.71(79)
	4	5.7 ^{ab}	14.3 ^a	1.0(38)	2.72(64)	2.80(74)
	5	3.9 ^{bc}	13.2 ^a	1.2(58)	3.20(46)	3.90(76)
Fall	1	2.7 ^b	10.7 ^b	1.5(33) ^a	1.56(29)	2.37(52)
	2	3.7 ^{ab}	10.7 ^b	1.0(35) ^b	1.71(50)	1.63(55)
	3	4.7 ^a	14.0 ^a	0.9(31) ^b	2.21(56)	2.02(63)
	4	2.7 ^b	12.7 ^{ab}	1.3(29) ^{ab}	1.91(27)	2.56(51)
	5	2.9 ^b	9.9 ^b	1.4(26) ^a	1.84(15)	2.80(24)
Winter	1	3.0	10.0	1.4(19)	1.62(40)	2.25(50)
	2	5.0	13.3	1.0(28)	1.47(35)	1.47(49)
	3	4.0	15.0	1.0(37)	1.95(63)	2.30(86)
	4	3.0	11.0	1.1(25)	1.60(57)	1.85(54)
	5	2.8	14.5	1.4(43)	1.35(51)	1.85(43)

1) See footnote in Table 1.

2) () ; Coefficient of variation

^{a,b,c} ; Means with different superscripts within same columns and seasons differ (P<0.05)

체 차이가 있었다($P < 0.05$). 그러나 정자농도와 총정자수에서는 개체차이가 없었고, 전기자극반응과 정액성상의 개체차이가 겨울에 크게 감소됨을 알 수 있었다. 이상결과에서 전기자극반응과 정액성상의 개체차이가 컸던 결과는 Moore(1985)가 정액성상의 반복력이 인공질법보다 전기자극법에서 높다고 한 것과는 다소 차이가 있었으며, 정자농도와 총정자수에서 변이가 컸던 것은 Cupps 등(1960)의 보고와 유사한 결과였다. 한편 정액생산능력의 개체 및 계절적 차이가 부분적으로 나타나기는 했으나 산양과 면양(Dacheux 등, 1981)에서 품종간에 현저한 차이가 있었던 점으로 보아 한국재래산양의 정액성상의 개체별 및 계절별 정액성상을 보다 정확히 알기 위해서는 아직 보고된 바 없는 인공질법으로 여러해 다수의 산양을 공시하여 더욱 조사가 필요할 것으로 사료되었다. 또한 전기자극정액채취에서는 우선 전기자극반응이 우수한 개체의 선정이 중요하며 또한 정액성상의 변이를 줄이기 위해서는 채취방법과 채취자의 조건도 필히 고려되어야 할 수 있었다.

2. 정자의 동결성

1) 정액의 세정효과

채취후 난황응고를 보였던 정액 또는 개체의 정액을 1회세정한 결과는 Table 4와 같다. 난황응고를 보였던 정액을 1회세정(정장제거)으로 동결전후의 활력이 모두 크게 향상되었으며($P < 0.05$), 난황비응고 정액에서도 유의성은 없었으나 역시 세정효과가 나타남을 알 수 있었다. 이와 같은 세정효과는 정장내 효소를 세정에 의해 제거 또는 억제시키거나(Iritani와 Nishikawa, 1963; Ritar와 Salamon, 1982) 또는 난황의 저농도 첨가 내지는 무첨가방법(Iritani, 1980; Evans와 Maxwell, 1987)으로 난황응고에 의한 정자활력저하를 줄일 수 있었던 보고들과 같은 결과였다. 본 실험에서 난황응고가 일어날 경우 대부분 희석후 2~3시간의 냉각과정중 정자활력의 급저하가 일어났으며 특히 여름실험에서 더욱 현저하였는데 Salmon과 Ritar(1982)도 정장과 난황공존시에 2시간 이내에 정자활력과 생존성이 급저하됨을 보고하였다. Evans와 Maxwell(1987)도 난황을 응고시키는 정장중 효소의 농도가 개체간에 차이가 있으며 전기자

Table 4. Effect of semen washing on sperm motility before and after freezing

Semen coagulation	Washing (1×)	Sperm motility(%)	
		Before freezing	After freeze-thawing
+	-	22.5±14.8 ^b	0.8±1.9 ^b
+	+	55.8±12.1 ^a	32.5±19.4 ^a
-	+	69.2±13.1 ^a	37.5±18.6 ^a

^{ab} : Means with different superscripts within same column differ ($P < 0.05$).

