

감성돔, *Acanthopagrus schlegeli* 정액의 특성과 정자의 운동성

장영진 · 임한규 · 고강희

부산수산대학교 양식학과

Properties of Semen and Sperm Motility in Black Seabream, *Acanthopagrus schlegeli*

Young Jin Chang, Han Kyu Lim and Kang Hee Kho

Department of Aquaculture, National Fisheries University of Pusan
Pusan 608-737, Korea

ABSTRACT

In order to obtain the basic knowledges concerned to the semen preservation of aquacultural fishes, studies on the physical and chemical properties of semen, and sperm motility with the different osmotic pressures making by adding Na^+ , K^+ , Mg^{++} and Ca^{++} to artificial seawater (ASW) were conducted in black seabream, *Acanthopagrus schlegeli*.

Average semen volume per fish in one strip was 1.97 ml and sperm concentration was $2.33 \pm 1.30 \times 10^{10}$ sperm/ml. Spermatocrit and pH of semen were 90.6 ± 5.0 and 8.3 ± 0.1 , respectively. Osmotic pressures of rearing seawater, seminal fluid and plasma were 939 ± 24 , 382 ± 70 and 342 ± 77 mOsm/l, and Na^+ , K^+ and Cl^- concentrations of seminal fluid were 169.5 ± 4.5 , 4.9 ± 2.2 , 156.0 ± 2.0 mM/l, respectively.

When semen were diluted by using Na^+ , K^+ , Mg^{++} and Ca^{++} free ASW, only Na^+ free ASW had no sperm motility. As raising osmotic pressure graduary by addition of 1 M NaCl to the Na^+ free ASW, spermatozoa showed the high motilities in 457~1128 mOsm/l, but the low motilities in 1398~1736 mOsm/l. In the case of same treatments with 1 M of KCl, MgCl_2 and CaCl_2 to the K^+ , Mg^{++} and Ca^{++} free ASW, spermatozoa revealed the high motilities in 904~1434, 818~1175 and 956~1343 mOsm/l, respectively.

서 론

어류양식에서 정자의 보존기술은 자연산 어미를 이용하여 인공수정시킬 때, 어획된 암수의 성비 불균형에 따른 어려움을 극복할 수 있게 하며, 암수의 성숙 및 배우자 방출에 동시성이 없을 경우라도

인공수정을 용이하게 한다. 그리고 수컷 친어의 수송을 필요로 하지 않고, 재래종 및 우량종의 종 보존이 가능하며, 특정 형질을 가진 정자를 이용하여 유전육종이 가능해진다는 장점이 있다.

어류의 정자보존에 관한 연구로는 Barrett (1950)가 연어의 정자가 0°C에서 며칠동안 생존한다고 보고한 것이 액상보존의 효시였다. 이후의 연구대상종도 연어과 어류를 비롯한 담수어류가 대부분으로, 정액에 항생제의 첨가(Stoss et al. 1978) 및 수분과 산소를 포화(Stoss and Holtz 1983)시킨 상태 그리고 희석액으로서 fluorocarbon과 같은 인공 혈액물질(McNiven et al. 1993)을 사용하는 등, 그 연구방향은 보존정자의 생존율과 수정능력을 높이려는 쪽으로 진행되고 있다. 그러나 상술한 바와 같이 정자보존의 중요성이 인정됨에도 불구하고, 해산어류 정자의 효과적인 보존에 있어 기초자료가 되는 정자활성에 관한 연구는 turbot, *Scophthalmus maximus* (Geffen and Frayer 1993) 및 청어, *Clupea palasii* (Morisawa et al. 1992)에 국한되고 있어, 담수어류에 비해 상대적으로 자료가 부족하고, 특히 양식대상 해산어류의 경우에는 그 연구결과가 미미한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 양식대상 해산어류의 정자보존을 위한 기초자료를 얻고자, 감성돔, *Acanthopagrus schlegeli*을 재료로 사용하여 정액의 물리 화학적 특성과 Na⁺, K⁺, Mg⁺⁺ 및 Ca⁺⁺ 등 양이온 농도별 삼투압에 따른 정자의 운동성을 비교하였다.

