

Royal Jelly 첨가가 동결융해 후 개 정자의 활력도 및 생존성에 미치는 영향

공 일 근[†] · 조 성 균
순천대학교 동물자원과학과

Effect of the Addition of "Royal Jelly" on Post-thaw Viability and Longevity of Canine Spermatozoa

I. K. Kong[†] and S. K. Cho

Department of Animal Science and Technology, Suncheon National University

SUMMARY

This study was conducted to evaluate whether "Royal jelly" (RJ) added to Tris-buffer dilute contributed to supporting post-thaw viability and longevity of frozen canine spermatozoa. Two Japanese spitzs (2 to 4 years of age) were used as a semen donor. Semen was collected by manual masturbation and separated into 3 fractions. Only the sperm-rich fraction having sperm motility of more than 70%, containing sperm concentration of $2\sim4\times 10^8$ cells/ml and having dead or abnormal spermatozoa of less than 15% was used for the experiment. Each ejaculated semen was centrifuged at $400\times g$ for 5 min and then diluted in a Tris-buffer supplemented with 20 ml egg yolk (Ext I), 4% glycerol and 1% Equex STM paste (Ext II) or glycerol, Equex STM paste and RJ of various concentrations (Ext II-RJ). After freezing and thawing, viability of spermatozoa in Ext II-RJ containing 1% RJ immediately after thawing (67.5 ± 9.6) was significantly lower than that of Ext II, Ext II-RJ containing 0.01 or 0.1% RJ (77.5 ± 12.5 , 78.7 ± 8.2 and 80.0 ± 6.3). However, Ext II-RJ containing 0.1% RJ yielded higher viability than Ext II, Ext II-RJ containing 0.01% RJ or 1% 1 h after thawing (69.5 ± 8.1 vs. 55.0 ± 12.9 , 57.5 ± 9.6 and 47.5 ± 12.6 ; $P<0.05$). At 1 h after thawing, the viability of spermatozoa thawed in 70°C (68.8 ± 12.5) was significantly higher than that of spermatozoa thawed in 38°C (48.8 ± 16.3), although there was no difference in the viability between both groups immediately after thawing (77.5 ± 9.6 and 81.3 ± 8.1). Post-thaw viability and longevity of post-thaw spermatozoa in Ext II-RJ containing 0.1% RJ was higher in those in Ext II at 1 h (65.0 ± 12.9 vs. 42.5 ± 12.6), 2 h (52.5 ± 12.6 vs. 27.5 ± 17.1) and 3 h (40.0 ± 14.1 vs. 20.0 ± 12.1) after thawing. These results indicated that addition of 0.1% RJ to Tris-buffer enhanced post-thaw viability and longevity of canine spermatozoa and this additive can be used for increasing the possibility of collision between spermatozoa and ova during insemination.

(Key words: royal jelly, spermatozoa freezing, viability, longevity, canine)

* 본 연구는 2000-2003년도 농림부 현장애로기술개발과제 연구비에 의하여 수행되었음.

[†]Correspondence : ikong@sunchon.ac.kr, Fax : 061-750-3236

서 론

정자 동결보존을 위한 새로운 기술개발 목적은 동결과정에서 최소한의 손상으로 용해 후 최대한으로 높은 활력도의 정자를 얻는 것이다. 동물의 종에 관계없이 정자가 난자와 수정하기 위해서는 적당한 생존성을 유지해야 한다. 동결보존방법을 평가할 때 일반적으로 체외방법이 이용되는데 (Amann, 1989) 그 방법들은 여러가지 독립적인 기준에 의한 검사가 요구된다. 그 중에서 가장 일반적인 방법으로는 정자의 전진운동성 검사이지만 침체의 형태와 정상 여부, 침체 내 효소들의 함유 정도 및 투명대와 결합할 수 있는 정자의 능력 등이 이용된다.