극 채취법에서 더욱 효소농도가 높다고 하였다. 또한 Iritani 등(1964)은 효소농도가 개체보다 계절의 영향이 크며 번식계절에 더욱 응집반응이 높다고 하였다. 이러한 보고를 고려해 볼 때 앞으로 한국재래산양 정자의 동결성을 높이는데 있어서 개체와 계절이 신중하게 고려되어야 할 부분이 많음을 알 수 있었다.

2) 정자내동성의 개체 및 계절차이

1차년도에 여름과 초가을에 실시된 실험에서 동결음해후의 개체별 정자내동성은 Table 5와 같으며 그 후 4계절에서 조사된 1차세정 정자의 동결직전과 음해후의 개체와 계절별 정자내동성은 Table 6과 7에서 보는 바와 같다. Table 5에서 비세정 정액의 경우 음해후 개체별 정자활력에 차이가 있었으나 세정후에는 유의차가 없었다. 한편 Table 6에서 동결전냉각후의 정자활력에서 계절간에 차이를 보면 봄 정액에서 동결성이 현저히 낮았고 ($P < 0.05$) 개체간의 연평균동결성에서는 차이가 없었다. 또한 음해후의 정자활력에도 4번개체가 다소 낮았으나 개체간에 차이가 없었고 계절간에는 차이를 보여 겨울이 가장 좋았으며 가을, 봄, 여름 순으로 활력이 저하되었다 ($P < 0.05$). 특히 정자활력의 개체변이가 겨울이외의 계절에서 크게 나타났다. 정자활력은 배양후 4시간에서 크게 저하됨도 알 수 있었다.

본 결과에서 비세정정액에서 동결성에 개체차이가 있었던 것은 난황응고현상과 관련이 있는것으로 사료되었고 산양정액동결시 난황응고를 보이는 개체나 정액의 이용은 주의가 요구됨을 알 수 있었다. 한편 Table 6에서 정자동결성의 개체차이가 없었던 것은 Ritar 등(1990)과 Tuli 등(1991)이 산양에서, 析田

(1983)이 소에서 개체차이를 보고한 것과 다른데 이는 역시 본 연구에서 정액의 세정효과와 관련이 있으며 또한 조사개체수가 적은데에도 원인이 있을 것으로 사료되었다. 한편 동결성에 계절적 차이가 있었던 것은 소에서 Torner 등(1966), Tuli와 Singh(1983) 및 析田(1983)이 여름보다 겨울에 동결성이 우수했다는 것과 일치된 결과이며 산양에서 Evans와 Maxwell(1987)이 지적한 것과도 같았다.

Table 7의 정상침체율에서는 용해직후와 2시간배양에서 모두 계절간 및 개체간에 차이는 없었으나 개체변이가 큼을 알 수 있었다. 또한 배양후 4시간에서도 같은 경향을 보여 용해직후 수준의 50%로 크게 저하됨을 알 수 있었다. 본 결과의 정상침체율은 박 등(1989)이 한국재래산양에서 보고한 것과 유사한 수준이었고 또한 Watson과 Martin(1972)이 면양에서 동결용해후 침체손상율이 소보다 높다는 것을 확인 할 수 있었다. 한편 Wells 등(1972)이 젖소에서 정상침체율이 가을과 겨울에 더 낮다고 한 것과는 차이가 있었다.

3) 난황침가 수준의 영향

여름정액을 세정후 난황수준이 다른 희석액에서의 동결전후 정자활력은 Table 8과 같다. 동결용해후의

정자활력이 20%수준에서 다소 높았으나 유의성은 없었다. 이러한 결과는 이미 앞에서 조사된 것과 같이 정액의 세정으로 난황응고 현상과 정장내 효소의 영향이 제거된 것과 관련이 있을 것으로 볼 수 있으며, 한편 Waide 등(1977)과 Abdelhakeam 등(1991)이 20~30%의 난황침가에서 양호한 결과를 얻은 것과 차이가 있는데 이는 동결방법의 차이는 물론이고 동결성에 영향을 주는 요인이 난황이외에도 여러 조건에 의한 것으로

Table 5. Individual variation in motility of washed and unwashed sperm after freeze-thawing in summer and fall

Goat No.	Sperm motility after thawing(%)		
	Unwashed	Washed	Total
1	34.0±15.2 ^a	34.0±25.1	35.2±21.2
2	11.0± 2.2 ^{ab}	45.0±25.5	28.0±24.7
3	8.0± 2.7 ^{ab}	26.0±14.7	17.0±13.8
4	3.4± 2.2 ^b	20.0±15.0	11.7±13.4
5	25.0±17.0 ^{ab}	41.0±20.7	33.1±19.7
6	—	43.3±23.1	—
7	—	35.0±21.2	—
8	—	22.5± 3.5	—

^{a,b}: Means with different superscripts in a column differ (P<0.05).