재료 및 방법

실험어로는 부산수산대학교 양식생리학연구실의 순환여과 사육시스템에서 사육한 2~3년생 감성돔을 사용하였다(Table 1).

Table 1. Average total length, body height and body weight of fish for the experiment

Total length (cm)	Body height (cm)	Body weight (g)	Number of fish
Mean±S.D.	Mean±S.D.	Mean±S.D.	
21.8±2.8	7.4±0.9	173.8±67.5	16

실험어는 lidocaine (200 ppm)으로 마취시킨 다음 비노생식공 주위를 가볍게 눌러 오줌과 배설물을 미리 제거하였다. 이후 마른 가아제로 비노생식공 주위를 깨끗이 닦은 다음, 복부를 가볍게 문질러 정액을 채취하였다. 채취된 정액은 시험관에 넣어 밀봉한 후 실험에 사용될 때까지 4°C로 보관하였다. 채취된 정액의 양은 0.1 ml까지 눈금이 표시된 시험관을 사용하여 측정하였다. 정자의 농도는 eosin 용액(0.125 M Na₂HPO₄, 80.4 ml + 0.125 M KH₂PO₄, 19.6 ml + eosin 1 g + aniline blue 1 g)으로 정자를 염색한 다음, 광학현미경 아래에서 혈구계산판에 의해 계수하였으며, 정액의 spermatocrit는 일반적인 혈액분석 방법인 microhematocrit법을 변형하여 측정하였다.

정액을 원심분리(6000 g, 10분)하여 얻은 정장의 삼투압과 양이온 농도는 삼투압 측정기(Fiske "OS™" Osmometer)와 이온 측정기(Ciba-Corning Diagnostics M664)를 사용하여 분석하였다.

희석액의 이온조성에 따른 운동성을 평가하기 위하여 원정액을 희석액과 1 : 50의 비율로 섞어 광학현미경 아래에서 Table 2의 운동지수에 따라 점수를 부여하고, 鄭等(1991)의 방법을 변형한 다음의 계산식에 의하여 정자활성지수(sperm activity index, SAI)를 구하였다.

$$SAI = \frac{\text{점수} \times \text{운동정자의 비율}(\%)}{100}$$

Table 2. Numerical index for the evaluation of sperm motility

Index	Score	Motility characteristics
I	4	Sperm display forward movement rapidly
II	3	Sperm display forward movement slowly
III	2	Sperm display forward movement slowly, and vibrating movement moderately
IV	1	Sperm display vibrating movement slowly
V	0	Immotile sperm

Na⁺, K⁺, Mg⁺⁺ 및 Ca⁺⁺ 등 양이온 농도별 삼투압에 따른 정자의 운동성을 평가하기 위하여는, Table 3의 인공해수 조성중 각 이온이 결여된 상태에서 1 M의 NaCl, KCl, MgCl₂ 및 CaCl₂ 용액을 첨가하여 이온농도와 삼투압을 단계적으로 변화시킨 회석액을 사용하였다. 정자의 운동성은 각기 다른 개체를 사용하여 5회 반복측정에 의해 조사하였다.

Table 3. Mineral composition of artificial seawater

Constituent	Concentration
NaCl	27.0 g
KCl	0.7 g
MgCl ₂	4.6 g
CaCl ₂	1.2 g
NaHCO ₃	0.5 g
Distilled water	1000 ml

결 과

1. 정액의 특성

감성돔 수컷의 체중 82.7~331.3 g 범위에서 개체당 정액량은 0.12~5.90 ml (평균 1.97 ml)였으며, 정자의 농도는 $0.54 \times 10^{10} \sim 3.56 \times 10^{10}$ sperm/ml (평균 $2.33 \pm 1.30 \times 10^{10}$ sperm/ml), spermatocrit는 82.7~95.9 (평균 90.6 ± 5.0)로 나타났으나, 체중과 각 측정값들 사이에는 상관적인 변화경향이 인정되지 않았다(Fig. 1). 한편, 정자농도에 대한 spermatocrit는 Fig. 2와 같이 정자농도 2.19×10^{10} sperm/ml에서 82.7이었던가, 2.63×10^{10} sperm/ml일 때 87.7, 3.11×10^{10} sperm/ml일 때 95.4로 변화함으로써, 정자농도의 증가에 따라 spermatocrit가 비례적으로 증가하는 경향을 보였다.