동결정액을 이용한 인공수정에는 임계적인 많은 요인들에 대한 세심한 주의가 요구된다. 이러한 요인들 중에는 정액채취, 희석, 희석액, 평형, 동결보존, 저장, 용해, 수정적기판단 및 정액주입부위 등이 있다. 동결정액으로 인공수정의 성공에서 이러한 요인들에 대한 분석을 위하여 많은 연구가 이루어져 왔다 (Farstad와 Anderson, 1989; Ferguson 등, 1989; Linde-Forsberg와 Forsberg, 1989; Morton과 Bruce, 1989). 또한 동결방법에 따른 체외영향에 대하여도 많은 연구가 이루어져 왔다 (Foote, 1964a, b; Province 등, 1984; Oettle, 1986; Yubi 등, 1987; Ivanova-Kicheva 등, 1995; Silva와 Verstegen, 1995; Hay 등, 1997; Rota 등, 1997; Strom 등, 1997; 김 등, 1994).

많은 희석액이 개 정액동결보존을 위해 연구되었으며, 그 중에서 Tris-buffer가 가장 일반적으로 사용되고 있고 높은 임신율을 얻을 수 있는 것으로 알려져 있다 (Anderson, 1975; Fontbonne와 Badinand, 1993; Nothling 등, 1995). 단백질을 용해하기 위해 사용되는 수용성 음이온 세척제인 sodium dodecyl sulphate (SDS)는 다양한 품종의 희석액에 포함되어 있다. 동결정액제조를 위한 희석액에 Equex STM paste 및 Orvus ES paste의 첨가 또는 SDS와 함께 첨가 시 정자의 운동성 증가 (Arriola와 Foote, 1987; Martin 등, 1979; Pursel 등, 1978)와 침체의 통합성 (Arriola와 Foote, 1987; Pursel

등, 1978) 및 체외와 체내의 높은 수정율을 얻을 수 있는 이점이 있다는 것이 소 (Arriola와 Foote, 1987), 돼지 (Pursel 등, 1978), 말 (Martin 등, 1979) 및 생쥐에서 보고되었다.

RJ에는 탄수화물 (13%), 단백질 (13%), 지방 (5%), 회분 (1%) 및 미량원소 등이 함유되어 있어 수정란 및 정자의 동결보존 시 좋은 영향을 미치는 것으로 판단된다. 생쥐수정란의 동결보존 시 RJ를 첨가하여 높은 생존율을 얻은 결과를 보고한 바와 같이 (Burkle 등, 1987; Visintin 등, 1988), 개의 동결정액제조 시 RJ첨가가 수정란의 동결보존 때와 같은 양호한 결과를 얻을 수 있을 것인가를 조사하였다.

본 연구에서는 동결보존 시 Tris-buffer에 Equex STM Paste와 RJ 첨가가 동결용해 후 정자의 생존율과 체외배양 시 생존기간에 어떠한 영향을 미치는가를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물의 관리와 정액채취

동결정액제조를 위하여 정액채취는 2~4세의 Japanese Spitzs 수캐 2두를 공시하였다. 공시축은 순천대학교 동물사육장의 애견사육실에서 물과 사료를 자유급식시키면서 독립 cage에 각각 사육하였다. 정액은 2~3일 간격으로 주당 2회씩 마사지법으로 채취하였다 (Fougner, 1989). 개의 사정은 three fraction으로 사정하기 때문에 sperm-rich fraction인 2nd fraction의 정액을 채취하였다. 채취한 정액은 37°C의 2 ml Ext. I을 천천히 조심스럽게 희석하여 400×g 로 약 5분간 원심분리하여 상층액은 버리고 다시 2 ml Ext. I으로 희석하였다.

2. 동결정액의 제조 및 용해

희석된 정액은 생존성, 전진운동성 및 수 등을 조사하고 동결정액 제조에 이용 가능 여부를 판단한 후 Table I과 같이 Tris-buffer 조성으로 Ext. I과 Ext. II 및 Ext. II-RJ로 제조하여 이용하였다 (Rota 등, 1997). Ext. I으로 희석된 정액은 5°C cold room에서 약 2시간 정도 냉각을 유도하여 5°C까지 냉각시킨 후 같은 용량의 Ext. II를 약 1시간에 걸

Table 1. Composition of Tris-buffer extenders for canine semen freezing

Compounds	Extender I	Extender II	Extender II-RJ
Tris	3.028g	3.028g	3.028g
Citric acid, monohydrate	1.678g	1.678g	1.678 g
Fructose	1.0g	1.0g	1.0g
Na-benzylpenicillin	0.06g	0.06g	0.06g
Streptomycin sulphate	0.1g	0.1g	0.1g
Egg yolk	20ml	20ml	20ml
Glycerol	-	8ml	8ml
Equex STM paste	-	1ml	1ml
Royal jelly			Various conc.
D.W.	to 100ml	to 100ml	to 100ml
pH	6.53	6.48	6.48
Osmolarity	280 mOsm/kg	1,370 mOsm/kg	1,370 mOsm/kg

* RJ added in Tris-buffer by 0.01, 0.1, 1 g/100 ml concentration.

