

동결보존한 돼지정액의 용해조건이 정자의 생존율과 첨체변화에 미치는 효과

정영호 · 서경덕* · 김광식* · 심금섭* · 이장희**
중부대학교 생명자원학부

Effects of Thawing Conditions on the Viability and Acrosomal Morphology of Cryopreserved Boar Semen

Y. H. Chung, K. D. Seo*, K. K. Kim*, K. S. Shim* and J. H. Lee**

Division of Life Resource Science, Joongbu University

SUMMARY

This experiment was carried out to investigate the effects of osmolarity of thawing diluents, seminal plasma added in thawing diluents on the sperm viability and the effects of thawing temperature, the temperature of the thawing diluents on the sperm viability and acrosomal morphology of boar spermatozoa by the straw method. The result obtained were summarized as follows:

1. The sperm viability after thawing of the frozen semen was shown greater in the high osmolarity(392~492mOsm) than low osmolarity(300mOsm) in thawing diluent. The added levels of seminal plasma in thawing diluent did not affect the viability of frozen-thawed boar semen.
2. In terms of thawing temperature, the sperm viability was shown higher in the frozen semen thawed at 50°C for one min. ($p < 0.01$) than those thawed at 20°C or 37°C for one min. The sperm viability was not significant at the diluent temperature of 20°C or 37°C after thawing: but the sperm viability was higher in thawing diluent at 20°C than in that at 37°C. However, the effects of thawing temperature and diluent solution on normal acrosomal rate were not significant.
3. Cleavage rates of oocytes fertilized with frozen semen were 46.4% and 43.3%, respectively, which were thawed at 50°C for one min. and then diluted in mBTS medium at 20°C or 37°C.

To sum up, the sperm viability was shown greater at the high osmolarity of thawing diluents of frozen boar semen. In terms of thawing conditions, the sperm viability was shown greater, when semen was thawed at a high temperature for a short time and then diluted at the same temperature as that in the straw.

(Key words : boar, cryopreservation, thawing diluents, viability, acrosome morphology)

* 연암축산원예대학(Yonam College of Agriculture)

** 축산기술연구소(National Livestock Research Institute, RDA)

서론

돼지정자는 내동성이 약하고(Polge 등 1970), 동결융해후의 침체 이상율이 높아(Potter, 1979) 동결정액의 실용화에 커다란 장애가 되고 있어 동결정액의 생존율과 정상 침체를 향상을 위한 융해조건 개선에 관한 연구가 실시되어 왔다. Carbo와 Einarsson(1971)은 융해된 돼지정액을 정장이 첨가된 회석액으로 회석하여 정자의 수정능력에 미치는 영향을 검토하였고, Salamon 등(1973)은 회석액 중의 삼투압을 glucose의 농도로 조절하여 정액을 회석하였을 때, 고장액의 회석액이 저장액의 회석액보다도 높은 생존율을 얻었다고 보고하였으며, 이런 실험들에서 사용된 기본적인 회석액은 대부분 생리식염 용액 또는 BTS(Pursel과 Johnson, 1975)가 사용되었다.

한편 돼지정액의 동결보존 형태는 pellet 또는 straw 법이 주류를 이루고 있으며, 그 융해온도와 방법도 보존형태에 의해 다르다는 것을 보고하고 있다. 加藤 등(1976)은 1ml straw로 동결보존한 정액의 경우, 80℃에서 융해하였을 때에 정자의 생존율이 가장 높았다고 보고하였고, 5ml straw인 경우에는 50℃에서 50초간 융해하면 생존 정자중 활력이 높은 정자를 얻을 수 있었다고 보고하였다(川倉 등, 1984). Pellet 형태로 보존한 정액에 있어서 Wilmut(1977)는 50℃로 조절된 융해액으로 회석하였을 때 가장 높은 생존율을 얻었다고 보고하였다.

