

## 개에서 발정유도가 인공수정효율에 미치는 영향

이영락 · 강태영<sup>1</sup> · 최상용<sup>†</sup>  
경상대학교 수의과대학

### **Influences of Rate of Artificial Insemination Following Estrus Induction in Dog**

**Y. R. Lee, T. Y. Kang<sup>1</sup> and S. Y. Choe<sup>†</sup>**

*College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University*

#### **SUMMARY**

Considerable attention has been focused on the cryopreservation of semen and estrus induction in dog, as consequence of poor productivity caused by long anestrus period, in order to enhance the productivity of youngs and to preserve the breeds. The objectives of this study were to improve reproductive efficiency of artificial insemination with fresh- and frozen-semen following estrus induction in dog.

Fifty infertile dogs (age 2~3 years) were selected for the study and divided into three different estrus induction treatment groups. Group 1: dogs (n=15) were given clomifene (0.1 mg/kg) orally for five days at 12 hr intervals. Group 2: dogs (n=15) were given bromocriptine (50 µg/kg) orally for five days at 12 hr intervals, followed by single injection intravenously of 500 IU GnRH (Group 3, n=20) when pro-estrus occurred. After being treated, the dogs were evaluated for the rates of estrus induction and time interval lapses from treatment to beginning of the pro-estrus. The rates of pregnancy in estrus induced dogs mated naturally compared to those inseminated artificially with ejaculated fresh semen and frozen-thawed semen. Estrus detection was performed using the method of vaginal smear and confirmed by the plasma progesterone assay. Pregnancy was confirmed by ultrasonography on day 25, 35 and 55 post insemination. The ejaculated semen was exposed to a mixture of Tris extender with cryoprotectant (Trisma, 81 mM; TES, 209 mM; citric acid, 6 mM; glucose, 5 mM; glycerol, 8%) and cryopreserved gradually by slow-cooling at 17 cm above the surface of liquid nitrogen (LN<sub>2</sub>) for 23 min.

The use of fresh semen, the pregnancy rates were observed 66.6, 66.6, 75.0 and 83.3% in natural estrus, clomifene induced, bromocriptine induced and a combination of GnRH and bromocriptine, respectively. The use of frozen-thawed semen, the pregnancy rates were observed 66.6, 33.3, 50.0 and 60.0% in natural estrus, clomifene induced, bromocriptine induced and a combination of GnRH and bromocriptine, respectively. No difference was observed in the number of offspring produced among natural estrus and treated groups inseminated with fresh

---

<sup>1</sup> Department of Veterinary Medicine, Cheju National University.

<sup>†</sup> Correspondence : E-mail: sychoe@nongae.gsnu.ac.kr

or frozen-thawed semen.

In conclusion, there was no significant differences in the pregnancy rate of dogs between group treated with a combination of GnRH and bromocriptine and group treated clomifene or bromocriptine only. However, frozen-thawed semen can be used successfully for artificial insemination in dog.

(Key words : artificial insemination, bromocriptine, dog, estrus induction, GnRH)

## 서 론

최근에 사용되고 있는 인공수정 방법들은 vaginal deposition, transcervical intrauterine deposition, surgical intrauterine deposition, 내시경(laparoscopy)을 이용한 자궁내수정(intrauterine insemination) 등이 있다. Fontbonne 등(1993)과 Willson 등(1993)은 인공수정시 정액의 자궁내 주입이 질내 주입보다 수태율이 높다고 보고하였고, Anderson 등(1975)은 정액을 질내에 주입하였을 경우, 수태율이 10~20%로서 자궁내 주입에 비해 수태율이 낮다고 보고하였고, Nothling 등(1995)은 개의 동결정액을 이용한 질내수정을 이용하여 산자를 생산하였다고 보고하였다. 인공수정시 질내수정(vaginal insemination)을 위해서는 45×0.5 cm 크기의 플라스틱 catheter를 사용하며, 자궁내수정(Intracervical intrauterine insemination)을 위해서는 20~50 cm 크기의 금속성 catheter를 사용하기도 하고, Linde-Forsberg(1991)는 Norwegian catheter를 이용하여 인공수정에 사용하였으며, 공 등(1999)은 자궁경관 입구와 질 내부 관찰과 축진이 가능한 인공수정기를 이용하여 인공수정을 실시하여 높은 수태율을 보였다고 보고하였다. 한편 정액의 자궁내 주입 방법은 수태율을 향상시킨다는 이점 때문에 질내 주입보다는 많이 이용되고 있다고 보고하였다(Mialot 등, 1985). 자궁내 주입방법은 외과적인 시술에 의한 주입방법과 비외과적 방법이 있으며 Silva 등(1995, 1996)은 외과적인 방법으로 복강경을 이용한 정액주입법을 최초로 보고하였다.