쳐 희석을 시켜 평형을 유도하였다. 평형 후 정액의 최종농도를 50×10^6 cells/ml 농도로 조정 한 후 0.5 ml straw에 loading하여 액체질소 5 cm 위에 놓아 예비동결을 유도하였다. 예비동결된 straw는 액체질소에 침적하여 goblet에 담아 LN₂ tank에 저장하였다. 용해는 38°C에서 1분간 또는 70°C에서 6초간 용해를 실시하였다.

3. 동결용해 정자의 검사

동결정액의 용해 후 정자의 활력도와 생존성을 검사하기 위하여 용해는 70°C 온수에 약 6초간 실시하였다. 용해정자의 평가는 38°C로 조절된 warm plate 위에서 Wildt 등 (1988)의 방법에 준하여 운

동성 및 전진운동성 (0 = 운동성 전혀 없음; 5 = 지속적이고, 급속하게 전진운동성)을 평가하였다. 또한 체외에서 장시간 생존율을 조사하기 위하여 용해 후 38°C water bath에 저장하면서 용해직후, 1, 2 및 3시간 때에 1시간 간격으로 정자의 생존성도 위와 같은 방법으로 평가하였다.

결과 및 고찰

1. Royal jelly 첨가 여부에 따른 정자의 생존성

Tris-buffer에 적당한 RJ의 첨가농도를 알아보고자 Ext. II에 다양한 농도를 첨가하여 개의 정액동결을 실시하였다. Equex STM paste만이 첨가된 Ext.

Table 2. Effects of addition of RJ in Tris-buffer on viability of post-thaw spermatozoa

Concentrations of Rb added	Viability of post-thaw spermatozoa (Mean ± S.E.)	
	Immediately	1h later
Ext. II	77.5 ± 12.5 ^b	55.0 ± 12.9 ^a
0.01% Ext. II-RJ	78.7 ± 8.2 ^b	57.5 ± 9.6 ^a
0.1% Ext. II-RJ	80.0 ± 6.3 ^b	69.5 ± 8.1 ^b
1% Ext. II-RJ	67.5 ± 9.6 ^a	47.5 ± 12.6 ^a

Ext II was frozen in Tris-buffer with Equex STM paste only.

Experiments were replicated with 4 times.

Straws were thawed in 70°C for precisely 6 sec.

Values with different superscripts were significantly different in same column (P<0.05).

II와 Ext. II에 0.01, 0.1 및 1%의 RJ가 첨가된 Ext. II-RJ에서 동결정액의 제조 후 생존율을 조사하기 위하여 70°C 온수에서 6초간 급속용해를 실시하였다. 용해된 정자의 생존율은 용해 후 즉시 및 1시간 후에 각각 조사한 결과는 Table 2와 같다.

용해직후 생존율을 조사했을 때 1% Ext. II-RJ (67.5±9.6)가 Ext. II, 0.01 및 0.1% Ext. II-RJ (77.5±2.5, 78.7±8.2 및 80.0±6.3)보다 낮았으며, 또한 1시간 후 생존율은 0.1% Ext. II-RJ (69.5±8.1)가 Ext. II, 0.01 및 1% Ext. II-RJ (55.0±12.9, 57.5±9.6 및 47.5±12.6)보다 유의적으로 높았다 (P<0.05). Rota 등 (1997)은 희석액에 Equex STM paste를 첨가하여 82.1±3.9% 운동성과 92.8±2.8% 정상적인 원형질막을 얻었다고 하였다. Thomas 등 (1992)은 Equex STM paste의 희석액 첨가는 용해 후 활력과 장시간 생존능력을 향상시켜 개 동결정액제조에 매우 효과적인 것으로 보고하였다. Pursel 등 (1978)은 Equex STM paste의 성분은 희석액에 함유되어 있는 난황의 변형으로서 정자의 활성을 유도하는 것이 세정제 SDS인 것으로 판단된다고 하였다. 난황과의 상호작용은 활성분자들의 용해화에 관련이 있을 수 있다는 가설은 단지 상층액이 원충액의 준비에 사용되었을 때만 관찰됨으로써 지지 받았고, SDS를 원심분리전에 난황에 첨가하는 것이 후에 첨가하는 것보다 용해 후 운동성에 매우 효과적인 영향을 미쳤다고 보고하였다 (Penfold와 Moore, 1993). 본 연구에서 0.1% RJ를 Ext II에 첨가하는 것이 용해 후 생존율과 1시간 후 생존율에 가장 효과적인 것으로 판단되었다. 이후의 실험에서는 RJ 첨가군에서는 0.1% RJ를 첨가하여 실시하였다.