정액을 원심분리하여 얻은 정장의 pH는 8.3 ± 0.1 로 감성돔 혈장의 7.3 ± 0.1 에 비해 다소 높은 값을 보였다. 정장의 삼투압을 혈장과 비교하면 각각 382 ± 70 , 342 ± 77 로 서로 비슷하였으나, 이들 삼투압은 감성돔의 사육해수 삼투압인 939 ± 24 mOsm/l의 1/2 이하로 낮았다. 한편, 정장의 이온조성에서 Na⁺의 농도는 169.5 ± 4.5 mM, Cl⁻ 농도는 156.0 ± 2.0 mM로 서로 비슷하였으나, K⁻의 농도는 4.9 ± 2.2 mM로 매우 낮았다. 정장과 혈장에서의 각 이온은 거의 비슷한 조성을 나타냈다(Table 4).

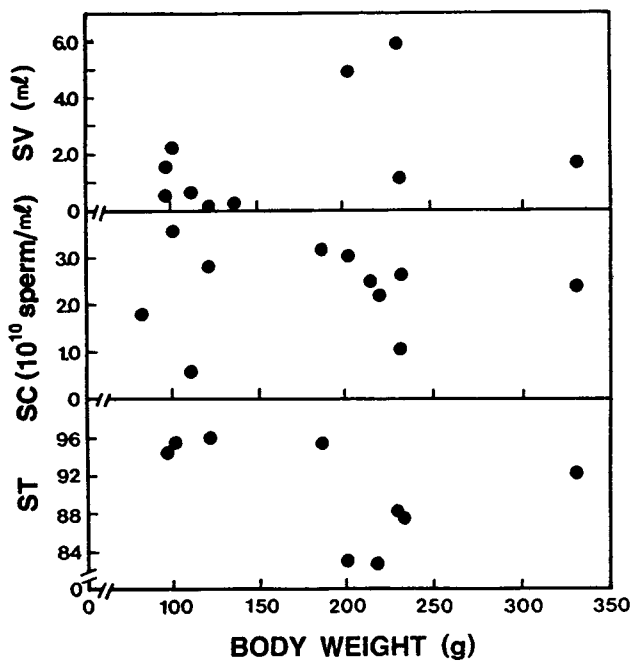


Fig. 1. Changes of semen volume (SV), sperm concentration (SC) and spermatocrit (ST) to body weight in black seabream.

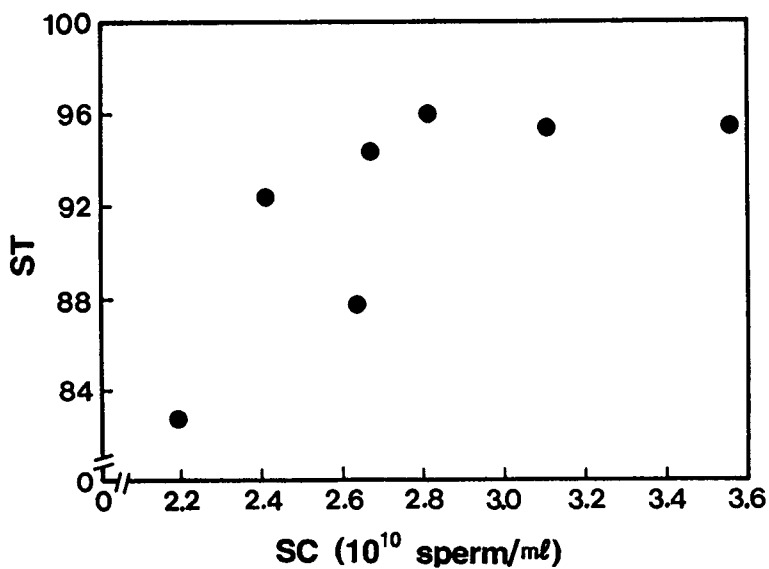


Fig. 2. The relationship between sperm concentration (SC) and spermatocrit (ST) in black seabream semen.