애완견 보급의 증가로 우수 종견의 유전적 형질과 멸종위기의 품종의 보존을 위하여 동결정액을 이용한 인공수정이 요구되고 있는 실정이다. 아직까지는 개에서 동결정액을 이용한 인공수정이 산

자 생산효율이 높지는 않으나 *Brucella canis*와 같은 전염성 질병의 예방 및 우수 종견의 정액을 장기간 보존할 수 있는 장점으로 인하여 그 효용가치는 높다고 사료된다.

Spallanzani(1976)에 의해 최초로 개의 정액 동결보존을 시사하였고, 그 후 많은 연구자들이 정자의 생존성 향상을 위한 희석액 종류, 희석농도, 동결보호제, 동결보관, 융해온도 등에 관하여 연구가 계속되었다(정 등, 2001; Strom 등, 1988; Mazur와 Cole, 1985; Milovanov, 1951). 최근에는 온도에 대한 정자의 손상을 최소화하기 위해 prostatic fluid (Sirivaidyapong 등, 2001)와 royal jelly(공과 조, 2001)를 동결시 첨가하여 동결융해 후 정자의 생존성에 미치는 효과에 대한 보고가 있었다.

동결정액을 이용하여 인공수정을 하기 위해서는 자연 발정상태에 있는 암컷을 사용할 수도 있으나 보다 많은 번식기회를 갖기 위해서는 특히나 개의 번식생리 특성상 긴 무발정기를 갖고 있는 암컷을 발정을 유도시켜야 하는 필요성도 요구된다. 무발정기의 발정유도 방법으로는 FSH 또는 PMSG의 병용 투여(Bouchard, 1990; Olson 등, 1984), GnRH 투여방법(Cain 등, 1989; Cain 등, 1988), anti-prolactin 제제 투여 방법 등(Kooistra 등, 1999)이 있다.

본 실험에서는 estrogen 제제인 clomifener과 anti-prolactin 제제인 bromocriptine, 그리고 GnRH를 병용 투여하여 발정유도에 따른 신선정액과 동결정액을 사용하여 인공수정을 실시한 후 수태율과 산자 생산율을 조사하고자 본 실험을 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시동물 및 발정유도

공시동물은 2~3세의 3~8 kg의 소형 애완견으로 사육환경은 쾌적한 환경의 독립 케이지에서 애견용 사료 Purina® (Purina, USA)를 자유 급식하도록 하였다. 발정의 유도는 공시견을 임의로 3개군으로 clomifene 투여군과 bromocriptine 투여군, GnRH + bromocriptine/GnRH 혼합 투여군 그리고 자연발정군으로 나누었다. 각 실험군의 호르몬 처리는 clomifene (Merrel Dow Ltd, USA)을 0.1 mg/kg 1일 2회 12시간 간격으로 5일간 경구 투여하였고, bromocriptine (Novartis Pharmaceuticals, Parlo-del Tab)을 50 µg/kg을 1일 2회 12시간 간격으로 5일간 경구 투여하였다. Gonadotrophin (GnRH, Sigma, USA)제제는 투여 첫날은 두 당 500 IU씩 정맥주사 후 bromocriptine 50 µg/kg을 하루에 2회 12시간 간격으로 5일간 경구투여한 후, 다시 발정전기에 출혈이 시작되는 첫날 500 IU를 추가하여 정맥주사하였다.

## 2. 정액 채취

정액 채취는 수개의 생식기 주위의 이물을 깨끗이 제거하여 청결한 상태에서 정액을 채취하였다. 음경 맛사지법으로 음경의 발기를 유도한 후, 구선 (bulbus glandis) 부위를 잡고 압력을 가하여 3단계로 분획하여 정액을 채취하였다. 본 실험에서는 정자의 농도가 가장 높은 2단계에서 채취한 정액을 실험에 사용하였다.

## 3. 정액 동결 및 융해

정액의 동결은 먼저 채취한 정액을 37°C의 Tris-egg yolk buffer를 이용하여 정자 농도는  $1.6 \times 10^8/\text{ml}$ 가 되게 희석해서 1시간 58분 동안 4°C에서 저온 평형을 실시하고 Tris-egg yolk-glycerol buffer를 동량으로 첨가하여 정자의 최종 농도가  $8 \times 10^7/\text{ml}$ 가 되도록 희석한다. 희석된 정액은 0.5 ml straw에 장착하고 밀봉하여 액체질소 표면 위 17 cm 에서 각각 13분 50초동안 평형을 시키고, 시간이 되면 액체질소 안으로 넣어 동결을 완료하였다.