Table 6. Individual and seasonal variation in sperm motility before and after freezing

Freezing or thawing	Goat No.	Season				Average
		Spring	Summer	Fall	Winter	
Before freezing	1	54.3	80.8	55.0	70.7	60.3±22.2
	2	32.5	75.0	66.7	60.0	54.5±21.6
	3	40.0	70.0	66.7	65.0	51.8±22.7
	4	42.9	75.0	60.0	65.0	54.3±23.1
	5	45.7	40.0	76.7	65.0	54.3±26.5
	Average	44.1±22.4 ^b	68.0±21.0 ^a	65.0±19.9 ^a	64.0±12.6 ^a	
After thawing	1	32.9	5.1	26.7	40.0	28.6±18.7
	2	8.8	15.0	41.6	50.0	26.4±25.3
	3	24.3	10.0	21.7	40.0	23.9±20.9
	4	10.0	5.1	31.8	35.0	17.5±16.9
	5	20.3	10.1	25.0	40.0	20.0±16.0
	Average	19.1±17.4 ^c	9.0± 7.3 ^c	29.3±21.4 ^b	41.0±16.0 ^a	
2 h	Average	7.7±11.3	0	13.5±5.7	16.0±10.7	
4 h	Average	0.4± 1.2	0	4.5±4.3	4.1±5.1	

^{a,b}: Means with different superscripts within same rows differ (P<0.05).

Table 7. Individual and seasonal variation in normal apical ridge acrossome(NAR) of after freeze-thawing

After thawing (h)	Goat No.	Season*			Average
		Spring	Fall	Winter	
0	1	40.0	43.5	36.5	31.5±17.3
	2	28.3	40.5	34.0	28.0±17.4
	3	43.7	45.3	29.5	31.5±18.6
	4	27.0	27.0	34.0	23.1±14.5
	5	29.3	31.0	36.5	25.0±19.3
	Average		33.7±16.0	37.5±10.0	34.1±3.7
2	1	27.0	19.5	24.0	18.7±12.6
	2	20.0	23.0	29.0	18.3±14.2
	3	34.3	23.5	21.5	16.7±13.4
	4	19.3	10.5	22.5	16.4±14.0
	5	18.0	18.0	21.5	14.8±12.5
	Average		23.8±13.1	18.9±8.9	23.7±3.4
4	Average	13.1± 8.5	9.8±8.3	23.7±3.4	

*Percentage of NAR in summer was not investigated because motility after thawing was very low (<15%).

사료되었다. 또한 Watson과 Martin(1975)은 3~12% 난황수준에서 첨체손상에 차이가 없음을 보고한 바 있다. 본 실험에서 5%와 20%간에 차이가 없었으므로 보아 Iritani(1980)와 Evans와 Maxwell(1987)이 권장한 바와 같이 저농도의 난황첨가로 희석액을 개발함이 더욱 효과적임을 알 수 있었다.

4) Glycerol 첨가수준과 평형시간의 영향

Glycerol수준과 평형시간에 따른 여름정자의 활력과 정상첨체율은 각각 Table 9 과 10에서 보는 바와 같다. 동결직전과 용해직후의 정자활력은 수준과 평형시간간에 차이가 없었으나 용해후 2시간 때 3.2%와 3시간 평행에서 가장 양호하였고 6.4%에서 1.5시간은 활력이 현저히 낮았다(P<0.05). 한편 동결용해후의