Table 4. Properties of semen, seminal fluid and plasma in black seabream

Properties	Seminal fluid	Plasma
pH	8.3±0.1	7.3±0.1
Osmotic pressure (mOsm/ℓ)	382±7.0	342±7.7
Na ⁺ (mM/ℓ)	169.5±4.5	182.0±3.6
K ⁺ (mM/ℓ)	4.9±2.2	4.6±0.4
Cl ⁻ (mM/ℓ)	156.0±2.0	158.5±9.1

2. 삼투압과 이온조성에 따른 정자의 운동성

인공해수와 Na⁺, K⁺, Mg⁺⁺ 및 Ca⁺⁺가 결여된 인공해수에서의 정자는 Fig. 3과 같이 각 이온조성에 따른 삼투압에 의해 운동성이 좌우되었다. Na⁺결여 인공해수(158 mOsm/ℓ)에 정액을 희석한 직후 정자의 운동은 전혀 관찰되지 않았다. 한편, 그외의 이온결여 인공해수중에서는 운동성이 인정되었으며, K⁺결여 인공해수(904 mOsm/ℓ)에서 SAI는 1.19, Mg⁺⁺결여 인공해수(818 mOsm/ℓ)에서 1.08, Ca⁺⁺결여 인공해수(956 mOsm/ℓ)에서 1.03의 순으로 활발한 운동이 관찰되었다. 그러나 모든 이온의 조성이 완전한 인공해수(1055 mOsm/ℓ)에서 정액희석 직후의 SAI는 0.74로 낮았다.

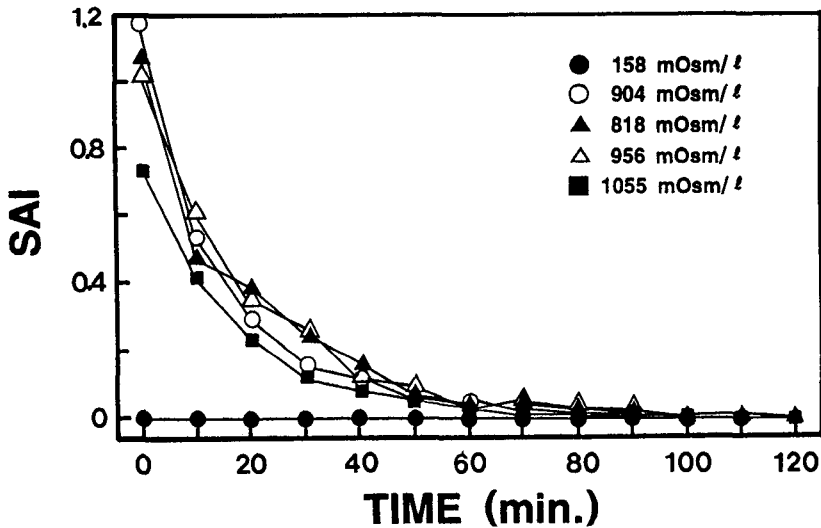


Fig. 3. Time courses of sperm activity index (SAI) of black seabream at several osmotic pressures by artificial seawater (ASW, ■), NaCl free ASW (●), KCl free ASW (○), MgCl₂ free ASW (▲) and CaCl₂ free ASW (△).