본 실험에서는 단순용액인 0.9% 생리식염 용액을 동결보존한 돼지정액의 융해후의 기본 회석액으로 하여 glucose 첨가농도를 다르게 하여 조절된 삼투압 또는 정장의 첨가농도가 정자의 생존율에 미치는 영향과 융해온도와 회석액의 온도가 정자의 생존율과 침체변화에 미치는 효과를 검토하고, 이러한 정자의 체외수정능력을 검토하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

1. 동결정액의 제조

충남 천안시 연암축산원예대학에서 정액 생산용

으로 사용하고 있는 종모돈을 이용하여 수압법으로 농후정액만을 분리하여 채취하였다. 채취한 정액을 실온에서 30℃까지 방치한 후, 동결전 처리액(Table 1)으로 동량 희석하고, 원심분리(500×g, 5min)하여 정자과 만을 남기고 25℃로 설정한 program 동결기(FHK, ET1N, Japan)에 넣고 여기에 20%의 난황을 첨가한 11%의 lactose(Sigma, L-3625) 용액(LEY 1차 희석액)으로 최종 첨가량의 반량을 첨가하고 13℃까지 냉각시킨 후, 6%의 glycerol이 첨가된 LEY 2차 희석액을 5℃까지 냉각시키는 과정(냉각속도, 25→5℃, 0.5℃/min)중에 분할 첨가법으로 정자의 최종농도가 60×10^8 /ml가 되도록 동량을 첨가하여 희석하였다. 희석된 정액을 5ml straw에 분주하여 봉입하고 액체질소 상면 5cm에서 20분간 예비동결 시키고, 액체질소 중에 침적시켜 동결시켰으며, 1주일 이상 보존 후 실험에 공시하였다.

2. 정액의 융해

실험 1. 회석액의 조건에 따른 생존율

5ml의 동결정액 straw를 50℃의 온수에 1분간 넣어 융해시켰다. 융해시킨 정액을 37℃로 조절한 0.9% NaCl(300mOsm) 또는 여기에 glucose를 100mM(392mOsm), 200mM(492mOsm), 300mM(600mOsm) 첨가한 회석액 또는 동결정액 제조시에 회수하여 동결보존한 정장을 5, 10, 30% 첨가한 95ml의 0.9% NaCl 중에 넣어 희석하였다. 희석 후 15분 간격으로 1시간 동안(0, 15, 30, 45, 60min)에 회석액 조건에 따른 정자의 생존율 변화를 검토하였다. 생존율의 검사는 Maxwell과 Johnson(1997)의 방법에 준하여, 정액에 Propidium Iodide(PI)

Table 1. Washing solution

Reagents	g/L
Glucose	60.0
Sodium citrate	3.75
NaHCO ₃	1.20
EDTA-2Na	3.70
Streptomycin	1.0
Penicillin G	1,000,000IU

와 SYBR-14 (LIVE/DEAD sperm viability kit, Molecular Probes, USA, L-7011) 용액을 첨가하여 20분간 배양염색하고 형광현미경(Olympus, Japan)하에서 400배의 배율로 관찰한 정자중에 연녹색의 정자는 생존정자로, 빨간색의 정자는 사멸정자로 판단하였다.

실험 2. 응해온도와 희석액의 온도가 정자의 생존율과 침체변화에 미치는 영향

5ml의 동결정액 straw를 20, 37, 50℃에서 각각 1분간 용해 후, 각각의 정액을 20 또는 37℃의 동결정액 희석액(Itani, 1994, Table 2) 95ml로 희석하고, 희석 후 0, 30, 60분에 각각의 정자 생존율과 침체변화를 검토하였다. 침체검사는 Maxwell과 Johnson(1997)의 방법에 준하여, 각각의 정액에서 소량의 정액을 취하여 도말건조하고, 이것을 0℃, 100%의 methyl alcohol중에서 2분간 고정, 건조시키고, 형광염색 시약인 FITC-PSA(L-0770, Sigma)와 Propidium Iodide(LIVE/DEAD sperm viability kit, Molecular Probes, USA, L-7011)로 20분간 도말염색한 다음, 증류수로 10분간 세척, 건조하여 형광현미경하에서 1000배로 관찰하였다. 판단기준은 Pursel 등(1972)의 방법에 준하여 정상침체, 반응중인 침체, 반응완료된 침체로 구분하고