2. 용해속도에 따른 생존성

동결정액의 용해속도에 따른 생존율을 조사하기 위하여 0.1% Ext. II-RJ 희석액으로 동결보존 후 38°C에서 1분간 또는 70°C에서 6초간 용해 후 조사한 결과는 Table 3과 같다. 급속간이동결 후 용해 시 급속용해 (70°C에서 6초간)와 완만용해 (38°C에서 1분간)의 경우 용해직후(81±3.1 및 77.5±9.6)에는 차이가 없었으나, 1시간 경과 후 (68.8±12.5 및 48.8±16.3)에는 급속용해가 유의적으로

Table 3. Effects of thawing temperature on viability of post-thaw spermatozoa frozen by 0.1% Ext-RJ

Thawing temperature	Viability of post-thaw spermatozoa (Mean±S.D)	
	Immediately	1 h later
38°C	77.5±9.6	48.8±16.3 ^a
70°C	81.3±8.1	68.8±12.5 ^b

Spermatozoa was frozen in Tris-buffer supplemented with 0.1% RJ.

Experiments were replicated with 4 times.

Values with different superscripts were significantly different in same column (P<0.05).

높은 생존율을 보였다 (P<0.05).

동결정액의 용해 후 높은 생존율을 얻기 위해서는 동결속도와 용해속도가 적당하게 맞아야 한다고 보고가 있다 (Mazur, 1984; Hammerstedt 등, 1990). 일반적으로 급속동결은 동결과정동안 유기되었던 현상들과 유사한 형태의 세포막 지질단백질구조 회복과 재수화 및 삼투압 균형의 회복을 위해 급속용해가 요구된다. 같은 포장용기와 희석액을 사용했을 시라도 다양한 동결용해방법이 개 정액을 위해 보고되었다. 용해방법에는 0.5 ml straw를 사용하였을 때 70°C에서 6.5초간 (Anderson, 1972), 70°C에서 8초간 (Farstad, 1984; Hofmo, 1988 (fox), 50°C에서 30초간 (Silva와 Versteegen, 1995), 30°C에서 30초간 (Oettle, 1982), 37°C에서 2분간 및 55°C에서 5초간 (Dobrinski 등, 1993)이 보고되었다. England (1992)는 급속용해는 완만용해보다 유의적으로 높은 온도저항성뿐만 아니라 용해직후 높은 운동성을 얻었다고 보고하였다.

3. 체외노출시간에 따른 정자의 생존성

동결정액을 이용한 인공수정 시 동결정자의 생존기간이 난자와의 수정 가능성을 향상시키는데 결정적인 영향을 미치기 때문에 매우 중요한 요인이다. 동결정액의 용해 후 매 시간마다 3시간까지 생존율을 조사한 결과는 Table 4와 같다. Ext. II와 0.1% Ext. II-RJ 간에는 용해직후 (72.5±9.6 및 80.0±14.1)에는 생존율에 차이가 없었지만, 용해 후 1,

Table 4. Longevity of post-thaw spermatozoa according to incubation time at 38°C waterbath

Type of Tris-buffer	Longevity of post-thaw spermatozoa(Mean±S.E.)			
	Immediately	1h	2h	3h
Ext. II	72.5±9.6 ^a	42.5±12.6 ^a	27.5±17.1 ^a	20.0±12.1 ^a
0.1% Ext. II-RJ	80.0±14.1 ^a	65.0±12.9 ^b	52.5±12.6 ^b	40.0±14.1 ^b

* Experiments were replicated with 4 times.