한편, Na⁺결여 인공해수에 1 M NaCl을 첨가하여 삼투압을 상승시켰을 때의 SAI는 Fig. 4A와 같이 삼투압 457~1128 mOsm/ℓ 범위에서는 1.13~1.25로 정자의 운동성이 높았으나, 삼투압이 1398 mOsm/ℓ로 높아졌을 때 운동성이 급격하게 떨어졌으며, 삼투압 1736 mOsm/ℓ에서는 0.12로 매우 낮

아졌다. 운동지속 시간도 SAI가 급격히 감소한 삼투압 1398 mOsm/ℓ 이상에서는 50분 이하로 짧았으나, Na⁺결여 인공해수(158 mOsm/ℓ)를 제외한 삼투압 1128 mOsm/ℓ 이하에서는 80~140분으로 길었다.

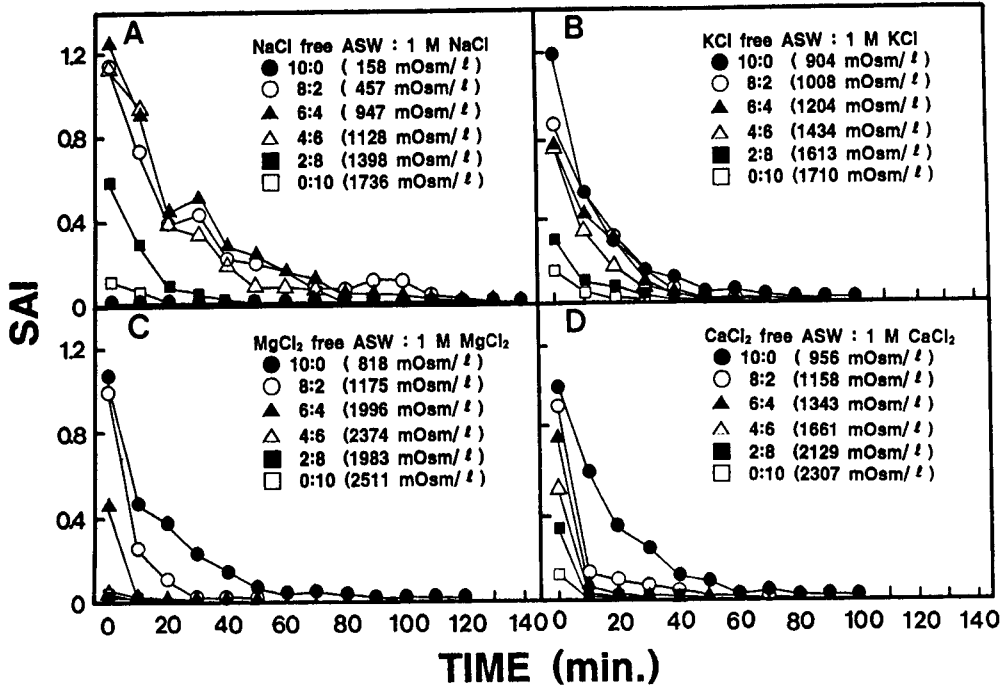


Fig. 4. Time courses of sperm activity index (SAI) of black seabream at several osmotic pressures by addition rates of Na⁺ (A), K⁺ (B), Mg⁺⁺ (C) and Ca⁺⁺ (D) in each ion free artificial seawater (ASW).

K⁺결여 인공해수에 1 M KCl을 일정비율로 첨가하여 삼투압을 상승시켰을 때의 SAI는 Fig. 4B와 같이 삼투압 904~1434 mOsm/ℓ 범위에서는 0.73~1.19로 정자의 운동성이 비교적 높게 나타났다. 그러나 삼투압 1613 mOsm/ℓ 이상에서는 0.30 이하로 낮아지고, 운동지속시간도 50분 이하로 나타나, 삼투압 904 mOsm/ℓ에서의 100분에 비하여 1/2 수준의 짧은 운동지속 시간을 보였다.