Table 2. Thawing solution for freeze boar spermatozoa(NTS-I)

Reagents	g/L
Glucose	37.0
Sodium citrate	6.0
NaHCO ₃	1.25
EDTA-2Na	1.25
KCl	0.75
Tris	1.58
Citric acid	0.76
Sodium pyruvate	0.44
Amikacin	0.075
Penicillin G	250,000IU

(Fig. 1), 정상침체율은 관찰한 정자 중 정상침체만으로 하고 그 외의 정자는 모두 비정상인 상태의 정자로 하여 정상침체율을 조사하였다.

3. 동결응해한 돼지정자의 체외수정능력 평가

도축장에서 채취한 난소를 37℃의 생리식염수에 넣어 실험실로 옮겨, 직경 2~5mm의 난포에서 난자를 채취하고, PBS+BSA(3mg/ml)로 2회 세척, 1.0µg/ml estradiol, 10IU/ml hCG, PMSG, 10% PFF를 첨가한 성숙배지 (NCSU-23, Petters와 Wells, 1993)로 2회 세척하고, 200µl의 성숙배지에

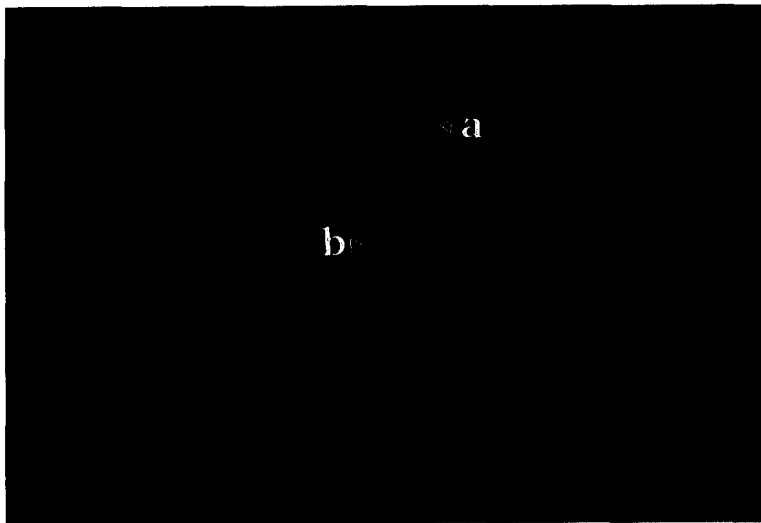


Fig. 1. Morphology of acrosome observed under the fluorescence microscope by $\times 1,000$. (a: intact acrosome, b: activating acrosome).

30개의 난자를 넣어 40~42시간 성숙배양(39℃, 5% CO₂)하였다.

50℃의 은수로 1분간 용해한 정액을 20℃ 또는 37℃의 수정용 용액(mBTS, Abeydeera와 Day, 1997)으로 희석하고 10분간 유지시킨 후 5분간 원심분리 세척하고(500×g), 1mM caffeine과 0.1% BSA가 첨가된 mTBS로 정자의 최종농도를 4×10⁶/ml로 조절하여, 성숙배양 종료 후 pipet으로 난구세포를 제거한 난자가 들어있는 mTBS 배지중에 정자의 최종농도가 1×10⁶/ml이 되도록 첨가하여 6시간 동안 수정을 위한 배양을 하였다. 수정 후 20시간에 일부의 난자를 1% orcein으로 염색하여 자동전핵이 형성된 난자를 수정된 난자로 하고, 나머지 난자는 pipet으로 난구세포를 완전히 제거한 후, 0.4% BSA를 첨가한 NCSU-23중에서 수정 후 144시간까지 배양을 하고 배 발달을 관찰하였다.