* Values with different superscripts were significantly different in same column (P<0.05).

2 및 3시간 (Ext. II: 42.5±12.6, 27.5±17.1 및 20.0±12.1; 0.1% Ext. II-RJ: 65.0±12.9, 52.5±12.6 및 40.0±14.1)간에는 유의적인 차이를 보였다(P< 0.05).

Strom 등 (1997)은 Anderson 및 CLONE 동결방법으로 동결용해 후 37°C에서 용해직후, 1, 2 및 3시간에 걸쳐 운동성을 조사한 결과 Anderson 방법 (69.±3.2, 45.0±9.6, 30.3±12.4 및 22.4±14.1)과 CLONE 방법 (73.7±3.2, 20.3±11.8, 6.1±3.4 및 2.5±1.6) 간에 용해 직후에는 차이가 없었지만 시간이 경과할수록 유의적인 차이를 보였다고 하였다. Anderson 방법은 LN₂ vapour에 의한 급속동결과 70°C에서 8초간 급속용해를 실시하는 간이급속동결 및 용해방법인 반면에 CLONE 방법은 LN₂ tank에서 goblet의 높이를 낮추면서 동결속도를 조절하는 완만동결과 37°C에서 15초간 용해 후 37°C 희석액에 5분간 정치 후 조사하는 완만동결 및 용해방법이다. 즉, 완만동결방법은 용해 후 정자의 운동성과 시간이 경과하면서 운동성이 급속동결방법보다 급속하게 떨어지는 경향을 보였다. 또한 Rota 등 (1997)은 egg yolk-tris-glycerol (EYT-G)와 EYT-G에 Equex STM paste를 첨가(YET-GE)한 희석액으로서 동결 후, 용해즉시, 1, 2 및 3시간 후에 운동성을 조사한 결과 EYT-GE (61.4±7.7, 50.0±12.6, 41.8±18.1 및 35.4±19.5)가 YET-G (56.4±5.6, 20±17.3, 9.6±9.2 및 7.1±7.1)보다 용해 후 1, 2 및 3시간째에 유의적으로 높은 운동성을 보여 Equex STM paste를 첨가하는 것이 효과적이었다고 보고하였다. 본 연구의 결과에서는 급속동결용해방법을 이용하여 RJ첨가 여부에 따른 용해직후, 1, 2 및 3시간경과에 다른 생존율을 조사한 결과 0.1% Ext. II-RJ와 Ext. II 간에는 유의적인 차이를

보였다. 이러한 결과에서 0.1% RJ와 1% Equex STM paste를 동시에 Tris-buffer에 첨가한 0.1% Ext. II-RJ를 이용한 개의 동결정액 제조를 실시할 경우 이들의 보합효과 (synergic effect)를 얻은 결과로 판단된다. 또한 이러한 동결정액 희석액을 이용하여 제조한 동결정액으로 개의 인공수정에 응용한다면 용해 후 체외에서 정자의 장시간에 걸쳐 운동성을 가짐으로써 정자와 난자가 만날 수 있는 가능성, 즉 수정 가능성을 동시에 높일 수 있을 것으로 판단된다.

적 요

본 연구는 개 동결정액제조 시 Tris-buffer에 RJ의 첨가 여부가 용해 후 동결정자의 생존성과 장시간 생존성에 어떠한 영향을 미치는가를 조사하기 위하여 실시하였다. 정액채취는 2마리의 Japanese Spitzs (2~4세)를 이용하여 수압법에 의해 실시하였으며, 3분획 중에 2차 분획의 정자를 채취하였다. 사출정액은 400×g로 5분동안 원심분리 후 2 ml Tris-buffer로 희석하였다. 희석액은 20% egg yolk를 Tris-buffer에 첨가한 Ext. I, Ext. I에 8% glycerol (최종농도 4%)과 2% Equex STM paste (최종농도 1%)를 첨가한 Ext. II 및 Ext. II-RJ를 제조하여 이용하였다. 희석된 정액은 냉장실에서 5°C까지 2시간에 걸쳐 냉각시켰으며 또한 5°C까지 냉각된 Ext. II 및 Ext. II-RJ를 1시간에 걸쳐 천천히 첨가하여 glycerol 평형을 유도하였다. 동결을 위한 정자의 최종농도는 약 50×10⁶ cells/ml로 조정하였다. 평형 후 정액은 0.5 ml straw에 주입하여 Styrofoam box에 LN₂ gas에 의해 예비동결 후 액체질소에 침적하여 동결을 완료하였다. 동결정액