Mg⁺⁺ 및 Ca⁺⁺가 결여된 인공해수에 1 M MgCl₂와 1 M CaCl₂를 일정비율로 첨가하여 삼투압을 상승시켰을 때, Mg⁺⁺의 경우 삼투압 818, 1175 mOsm/ℓ에서 SAI는 각각 1.08, 1.00으로 나타났으나, 그 이상의 삼투압에서는 급격하게 낮아졌다. 반면, Ca⁺⁺ 농도가 다른 인공해수에서는 삼투압이 956 mOsm/ℓ에서 2307 mOsm/ℓ까지 증가함에 따라 SAI는 1.03에서 0.13으로 변화하였다. 정자의 운동지속 시간은 Mg⁺⁺ 농도가 다른 인공해수의 경우, 삼투압 818 mOsm/ℓ에서 120분이었으나, 그 이상의 삼투압에서는 60분 이하로 짧아졌다. Ca⁺⁺결여 인공해수에서도 삼투압 956 mOsm/ℓ와 1158 mOsm/ℓ에서 운동지속 시간은 90분 이상이었으나, 1343 mOsm/ℓ 이상의 삼투압에서는 50분 이하로 짧아졌다(Fig. 4C와 4D).

고 찰

본 연구에서 감성돔의 정자농도는 2.63×10^{10} sperm/ml로서 참연어, *Onchorhynchus keta*, *Auxis rochei* (Doi et al. 1982) 및 자바틸라피아, *Oreochromis mossambicus* (Chao et al. 1987)와 비슷한 수준이었고 가축인 소(鄭等 1991)와도 유사한 수준이었다. 그러나 어류에 있어서 정자농도와 정액량은 어종간 뿐만 아니라 동종내에서도 어체의 성숙도, 연령, 크기, 방정시기 및 정액의 채취빈도 등에 따라 차이가 크므로 (Piironen 1985), 이에 대한 세밀한 검토가 요구된다.

본 연구에서 감성돔의 체중별 1회 추출시 정액량, ml당 정자농도 및 spermatocrit의 변화는 일정한 상관관계가 없었다. 그러나 정자농도에 대한 spermatocrit는 정자농도가 증가할수록 높아짐으로써, 정자농도와 spermatocrit 사이에는 상관관계가 인정되었다. 이러한 경향은 무지개송어, whitefish 및 yellow perch (Ciereszko and Dabrowski 1993)에서도 인정되고 있으므로, spermatocrit에 의한 정자농도의 간접적인 판정이 가능할 것으로 생각된다.

해산어류의 정장 삼투압은 일반적으로 담수어류 보다 높다. 무지개송어의 정장 삼투압은 297 mOsm/kg이고, 금붕어와 잉어는 각각 317, 302 mOsm/kg으로 혈장 삼투압에 비해 30~50 mOsm/kg 높다(Morisawa 1985). 해산어류인 복섬과 감성돔에서는 각각 342, 359 mOsm/kg으로 담수어류에 비해 40 mOsm/kg 정도 높으며, 혈장 삼투압과는 비슷한 수준인 것으로 알려져 있다 (Morisawa 1985). 본 연구에서 감성돔 정장의 삼투압은 382 mOsm/l로 Morisawa (1985)의 결과와 비슷한 수준을 보였다.

본 연구에서 조사된 감성돔 정장의 Na^+ 농도는 해산어류인 복섬, 감성돔 (Morisawa 1985), turbot (Suquet et al. 1993)의 농도인 133~175 mM/l 범위에 속하는 169.4 mM/l를 나타냈으나, 담수어류인 금붕어(96 mM/l)나 잉어(75 mM/l) 보다는 두배 정도 높았다 (Morisawa et al. 1983). K^+ 농도는 4.9 mM/l로 복섬의 5.7 mM/l (Morisawa 1985)와 비슷하였다. 그러나 Morisawa (1985)가 제시한 담수어류인 무지개송어(37.3 mM/l), 금붕어(70.2 mM/l) 및 잉어(82.4 mM/l) 정장의 K^+ 농도에 비교하면 매우 낮은 수준이었다. 본 연구에서 측정된 감성돔 정장의 Cl^- 농도(156.0 mM/l)도 Morisawa (1985)가 연구한 감성돔(170 mM/l) 및 복섬(158 mM/l)과 비슷하였으나, 담수어류인 잉어나 금붕어 보다는 30~40 mM/l 정도 높은 수준이었다.