4. 통계처리

통계처리는 결과를 종합하여 분산분석(ANOVA)과 Fisher의 protected least significant difference (PLSD) test로 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 희석액의 조건에 따른 생존성

3%의 glycerol이 첨가된 LEY-extender로 동결한 돼지 정액을 0.9%의 생리식염 용액을 기본 희석액으로 하고, 여기에 다양한 농도의 glucose를 첨가하여 삼투압을 조절하고 용해정액을 희석하여 그 생존율을 검토한 결과는 Table 3과 같다.

희석액 내의 삼투압을 glucose농도로 조절하여 희석한 결과, 330~450mOsm의 삼투압에서 가장 높은 생존율을 얻었다고 보고하였다(Westendorf,

1975). 본 실험에서도 용해 후 45분 이후의 생존율에 있어서 삼투압이 392~600mOsm의 구가 29.3±1.6~32.9±2.0%로 300mOsm의 26.9±1.8%에 비하여 유의차는 인정되지 않았으나, 약간 높게 나타났으며, 동결정액의 용해후의 희석액 삼투압은 높은 것이 유리한 것이 인정되었고, Salamon 등(1973)도 일반적으로 동결정액의 용해후 희석액으로 사용하고 있는 Hulsenberg나 BTS는 동결액의 상태를 유지하고 있어 희석액의 삼투압을 glucose 농도를 증가시켜 삼투압을 고장액으로 한 결과 희석후의 생존율이 향상되었다고 보고하고 있으며, 본 실험에서도 유사한 결과가 인정되었으나, 반면에 용해 후의 생존율에 있어서, 삼투압이 가장 높게 조절된 구(600mOsm, 25.3±0.4%)는 300mOsm 구(26.9±1.8%)보다 낮아졌다. 따라서 동결정액의 희석액 삼투압으로서는 392~492mOsm이 정자의 생존율에 유리한 것으로 생각되며, 이것은 아마도 동결시 정자세포막내에 높아져 있는 삼투압이 동결액인 희석액에 의해 막투과가 급격하게 일어나지만 glucose로 희석액의 삼투압을 높이는 것에 의해 그 투과가 서서히 일어나 정자의 막을 보호하는 것에 의해 생존율이 증가되었다고 생각한다.

Carbo와 Einarsson(1971)은 희석액에 단백질원으로 정장을 첨가하여 사용하였으며, 정장이 첨가된 희석액으로 용해한 정액을 희석하여 인공수정을 하였을 때 정자의 수정능력이 향상되었다고 보고하였다(Larsson과 Einarsson, 1975). Table 4는 동결정액 제조시 희수한 정장을 희석액에 첨가하고 용해한 정액을 희석하고 시간경과에 따른 정자의 생존율을 조사한 결과로서, 정장의 첨가농도와 관계없이 정자의 생존율에 있어서 그 효과는 인정되지 않았으나, 희석후 60분의 생존율에 있어 정장을 30% 첨가한 구에 있어 무첨가 구에 비하여 약간 높

Table 3. Effect of osmolarity of thawing solution on viability of froze-thawed boar spermatozoa

Thawing solutions	Viability after thawing (% , mean±SE)				
	at thawing	after 15min	after 30min	after 45min	after 60min
0.9% NaCl ¹⁾	43.1±7.0	35.7±1.4	30.8±2.0	28.0±2.4	26.9±1.8
0.9% NaCl+100mM glucose ²⁾	43.1±7.0	31.4±3.3	31.0±2.2	30.0±2.6	26.8±1.4
200mM glucose ³⁾	43.1±7.0	28.1±1.1	30.4±2.6	32.9±2.0	29.9±0.7
300mM glucose ⁴⁾	43.1±7.0	26.7±1.0	29.4±0.5	29.3±1.6	25.3±0.4

*Osmolarity of 1), 2), 3), 4):300, 392, 492, 600mOsmols

Table 4. Effect of concentrations of seminal plasma(SP) in thawing solution on viability of froze-thawed boar spermatozoa