동결정액의 융해는 각각 37°C로 가온된 항온수조에서 2분 동안 흔들어서 융해하였다.

## 4. 교배적기 검사

발정유도를 실시한 실험견의 교배적기는 질점막상피세포 도말검사, Ovcheck® (Camelot Farms, USA)와 방사선 면역 측정법(Radioimmunoassay; RIA)을 이용하여 검사하였다.

## 5. 자연교배 및 인공수정

발정을 유도한 실험견의 교배적기 검사에서 교배적기가 확인된 암캐만을 실험에 공시하였다.

### 1) 자연 교배

교배적기의 실험견을 건강한 수캐와 자연교배시키기 위하여 주위환경이 쾌적하고 안정된 상태에서 교배할 수 있는 환경을 조성하여 자연교배를 유도하였다.

### 2) 신선정액에 의한 인공수정

인공수정을 하기 전에 실험견을 안전하게 보정하고 외부 생식기 주위를 베타딘 소독액으로 세척하고, 멸균거즈로 닦아낸 후 깨끗한 수캐에서 마사지법으로 채취한 신선한 정액을 정자수 계산관을 이용하여 정자수를 계산하고 한번에 수정시키는 정자의 수가 5,000만 이상이 되도록 신선정액을 buffer와 희석한 후, 정액 주입피펫을 양쪽 음순 사이로 밀어넣고 약간 수직방향으로 하여 질전정의 요도외구 부위를 통과시킨 후 수평을 유지하면서 피펫을 집어넣다가 피펫의 앞끝이 자궁경관의 심부에 도달되면 피펫 뒤끝에 주사기를 연결시켜서 희석된 신선정액을 2 ml 주입한다. 주입된 정액의 역류를 방지하기 위하여 주입 후 후구를 수분간 높여 주고, 주입시에 1~2개의 손가락을 질내에 넣고 자극을 줌으로써 질의 수축을 촉진시켜 정자가 빠르게 올라갈 수 있도록 하였다.

### 3) 동결 융해정액에 의한 인공수정

동결정액을 이용한 인공수정 시에는 인공수정 준비가 완료된 상태에서 주입 직전에 37°C로 가온된 항온수조에서 2분 동안 흔들어서 융해하였으며, 동결 정액의 인공수정은 신선정액을 이용한 인공수정 방법과 같은 방법으로 실시하였다.

## 6. 초음파 임신진단

자연 교배와 인공수정을 실시한 실험견의 임신 진단은 수정 후 25일, 35일, 55일에 양와 자세로 보정한 후, acoustic gel을 복부에 바르고 탐촉자를 피부에 밀착시켜 상복부와 하복부 사이를 이동하면서 초음파검사를 실시하여 임신 여부를 확인하였다. 초음파검사에는 6.5 MHz 탐촉자가 장착된 Sonoace 3200 V (Medison Co., LTD. Korea)를 사용하였다.

### 7. 통계학적 분석

각 실험값의 백분율은 arcsine을 이용하여 전환한 후 통계 프로그램인 Analysis of Variance (ANOVA)로 분석하였으며, P<0.05일 때 유의적 차이를 인정하였다.

## 결 과

### 1. 발정유도 방법에 따른 자연교배 후 임신율과 산자수

호르몬 투여에 의한 발정유도군과 자연발정군의 자연교배시 progesterone 농도, 임신율 및 산자수를 조사한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다.

자연교배시 임신율은 자연발정군은 83.3%, clomifene 투여군은 66.6%, bromocriptine 단독 투여군은 66.6%, GnRH + bromocriptine/GnRH 혼합 투여군은 80.0%로서 혼합 투여군은 자연발정군의 임신율과 비슷하였으며 다른 각 군과의 유의적 (P<0.05)인 차이는 없었으며, 평균산자수에 있어서도 각각 자연발정군은 4.5±1.38두, clomifene 투여군은 4.0±1.48두, bromocriptine 투여군은 4.5±0.71두, 그리고 혼합 투여군은 5.0±1.22두를 분만하여 각 투여군간의 분만 두수는 비슷하였으며 투여군간의 유의적(P<0.05)인 차이를 나타내지 않았다.

### 2. 발정유도 방법에 따른 신선정액을 이용한 인공수정 후 임신율과 산자수

호르몬 투여에 의한 발정유도군과 자연발정군의 신선정액을 이용한 인공수정시 progesterone 농도, 임신율 및 산자수를 조사한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다.