의 용해는 38 °C에서 1분간 또는 70°C에서 정확하게 6초간 각각 실시하였다. 용해 후 모든 정액은 각 실험에서 운동성과 장시간 생존성을 평가하였다. 1% Ext. II - RJ의 용해직후 생존성 (67.5±9.6)은 Ext. II, 0.01 % 및 0.1% Ext. II-RJ (77.5±12.5, 78.7±8.2 및 80.0±6.3)보다 유의적으로 낮았으나, 용해 후 1시간 후에는 0.1% Ext. II-RJ (69.5±8.1)가 Ext. II, 0.01 및 1% Ext. II-RJ (55.0±12.9, 57.5±9.6 및 47.5±12.6)보다 유의적으로 높았다(P<0.05). 비록 38°C와 70°C에서 용해직후 생존성에는 차이가 없었지만, 용해 후 1시간째의 정자의 생존성은 38°C (48.8±16.3)에서 보다 70°C (68.8±12.5)에서 유의적으로 높았다. 또한 비록 용해 직후에는 0.1% Ext. II-RJ (80.0±14.1)와 Ext. II (72.5±9.6) 간에는 유의적 차이가 없었지만, 용해 후 장시간 생존성은 0.1% Ext. II-RJ (1 h: 65.0±12.9; 2 h: 52.5±12.6; 3 h: 40.0±14.1)가 Ext. II (1 h: 42.5±12.6; 2 h: 27.5±17.1; 3 h: 20.0±12.1)보다 유의적으로 높았다 (P<0.05).

본 연구결과는 Tris-buffer에 0.1% RJ첨가한 동결정액 희석액(0.1% Ext. II-RJ)은 개 동결정액의 용해 후 생존성과 장시간 생존성에 효과적이며, 또한 이러한 희석액을 이용한 동결정액 제조로 인공 수정에 이용한다면 정자와 난자의 수정율을 향상시킬 수 있을 것으로 판단된다.

참고문헌

- Amann R. 1989. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J. Androl.*, 10:89-98.
- Anderson K. 1972. Fertility of frozen dog semen. *Acta. Vet. Scand.*, 13:128-130.
- Anderson K. 1975. Insemination with frozen semen based on a new insemination technique. *Zuchthyg.* 10:1-4.
- Arriola J and Foote RH. 1987. Glycerolation and thawing effects on bull spermatozoa frozen in detergent-treated egg yolk and whole egg extenders. *J. Dairy Sci.*, 70:1664-1670.
- Burkle K, Burich K and Hahn J. 1987. Preliminary results of cryopreservation of mouse embryos with glycerin and royal jelly. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, 94:548-550.
- Dobrinski I, Lulai C, Barth AD and Post K. 1993. Effects of four different extenders and three different freezing rates on post thaw viability of dog semen. *J. Reprod. Fertil.*, 47(Suppl.):291-296.
- England GCW. 1992. The cryopreservation of dog semen. Thesis. The Royal Veterinary College, University of London.
- Farstad W and Anderson BK. 1989. Factors influencing in success rate of artificial insemination with frozen semen in the dog. *J. Reprod. Fertil.*, 39(Suppl.):289-292.
- Farstad W. 1984. Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with fresh or frozen semen. *J. Small Anim. Pract.*, 25:561-565.
- Ferguson JM, Renton JP, Farstad W and Douglas TA. 1989. Insemination of beagle bitches with frozen semen. *J. Reprod. Fertil.*, 39(Suppl.):293-298.
- Fontbonne A and Badinand F. 1993. Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of intravaginal and intrauterine of semen. *J. Reprod. Fertil.*, 47(Suppl.):325-327.
- Foote RH. 1964a. Extenders for freezing dog semen. *Am. J. Vet. Res.*, 25:37-39.
- Foote RH. 1964b. The effects of electrolytes, sugars, glycerol, and catalase on survival of dog sperm stored in buffered-yolk mediums. *Am. J. Vet. Res.*, 25:32-36.
- Fougner JA. 1989. Artificial insemination in fox breeding. *J. Reprod. Fertil.*, 39(Suppl.):317-323.
- Hammerstedt RH, Graham JK and Nolan JP. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J. Androl.*, 11:73-88.
- Hay MA, King WA, Gartley CJ, Leibo SP and Goodrowe KL. 1997. Canine spermatozoa-cryopreservation and evaluation of gamete interac-