Thawing solutions	Viability after thawing (% , mean±SE)				
	at thawing	after 15min	after 30min	after 45min	after 60min
0.9% NaCl	39.4±0.1	34.4±2.5	35.3±1.2	31.9±3.1	28.9±1.2
0.9% NaCl+ 5% SP	39.4±0.1	32.1±0.8	32.5±4.2	27.5±3.5	27.3±1.9
10% SP	39.4±0.1	34.2±1.2	27.6±1.1	27.0±1.8	25.7±1.5
30% SP	39.4±0.1	33.0±3.1	30.8±1.6	25.8±4.6	29.7±3.0

았다. 한편 Einarsson과 Viring(1973)은 회석액에 첨가된 정장은 암컷 생식도관내에서 정자의 이동성과 생존성을 증진시키는 것에 작용하고, 이것은 정장이 직접 정자의 생존에 영향을 미치는 것이 아니라 정장중에 포함된 성분이 생식도관을 자극하는 것에 의한 것이라고 밝혔다(Westendorf 등, 1975). 본 결과에서도 정자의 직접적인 생존율에 있어서 정장의 효과는 인정되지 않았지만, 정장이 정자의 생존에 나쁘게는 작용하지 않은 것으로 생각되었다.

2. 용해온도와 회석액의 온도가 정자의 생존율과 침체변화에 미치는 영향과 체외 수정능

加藤 등(1976)은 1ml의 straw에 동결보존한 정액을 4, 15, 40℃ 또는 80℃에서 용해하고 40℃로 조절된 회석액으로 회석한 결과, 80℃에서 용해한 구가 그 생존율과 정상침체율이 높았다고 하였다. 또한 川倉 등(1984)은 5ml straw를 50℃에서 50초간 용해하였을 때 생존율 및 활력이 가장 좋았으며, 이 정액을 이용한 인공수정으로 100%(6/6)의 수태율을 보고하였다. 본 실험의 결과에 있어서 용해온도를 50℃에서 1분간 용해한 정자가 용해 후 1시간까

지의 생존율에 있어서 30% 이상 생존하는 정자가 인정되었지만, 그 외의 온도인 20 또는 37℃에서 용해한 정자는 16% 이하의 생존율이 인정되어 50℃에서 용해한 정자의 생존율이 유의적인 차이로 높았다(p<0.01, Table 5). 이것은 加藤 등(1976)은 1ml straw인 경우는 80℃에서 8~15초간 용해한 경우에서 가장 높은 결과를 얻었다고 보고하였으며, Westendorf 등(1975)도 6ml의 straw를 50~60℃로 용해하였을 때에 생존율이 높았다고 보고하고 있어, 이와 같이 연구자에 따라 얻어진 결과가 다른 것은 아마도 사용한 straw 크기가 다르기 때문이라고 생각된다. 따라서 straw 크기에 따라 적합한 용해온도가 설정되어야 한다고 생각된다.

한편 20, 37, 50℃에서 1분간 용해 후 37℃의 회석액으로 회석하는 것보다도 20℃의 회석액으로 회석하는 것이 특히 50℃로 용해한 구에서 생존율이 높은 것이 인정되었다. 이것은 아마도 5ml straw를 1분간 용해하여도 straw 내부는 온도가 충분히 올라가지 않았기 때문에 높은 온도에 회석하는 것에 의한 온도충격이 발생하기 때문이라고 생각된다. 한편 Almlid와 Johnson(1988)은 1.3ml의 straw를 50℃에서 40초간 용해하였을 때, straw내의 정액은

Table 5. Effect of temperature of thawing water and dilution on viability of froze-thawed boar spermatozoa

Thawing temperature	Temperature of dilution	Viability after thawing (% , mean±SE)		
		at thawing	after 30min	after 60min
20	20	16.2±1.0 ^a	16.2±0.3 ^a	16.1±0.5 ^a
	37	14.9±1.8 ^a	15.2±1.3 ^a	15.4±0.8 ^a
37	20	11.6±1.1 ^a	8.8±0.6 ^c	6.0±0.2 ^c
	37	7.5±1.3 ^c	7.0±0.4 ^c	6.5±0.2 ^c
50	20	29.2±2.2 ^b	31.3±0.8 ^b	30.2±1.7 ^b
	37	26.8±0.4 ^b	29.1±0.8 ^b	24.5±2.2 ^b

^{a,b,c} Different superscripts within the same column indicate significant difference(P<0.01).