발정유도 방법에 따른 신선정액 인공수정시 임신율은 자연발정군에서는 66.6%, clomifene 투여군에서도 66.6%, bromocriptine 단독 투여군에서는

Table 1. Pregnancy rates and the number of offspring by different estrus induction in dog

Treated groups	No. of dog	P4 Conc. Mean (±SEM) ng/ml	Pregnancy (%)	Litter size (±SEM)
Natural heat	6	7.3±1.9	5 (83.3)	4.5±1.38
Clomifene	3	6.8±1.2	2 (66.6)	4.0±1.48
Bromocriptine	3	7.1±0.9	2 (66.6)	4.5±0.71
GnRH +Bromocriptine	5	6.3±1.5	4 (80.0)	5.0±1.22

There were not significantly different (P<0.05).

Table 2. Pregnancy rates and the number of offspring in dog inseminated with fresh semen following different estrus induction treatments

Treated groups	No. of dog	P4 Conc. Mean (±SEM)	Pregnancy (%)	Litter size (±SEM)
Natural heat	3	7.3±1.9	2 (66.6)	3.5±0.71
Clomifene	3	7.3±1.0	2 (66.6)	4.5±0.71
Bromocriptine	4	7.1±0.8	3 (75.0)	4.0±1.00
GnRH +Bromocriptine	6	7.4±0.5	5 (83.3)	4.2±1.09

There were not significantly different (P<0.05).

75%로 나타났으며, GnRH + bromocriptine/GnRH 혼합 투여군에서는 83.3%로 다른 실험군보다 높았으나 유의적(P<0.05)인 차이는 나타나지 않았다.

또한 발정유도 방법에 따른 평균 산자수도 각각 자연교배는 3.5±0.71두, clomifene은 4.5±0.71두, bromocriptine은 4.0±1.00두 그리고 혼합 투여군은 4.2±1.09두로서 투여군간의 유의적(P<0.05)인 차이는 나타나지 않았다.

### 3. 발정유도 방법에 따른 동결 정액을 이용한 인공수정 후 임신율과 산자수

호르몬 투여에 의한 발정유도군과 자연발정군의 동결정액을 이용한 인공수정시 progesterone 농도, 임신율, 산자수를 조사한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다.

다양한 발정유도 방법에 따른 동결정액을 이용한 인공수정시 임신율은 자연발정군에서는 66.7%, clomifene 투여군에서는 33.4%, bromocriptine 단독 투여군에서는 50%로 나타났으며, GnRH + bromocriptine/GnRH 혼합 투여군에서는 60%로 유의적(P<0.05)인 차이는 나타나지 않았으며, 평균 산자수에 있어서는 각각 4.0±0.0두, 3.0±0.0두, 3.5±0.71두 그리고 4.3±1.53두로 나타나 투여군간의 유의적(P<0.05)인 차이는 나타나지 않았다.

### 4. 초음파 임신진단

발정유도를 위해 GnRH + bromocriptine/GnRH 혼합 투여하고 동결 용해한 정액을 인공수정한 실험견의 임신 35일된 초음파 사진이 Fig. 1으로 화살표 부분이 태아를 표시하고 있다.

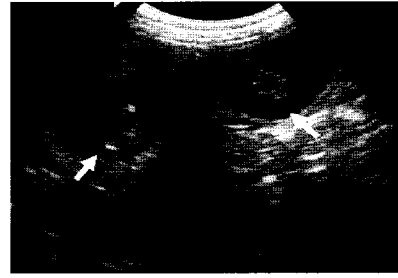
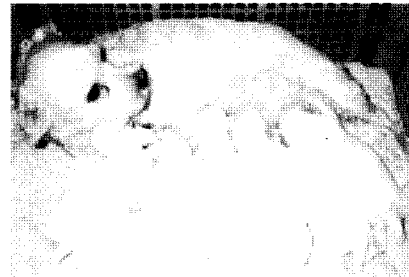


Fig. 1. Ultrasonogram in pregnant dog. 6.5 MHz convex transducer, Gestational age; 35 day.



(A)



(B)

Fig. 2. Offspring after following induction using bromocriptine, artificial insemination using fresh semen (A) and frozen semen (B).