- tion. *Theriogenology*, 48:1329-1342.
- Hofmo PO. 1988. Studies on cryopreservation of fox spermatozoa and evaluation of the fertilizing capacity of frozen-thawed silver fox spermatozoa. Ph. D. Thesis. Norwegian College of Veterinary Medicine, Oslo, pp. 77.
- Ivanova-Kicheva MG, Subev MS, Bobadov ND, Dacheva DP and Rouseva LA. 1995. Effect of thawing regimens on the morphofunctional state of canine spermatozoa. *Theriogenology*, 44:563-569.
- Linde-Forsberg C and Forsberg M. 1989. Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *J. Reprod. Fertil.*, 39(Suppl.):299-310.
- Mazur P. 1984. Freezing of living cells: Mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.*, 247:125-142.
- Martin JC, Klug E and Gunzel A-R. 1979. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *J. Reprod. Fertil.*, 27(Suppl.);47-51.
- Morton DB and Bruce SG. 1989. Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. *J. Reprod. Fertil.*, 39(Suppl.):311-316.
- Nothling JO, Gerstenberg C and Volkmann DH. 1995. Success with intravaginal insemination of frozen-thawed dog semen - A retrospective study. *J. S. Afr. Vet. Ass.*, 66:49-55.
- Oettle EE. 1982. Preliminary report: A pregnancy from frozen centrifuged dog semen. *J. S. Afr. Vet. Ass.*, 53:269-270.
- Oettle EE. 1986. Changes acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 12:145-150.
- Penfold LM and Moore HDM. 1993. A new method for cryopreservation of mouse spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 99:131-134.
- Province CA, Amann RP, Pickett BW and Squires EL. 1984. Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5°C. *Theriogenology*, 22:409-415.
- Pursel VG, Schulman LL and Johnson LA. 1978. Effect of Orvus ES Paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar sperm. *J. Anim. Sci.*, 47:198-202.
- Rota A, Strom B, Linde-Forsberg C and Rodriguez-Martinez H. 1997. Effects of equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during *in vitro* incubation at 38°C. *Theriogenology*, 47:1093-1101.
- Silva LDM and Versteegen JP. 1995. Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*, 44:571-579.
- Strom B, Rota A and Linde-Forsberg C. 1997. *In vitro* characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology*, 48:247-256.
- Thomas PGA, Surman V, Myers-Wallen VN and Concannon PW. 1992. Addition of sodium dodecyl sulphate to tris-citrate extender improves motility and longevity of frozen-thawed canine spermatozoa. 12th Int. Cong. Anim. Reprod. AI. Pp. 4:1823-1825.
- Visintin JA, Burkle K, Burich K and Hahn J. 1988. Comparative studies of the cryopreservation of mouse embryos with glycerin supplemented with sucrose or royal jelly. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, 95:398-401.
- Wildt DE, Phillips LG, Simmons LG, Chakraborty PK, Brown JL, Howard JG, Teare A and Bush M. 1988. A comparative analysis of ejaculate and hormonal characteristics of the captive male cheetah, tiger, leopard and puma. *Biol. Reprod.*, 38:245-255.
- Yubi AC, Ferguson JM, Renton JP, Harker S, Harvey MJA, Bagyenji B and Douglas TA. 1987. Some observations on the dilution, cool-

ing and freezing of canine semen. J. Small Anim. Pract., 28:753-761.

김용준, 박영재, 김병진, 유일정. 1994. Methanol을 이용한 개 정액동결 시 용해 후 양호한 활력

및 생존율을 나타내는 정액처리 조건. 한국임상수의학회지. 11(2):207-214.

(접수일: 2001. 2. 6 / 채택일: 2001. 2. 25)