Table 6. Effect of temperature of thawing water and dilution on normal acrosome of froze-thawed boar sperm

Thawing temperature	Temperature of dilution	Normal acrosome arte after thawing (% , mean±SE)		
		at thawing	after 30min	after 60min
20	20	51.1±1.1 ^a	43.2±1.0	37.7±0.3 ^a
	37	50.6±0.8 ^a	44.5±0.6	35.9±1.4 ^a
37	20	33.5±0.6 ^c	45.2±0.7	27.3±0.5 ^b
	37	49.8±0.3 ^a	37.2±1.0 ^a	27.2±0.9 ^b
50	20	60.2±0.4 ^b	50.5±0.5 ^b	36.0±2.3 ^a
	37	51.8±1.3 ^a	35.6±0.8 ^a	33.3±0.4 ^a

^{a,b} Different superscripts within the same column indicate significant difference (P<0.01).

Table 7. Effect of temperature of thawing diluent on fertilization rates and embryo development of *in vitro* fertilized pig oocytes by frozen-thawed boar spermatozoa

Temperature of dilutions	MPN(%)	develop to(%):		
		2-cell	8~16 cell	blastocyst
20	115 /144(79.9)	103 /222(46.4)	58 /222(26.1)	33 /222(14.7)
37	102 /133(76.7)	88 /203(43.3)	48 /203(23.6)	28 /202(13.9)

도는 약 18℃였다고 보고하였고 있어, 용해 후 straw내의 정액온도와 같은 온도의 희석액으로 희석하는 것이 정자를 온도충격으로부터 보호할 수 있다고 사료된다.

한편 정자의 용해온도와 희석액의 온도가 용해후의 침체에 미치는 영향에 있어서는 37℃에서 용해하는 것보다 20℃ 또는 50℃에서 용해하는 것이 정상침체율이 높았다(p<0.01, Table 6). 그러나 희석액의 온도에 의한 차이는 37℃보다 20℃가 정상침체율이 높았으나, 유의적인 차이는 인정되지 않았다. 그러나 이러한 결과는 加藤 등(1976)과 정 등(1977)이 보고한 19~40% 보다 높은 33.5±0.6~60.2±0.4%였다. 한편 50℃로 용해한 정액을 20 또는 37℃의 수정용 용액으로 희석하여 체외성숙시킨 정자에 대한 수정능력과 체외발생능력을 검토한 결과(Table 7), 융성전행의 형성율은 76.7~79.9%로 희석액의 온도간에 비슷하였으며, 배발생에 있어서도 희석액의 온도와 관계없이 유사한 비율로 정상분할율이 43.3~46.4%이었다. 이 결과는 최근에 Abeydeera와 Day(1997)이 보고한 40.1%의 결과와 일치하였다.

적 요

본 실험은 돼지동결정액의 용해후 희석액의 삼투압 및 정장의 첨가가 용해후의 생존율에 미치는 영향과 용해온도와 용해한 정액의 희석액의 온도가 정자의 생존율과 침체변화에 미치는 영향을 규명하기 위해서 실시하였다. 본 실험에서 얻어진 결과는 다음과 같다.