정상첨체율에서도 역시 3.2%의 3시간에서 가장 높았고 6.4%의 1.5시간에서 낮았다. Glycerol수준이 낮을 경우 동결성이 좋았던 결과는 Waston과 Martin(1975)의 보고와 일치하였으며 Tasseron 등 (1977)이 glycerol에 의한 첨체손상을 보고한 것과도 유사한 결과였다. 또한 Deka와 Rao(1986)가 4~9%에서 평형후와 동결용해후에 정자활력에 차이가 없었던 결과와도 유사한 경향이었다. 한편 3%에서 더욱 양호하였던 Rossouw(1974)와는 차이가 있었다. Glycerol 평행시간에서 3시간이 보다 우수하였던 결과는 Van der Westhuysen(1978)와 유사하였으나, Salamon과 Ritar(1982)가 4%의 1단계 희석에서 1.5시간이 우수했던 결과와 Deka와 Rao(1972) 및 Sahn와 Roy(1972)가 1~5시간 평행간에 차이가 없었던 것과는 달랐다. 한편 박 등(1989)이 한국재래산양에서 6시간의 평행조건에서 3%보다는 6~9%에서 용해후 정자활력과 정상첨체율이 좋았던 것으로 보아 재래산양에서의 glycerol첨가방법을 개선하기 위해서는 여러가지 요인을 고려하여 재검토의 필요가 있어야 할 것으로 사료되었다. 또한 평행시간이 긴 경우에 성적이 다소 좋아진 결과는 Waide 등(1977)이 6~18시간의 평행과 특히 난황용고 개채와 정액에서 6~8시간의 평행에서 더욱 우수한 결과였던 것과 비교해 볼 때 3시간

Table 8. Effect of egg yolk on sperm motility before and after freezing in summer

Egg yolk(%)	Sperm motility(%)	
	Before freezing	After freezing
5	46.0±29.1	8.5±10.0
10	34.5±19.8	14.3±14.5
20	37.0±16.5	17.7±15.4

Table 9. Effect of glycerol level and equilibration time on sperm motility normal apcal ridge(NAR) acrosome before and after freezing in summer

Glycerol		Sperm motility(%)			NAR(%)	
Level (%)	Equilibration (h)	Before freezing (h)	After freezing(h)		After freezing(h)	
			0	2	0	2
3.2	1.5	80.0±6.3	23.3±10.3	17.0±5.5 ^{ab}	28.3± 5.9 ^b	15.7±8.8 ^{ab}
	3	75.8±6.6	36.7±10.3	15.0±5.5 ^a	43.2±10.5 ^a	17.0±4.7 ^{ab}
6.4	1.5	76.7±9.8	21.7± 7.5	6.7±2.6 ^b	32.0± 4.1 ^b	6.7±8.6 ^c
	3	74.2±6.2	30.0±11.0	14.2±6.6 ^{ab}	35.6± 6.3 ^{ab}	12.0±8.5 ^c

^{a,b,c} : Means with different superscripts within same column differ (P<0.05).

Table 10. Penetration into zona-free hamster eggs by fresh and frozen-thawed sperm

Goat No.	Fresh sperm		Frozen-thawed sperm	Total
	Summer	Winter	Winter	
1	2 /18(11.1)*	2 /16(12.5)	1 /16(6.3)	5 /50(10.0)
2	1 /19(5.3)	1 /15(6.7)	0 /14(0.0)	2 /48(4.2)
3	0 /15(0.0)	1 /27(3.7)	0 /14(0.0)	1 /56(1.8)
4	1 /24(4.2)	1 /17(5.9)	1 /13(7.7)	3 /54(5.5)
Total	4 /76(5.3)	5 /75(6.7)	2 /57(3.5)	11 /208(5.3)

* No. of eggs penetrated /no. of eggs examined(%).

이상의 평행시간의 고려도 중요한 부분이라 생각되었다.

3. 정자의 난자침입율

비동결정자와 동결정자에서 개체별 산양의 정자침입율은 Table 10과 같다. 1번개체에서 다소 높았고 3번개체가 가장 낮았다. 그러나 개체간에는 물론 비동결과 동결정자간, 여름과 겨울간에 침입율의 차이는 없었다. 공시산양두수와 공시난자공급등 실험수행상 여러가지 제약조건으로 실험이 계속되지 못한 중간성적이기 때문에 Bou와 Hanada(1985)가 산양에서, Pavlok와 Flechon(1985)이 면양에서 정자침입율에 개체차이가 있었다는 결과를 확인할 수는 없었다.

IV. 적 요

본 연구는 한국재대산양에서 계절적 정액성상의 변화와 정자의 동결성 변화 및 정자의 투명대체저 햄스터난자의 침입을 알기 위하여 실시하였다. 전기자극반응, 정액성상, 동결융해후의 정자활력과 정상침체율의

개체 및 계절적 차이를 5두에서 2년간 4계절에 걸쳐 조사하였으며, 정자침입율은 4두에 대해서 조사하였다.