본 연구에서 감성돔 정자는 인공해수(1055 mOsm/l)와 정장(382 mOsm/l) 사이의 삼투압 범위에서 운동성이 높았으나, 1200 mOsm/l 이상에서는 삼투압 증가에 비례하여 운동성이 감소하였다. 그러나 삼투압이 158 mOsm/l이었던 Na^+ 결여 인공해수에서는 정자의 운동성이 전혀 관찰되지 않았다. Morisawa et al.(1992)은 청어의 정자가 정장과 등장인 용액에서는 움직이지 않지만, 고장액에 희석되면 운동을 개시한다고 하였다. 또, Morisawa and Suzuki (1980)는 복섬, 대구, 가자미류의 움직이지 않던 정자가 해수나 해수와 동일한 삼투압을 가진 용액에서 운동을 개시한다고 하여, 이들의 언급과 본 연구의 결과는 정자의 운동성을 촉진하거나 억제하는 요인이 환경수의 삼투압임을 나타낸다. 담수어류에서는 해산어류와 반대로 정장보다 낮은 삼투압에서 높은 정자의 운동성이 관찰되다가, 삼투압 상승과 함께 운동성이 감소하는 것으로 알려져 있다(Morisawa et al. 1983; Strussmann et al. 1994).

희석액중 K^+ 농도의 감소는 연어과 어류의 정자운동을 촉진시킨다는 Morisawa (1985)의 연구결과와는 달리 감성돔 정자의 운동성에는 영향을 미치지 않았다. 이것은 해산어류 정장의 K^+ 농도가 연어나 잉어 보다 낮은 반면, 환경수인 해수의 K^+ 농도는 오히려 담수에 비해 높기 때문이라고 생각된다. 결론적으로, 감성돔 정자의 운동성 변화는 양이온의 농도에 기인한다기 보다 양이온 농도에 따른 삼투압

변화에 직접적인 영향을 받는 것으로 판단된다.

요 약

양식어류의 정자보존을 위한 기초자료를 얻고자, 순환여과 사육시스템에서 사육한 전장 21.8 ± 2.8 cm, 체중 173.8 ± 67.5 g의 감성돔, *Acanthopagrus schlegelii*을 재료로 하여, 정액의 물리·화학적 특성과 Na^+ , K^+ , Mg^{++} , Ca^{++} 농도별 삼투압에 따른 정자의 운동성을 평가하였다.

개체당 1회 추출시 정액량은 평균 1.97 ml였으며, 정자의 농도는 $2.33 \pm 1.30 \times 10^{10}$ sperm/ml, spermato-crit는 90.6 ± 5.0 이었다. 정액의 pH는 8.3 ± 0.1 이었으며, 사육해수와 정장 및 혈장의 삼투압은 각각 939 ± 24 , 382 ± 70 , 342 ± 77 mOsm/l, 정장의 Na^+ , K^+ , Cl^- 농도는 각각 169.5 ± 4.5 , 4.9 ± 2.2 , 156 ± 2.0 mM/l였다.

Na^+ , K^+ , Mg^{++} 및 Ca^{++} 결여 인공해수에 정액을 희석시켰을 경우, Na^+ 결여 인공해수에서만 정자의 운동이 개시되지 않았다. Na^+ 결여 인공해수에 1 M NaCl을 서서히 첨가하여 삼투압을 상승시켰을 때, 삼투압 $1398 \sim 1736$ mOsm/l에서는 정자의 운동성이 낮았으나, $457 \sim 1128$ mOsm/l에서는 높은 운동성을 보였다. NaCl 첨가시와 같은 방법으로 K^+ , Mg^{++} 및 Ca^{++} 결여 인공해수에 1 M의 KCl, MgCl_2 및 CaCl_2 처리를 한 경우, 각각의 삼투압 범위 $904 \sim 1434$, $818 \sim 1175$ 및 $956 \sim 1343$ mOsm/l에서 정자의 운동성이 높았다.