1. 동결용해한 정자의 생존율에 있어서 희석액의 삼투압(392~492mOsm)이 높은 것이 낮은 것(300mOsm)에 비하여 정자의 생존율이 높았다. 희석액 중에 첨가하는 정장은 정자의 생존율에 영향을 미치지 않았다.
2. 용해온도가 정자의 생존율에 미치는 영향에 있어 50℃에 용해한 것이 20 또는 37℃에서 1분간 용해한 것보다 높았다(p<0.01). 용해후 희석액의 온도(20℃ 또는 37℃)에 따른 유의차이는 인정되지 않았으나, 20℃의 희석액으로 희석한 것이 생존율에 있어 높았다. 그러나 정상침체율은 용해온도와 희석액의 온도에 의한 영향은 인정되지 않았다.
3. 50℃에서 1분간 용해한 정액을 20℃ 또는 37℃

의 수정용 용액(mBTS)으로 회석후 체외성숙시킨 난자의 수정후 분할율은 각각 46.4%와 43.3%였다.

이상의 결과로부터 동결용해한 돼지정액의 회석액의 삼투압은 높은 것이 정자의 생존율에 유리하며, 높은 용해온도에서 짧은 시간에 용해하고, 용해후 straw내의 온도와 같은 온도에서 회석하는 것이 정자의 생존에 유리한 것으로 사료된다.

참고문헌

- Abeydeera LR and Day BN. 1997. *In vitro* penetration of pig oocytes in modified tris-buffered medium: Effect of BSA, Caffeine and calcium. *Theriogenology*, 48:537-544.
- Almlid T and Johnson LA. 1988. Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straw. *J. Anim. Sci.*, 66:2899-2905.
- Carb B and Einarsson S. 1971. Fertility of deep frozen boar spermatozoa. *Acta. Vet. Scand.*, 12:125-127.
- Einarsson S and Viring V. 1973. Distribution of frozen-thawed spermatozoa in the reproductive tract of gilts at different time intervals after insemination. *J. Reprod. Fert.*, 32:117-120.
- Larsson K and Einarsson S. 1975. Fertility and post-thawing characteristics of deep-frozen boar spermatozoa. *Andrologia*, 7:25-30.
- Maxwell WMC and Johnson LA. 1997. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology*, 48:209-219.
- Petters PM and Wells KD. 1993. Culture of pig embryos. *J. Reprod. Fert.*, 48(suppl.1):61-73.
- Polge C, Salamon S and Wilmut I. 1970. Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. *Vet. Res.*, 87:424-428.
- Potter WL, Upton PC and Dunn BL. 1979. Morphological changes as observed by light microscopy of the acrosome of boar spermatozoa subjected to deep freezing. *Aust. J. Biol. Sci.*, 32:575-578.
- Pursel VG and Johnson LA. 1975. Effect of time of insemination on fertilizing capacity of frozen boar spermatozoa. *J. Anim. Sci.*, 41:375-379.
- Pursel VG, Johnson LA and Rampacek GB. 1972. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *J. Animal. Sci.*, 34:278-283.
- Salamon S, Wilmut I and Polge C. 1973. Deep freezing of boar semen. I. Effects of diluent composition, productive agents, and method of thawing on survival of spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.*, 26:219-230.
- Itani A. 1994. 양돈handbook. 일본. 양현당, pp: 218.
- Westendorf P, Richter L and Tren H. 1975. Zur tiefgefrierung von ebersperma. Laborund besamungsergebnisse mit dem hulsenberger pailletten-verfahren. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, 82:261-267.
- Wilmut, I and Polge C. 1977. The low temperature preservation of boar spermatozoa. 2. The motility and morphology of boar spermatozoa frozen and thawed in diluent which contained only sugar and egg yolk. *Cryobiology*, 14:479-482.
- 加藤征史郎, 井上陽一, 廣野森, 入谷明, 西川義正. 1976. Effect of thawing procedure on motility and acrosome system of frozen boar spermatozoa. *일본동결정액연구회회보*, 48: 15-19.
- 川倉一彦, 副島昭彦, 田博司. 1984. Straw법에 의한 돼지정액의 동결보존. *일본가축인공수정연구지*, 6:61-64.
- 정장용. 1977. 보존액의 조성 및 동결조건이 용해후 돼지정자의 생존성, 두모의 형태 및 수태에 미치는 영향. *영남대학교 석사학위논문*.

(접수일: 1999. 7. 5 / 채택일자: 1999. 8. 6)