1. 전기자극 probe의 삽입깊이와 통전시간은 7cm와 3초간 반복실시가 다른 자극조건보다 더 효과적이었다(P<0.05).
2. 전기자극법에 의한 정액성상에서 정액량은 봄 가을에, 정자농도는 봄 여름, 정자활력은 가을에 각각 많거나 높았다(P<0.05). 한편 총정자수는 봄 여름에 높았으나 계절간에 차이는 없었다.
3. 전기자극반응은 봄, 여름, 가을에서 모두 개체차이가 있었으며(P<0.05)정액성상에서 정액량은 봄 가을에 개체차이가 있었으나 정자농도와 총정자수에서는 개체차이가 없었다.
4. 정액동결에서 정자활력에 대한 세정효과는 난황 응고여부에 관계없이 크게 유효하였다(P<0.05).
5. 동결전냉각시 정자활력은 봄정액에서 현저히 낮았으며(P<0.05), 동결융해후에는 겨울에 활력이 가장 높았다(P<0.05). 미세정정자에서는 동

결성에 개체차이가 있었다. 개체간에 연평균 내 동성의 개체차이는 없었다. 동결융해후의 정상 침체율에서도 계절간 및 개체간에 차이가 없었다.

6. 여름에 동결융해후의 정자활력은 20%난황첨가 구에서 다소 높았으나 5%첨가구와 차이가 없었다.
7. 여름에 동결융해후의 정자활력과 정상침체율은 3.2% glycerol과 3시간 평행에서 가장 좋았다 ($P < 0.05$).
8. 투명대제거 햄스터 난자내로의 정자침입율은 종모양 및 계절간에 차이가 없었다.

이상 연구결과를 종합할 때 한국재래산양에서 전기자극법으로 정액생산의 최대화와 성공적 동결을 위해서는 4계절에서 전기자극반응이 양호한 개체의 선정이 고려될 수 있으며 정자동결성은 개체보다는 계절영향이 컸다.

V. 인용문헌

1. Abdelhakeam, A.A., E.F. Graham, I.A. Vazquez and K.M. Chaloner. 1991. Studies on the absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen. *Cryobiology*. 28:43-49.
2. Arriola, J. and R.H. Foote. 1987. Glycerolation and thawing effects on bull spermatozoa frozen in detergent-treated egg yolk and whole egg extenders. *J. Dairy Sci.* 70:1664-1670.
3. Austin, J.W., R.B. Leidy, G.M. Krise and W. Hupp. 1968. Normal values for semen collected from Spanish goats by two methods. *J. Applied Physiol.* 24:369-372.
4. Bou, S., A. Hanada. 1985. Penetration of zona-free hamster eggs *in vitro* by egaculated goat spermatozoa after treatment with ionophore A23187. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 31:115-121.
5. Carter, P.D., P.A. Hamilton and J.H. Dufty. 1990. Electroejaculation in goats. *Aust. Vet. J.* 67:91-98.
6. Cupps, P.T., B. McGowan, D.F. Rahlmann, A.R. Reddon and W.C. Weir. 1960. Seasonal changes in the semen of rams. *J. Anim. Sci.* 19:208-213.
7. Dacheux, J.L.C. Pisselet, M.R. Blanc, M.T. Hochereau-de-Reviers and M. Courot. 1981. Seasonal variations in rete testis fluid secretion and sperm production in different breeds of ram. *J. Reprod. Fert.* 61:363-371.
8. Deka, B.C. and A.R. Rao. 1986. Effect of glycerol level in tris-based extender and equilibration period on quality of frozen goat semen. *Theriogenology*. 26:231-238.
9. Eaton, O.N. and V.L. Simmons. 1952. A semen study of goats. *Am. J. Vet. Res.* 13:537-544.
10. Evans, G. and W.M.C. Maxwell. 1987. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Butterworths, Sydney, pp. 85-91, 122-141.
11. Iritani, A., Y. Nishikawa and R. Fukuhaha. 1961. Studies on the egg-yolk coagulating factor in goat semen. I. Localization of the coagulating factor and decline of pH following coagulation. *Proc. Silver Jubilee Lab. Anim. Husb. Kyoto Univ.* pp. 89-96.
12. Iritani, A. and Y. Nishikawa. 1963. Studies on the egg-yolk-coagulating factor in goat semen. III. Release of some acids accompanied by the coagulation phenomena. *Jap. J. Anim. Reprod.* 8:109-112.
13. Iritani, A., Y. Nishikawa and S. Nagasawa. 1964. Studies on the egg-yolk coagulating enzyme activity of the semen between breeding season and non-breeding season, and in each ejaculate collected three times successively. *Jap. J. Anim. Reprod.* 10:52-56.
14. Iritani, A. 1980. Problems of freezing spermatozoa of different species. 9th Int. Congr. Anim. Reprod & A.I. Vol. 1:155-132.