사 사

본 연구에서 시료의 삼투압 및 이온 농도를 측정하는데 있어, 기기의 사용 및 측정시 조건을 해주신 동의대학교 생물학과 이복규 박사님께 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Barrett, I., 1950. Fertility of salmonid eggs and sperm after storage. J. Fish. Res. Bd. Can. 8 : 125~133.
- Bouck, G. R. and J. Jacobson, 1976. Assessment of salmonid sperm concentration by micro-hematocrit technique. Trans. Am. Fish. Soc. 105 : 534~535.
- Chao, N. H., W. C. Chao, K. C. Liu and I. C. Liao, 1987. The properties of tilapia sperm and its cryopreservation. J. Fish Biol. 30 : 107~118.
- Ciereszko, A. and K. Dabrowski, 1993. Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique. Aquaculture 109 : 367~373.
- De Montalembert, G., J. Marcel and R. Billard, 1980. La spermiation chez le brochet. 1. Evolution de la quantite de sperme recolte au cours de la saison de reproduction. Bull. Fr. Piscic. 276 : 90~103.
- Doi, M., T. Hoshino, Y. Taki and Y. Ogasawara, 1982. Activity of the sperm of the bluefin tuna *Thunnus thynnus* under fresh and preserved conditions. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 48 : 495~498.

- Geffen, A. J. and O. Frayer, 1993. Retention of sperm motility in turbot, *Scophthalmus maximus* L. : the effects of time from activation, thermal shock and adenosine triphosphate levels. Aquacult. Fish. Manage. 24 : 203~209.
- McNiven, M. A., R. K. Gallant and G. F. Richardson, 1993. Fresh storage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen using a non-aqueous medium. Aquaculture 109 : 71~82.
- Morisawa, M., 1985. Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleosts. Zool. Sci. 2 : 605~615.
- Morisawa, M. and K. Suzuki, 1980. Osmolality and potassium ion : Their roles in initiation of sperm motility in teleosts. Science, N. Y. 210 : 1145~1147.
- Morisawa, M., K. Suzuki, H. Shimizu, S. Morisawa and K. Yasuda, 1983. Effects of osmolarity and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. J. Exp. Biol. 107 : 95~103.
- Morisawa, M., S. Tanimoto and H. Ohtake, 1992. Characterization and partial purification of sperm-activating substance from eggs of the herring, *Clupea palasii*. J. Exp. Zool. 264 : 225~230.
- Piironen, J., 1985. Variation in the properties of milt from the finfish landlocked salmon (*Salmo salar m. sebago* Girard) during a spawning season. Aquaculture 48 : 337~350.
- Stoss, J. and W. Holtz, 1983. Successful storage of chilled rainbow trout (*Salmo gairdneri*) spermatozoa for up to 34 days. Aquaculture 31 : 269~274.
- Stoss, J., S. Buyukhatipoglu and W. Holtz, 1978. Short-term and cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) sperm. Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys. 18 : 1077~1082.
- Strussmann, C. A., P. Renard, H. Ling and F. Takashima, 1994. Motility of pejerrey, *Odontesthes bonariensis* spermatozoa. Fish. Sci. 60 : 9~13.
- Suquet, M., G. Dorange, M. H. Omnes, Y. Normant, A. Le Roux and C. Fauvel. 1993. Composition of the seminal fluid and ultrastructure of the spermatozoon of turbot (*Scophthalmus maximus*). J. Fish Biol. 42 : 509~516.
- Suquet, M., M. H. Omnes, Y. Normant and C. Fauvel, 1992. Assessment of sperm concentration and mortality in turbot (*Scophthalmus maximus*). Aquaculture 101 : 177~185.
- 鄭吉生 · 李在根 · 高光斗 · 尹昌鉉 · 邊明大 · 羅鎮洙 · 孫泰煥 · 金基龜, 1991. 家畜人工授精. 鄉文社, 서울, pp. 1~211.