15. Langford, G.A., J.N.B. Shrestha and G.J. Marcus. 1989. Repeatability of scrotal size and semen quality measurements in rams in a short-day light regime. *Anim. Reprod. Sci.* 19:19-27.
16. Mann, J. 1981. Spermatological investigations in African dwarf goats (*Capra Hircus* L.) kept in Germany. *Anim. Res. Dev.* Vol. 14:86-100.
17. Mendoza, G., I.G. White and P. Chow. 1989. Studies of chemical components of Angora goat seminal plasma. *Theriogenology.* 32:455-466.
18. Moore, R.W. 1985. *NZ Vet. J.* 33:50 (Cited by Carter et al., 1990)
19. Pavlok, A. and J.E. Flechon. 1985. Some factors influencing the interaction of ram spermatozoa with zona-free hamster eggs. *J. Reprod. Fert.* 74:597-604
20. Ritar, A.J. and S. Salamon. 1982. Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. *Aust. J. Biol. Sci.* 35:305-312.
21. Ritar, A.J., P.D. Ball and P.J. O'may. 1990. Examination of methods for the deep freezing of goat semen. *Reprod. Fert. Dev.* 2:27-34.
22. Rossouw, A.F. 1974. Freezing of boer goat semen. *Southern African J. Anim. Sci.* 4:165-166.
23. Sahni, L.L and Roy, A. 1972. A note on seasonal variation in the occurrence of abnormal spermatozoa in different breeds of sheep goat under tropical conditions. *Indian J. Anim. Sci.* 42:501-504.
24. Salamon, S. and A.J. Ritar. 1982. Deep freezing of Angora goat semen : Effects of diluent composition and method and rate of dilution on survival of spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.* 35:295-303.
25. Song, H.B and A. Iritani. 1985. Indirect assessment of sperm capacitation using zona-free hamster eggs in the goat. II. Penetration into zona-free hamster eggs by goat spermatozoa preincubated in a chemically defined medium. *Korean J. Anim. Reprod.* 9:153-157
26. Steel, R.G.D and J.H. Torrie. 1980. Principles and procedures of statistics, 2nd ed., McGraw-Hill, New York, pp. 187-188, 191-192.
27. Tasseron, F., D. Amir and H. Schindler. 1977. Acrosome damage of spermatozoa during dilution, cooling and freezing. *J. Reprod. Fert.* 51:461-462.
28. Tomer, N.S., B.S. Misra and C.B. Johari. 1966. Seasonal variations in reaction time and semen production of semen attributes on initial motility of spermatozoa in Hariana and Murrah bulls. *Indian J. Dairy Sci.* 19:87-93.
29. Tuli, R.K. and M. Singh. 1983. Seasonal variation in freezability of buffalo semen. *Theriogenology.* 20:321-324.
30. Tuli, R.K., R. Schmidt-Baulain and W. Holtz. 1991. Influence of thawing temperature on viability and release of glutamic oxaloacetic transaminase in frozen semen from Boer goats. *Anim. Reprod. Sci.* 25:125-131.
31. Van der Westhuysen, J.M. 1978. Observations on the deep-freezing of Angora goat semen. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 8:111-113.
32. Watson, P.F. and I.C.A. Martin. 1972. A comparison of changes in the acrosomes of deep-frozen ram and bull spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 28:99-101.
33. Waide, Y., T. Niwa, and R. Asanuma. 1977. Studies on preservation of liquid and frozen semen of domestic animals. III. Viability and fertility of frozen goat spermatozoa. *Jpn. J.*

- Anim. Reprod. 23:129-137.
34. 강석원, 정길생. 1976. 한국재래산양의 정액성상에 관한 연구. 한축지 18:117-124
 35. 박창식, 양문한, 황덕수, 이규승, 서길웅. 1989. 한국 재래산양 정자의 액상 및 동결보존에 관한 연구. 한축지 31:412-419.
 36. 박충생, 이용빈. 1972. 성성숙기를 통한 재래산양의 정소 Biopsy에 관한 연구. 한축지. 14:1-7
 37. 박충생. 1973. 우리나라 재래 숫염소의 성성숙 과정에 관한 연구. 경상대학논문집 제12호.
 38. 析田博司. 1983. 牛精液の凍結保存技術に關する最近の研究動向と今後の問題點(1). 畜産の研究. 37:484-490.