Table 3. Pregnancy rates and the number of offspring in dog inseminated with frozen-thawed semen following different estrus induction treatments

Treated groups	No. of dog	P4 Conc. Mean (±SEM)	Pregnancy (%)	Litter size (±SEM)
Natural heat	3	7.3±1.9	2 (66.7)	4.0±0.00
Clomifene	3	7.3±1.2	1 (34.4)	3.0±0.00
Bromocriptine	4	7.1±1.9	2 (50.0)	3.5±0.71
GnRH + Bromocriptine	5	7.0±1.0	3 (60.0)	4.3±1.53

There were not significantly different (P< 0.05).

## 5. 발정유도된 암캐의 인공수정에 의한 산자

Fig. 2는 발정유도된 암캐에 신선정액과 동결정액을 이용한 인공수정 후 태어난 산자들로 (A)는 신선정액을 이용한 인공수정에 의해 태어난 산자들과, (B)는 동결 용해한 정액을 이용한 인공수정에 의해 태어난 산자들로 모든 산자들의 건강상태는 양호하였다.

## 고 찰

암캐의 교배 시기는 LH peak 후 4일째며, progesterone 농도는 무발정기와 발정기전기 첫날에는 0.5 ng/ml이지만, 배란 전후에는 그 농도가  $5.44 \pm 0.93$  ng/ml 높아지고(Concannon 등, 1975), 일주일 이내 최고 25 ng/ml 이상까지 증가한다. 자연교배에서도 암캐의 정확한 교배적기를 확인하기가 힘들기 때문에 수태율이 다른 동물에 비해 저조한 편이다. 종 특이성 때문에 개에서는 교배적기의 정확한 검사가 수태율의 향상에 크게 영향을 미친다. 본 실험에서도 이러한 이유로 수태율을 향상하기 위해 개체마다 혈중 progesterone 농도 검사를 실시하여 교배적기를 결정하였다.

개에서 자연교배에 비해 동결정액을 이용한 인공수정에서는 Farstad 등(1984)은 80% 이상의 수태율을 보고하였고, 동결정액을 이용한 인공수정에서 수태율을 높이기 위해 Farstad 등(1989)은 교배적기에 progesterone 농도를 확인하고 한번의 인공수정시 임신율이 낮은 것은 progesterone의 농도가 낮았다고 보고하였다. Seager 등(1975)은 수태율을 높이기 위해 인공수정 횟수를 늘리고 많은 수의 정자를 주입하였다. 한편 Anderson 등(1976)과 Farstad 등(1984)은 1회당 1.5~2억개의 정자주입과 2회의 인공수정으로 비교적 좋은 수태율을 보고하였다. Wilson 등(1993, 1992)은 내시경과 catheter를 이용한 자궁내주입법 인공수정에서 1회에 5,000만마리의 정자를 주입하고 48시간 간격으로 2회 인공수정하여 83%의 높은 수태율을 보고하였다.

본 실험에서는 catheter를 이용하여 회석된 정자 5,000만 마리를 자궁내 2회 수정하였으며, 임신율

과 산자 생산율은 자연교미와 신선정액을 인공수정하였을 때 유의적( $P < 0.05$ )인 차이는 없었으나, 동결정액을 이용한 인공수정은 유의적( $P < 0.05$ )으로 낮았다. 이는 Seager 등(1975)이 개에서 동결정액을 이용한 인공수정시 산자수가 감소된다고 보고한 결과와 유사하였다. 그리고 이러한 산자수의 감소는 동결정액의 생존력과 활력저하와 연관이 있다고 Anderson 등(1976)이 보고하였다. 한편 Linde-Forsberg 등(1989)과 Wilson 등(1992)은 동결정액과 신선정액을 이용한 인공수정시 산자수의 차이는 없었다고 보고하였다.

본 실험에서 자연발정견과 무발정견에 발정유도 물질인 clomifene과 bromocriptine을 단독 투여하거나 GnRH + bromocriptine/GnRH를 혼합 투여하여 발정유도된 암캐에 신선정액과 동결정액을 이용하여 인공수정을 시켰을 때 자연교배한 것보다 임신율과 산자 생산율이 유의적( $P < 0.05$ )으로 높았다. 그러나 발정견을 자연교미에 의한 수정과 신선정액을 이용한 인공수정시 동결정액을 이용한 인공수정보다 임신율과 산자수가 유의적( $P < 0.05$ )으로 높게 나타나 결과적으로 동결정액을 인공수정하는 방법이 그 효율성은 떨어지나 정상적인 산자를 얻을 수 있는 것으로 사료되며, 앞으로 개 정액의 동결방법과 인공수정 방법에 대한 연구가 더 수행되어야 할 것으로 사료된다.

## 적 요

본 실험은 개의 인공수정에 사용할 신선정액, 그리고 동결정액을 이용한 자연교미와 발정유도된 실험견에 인공수정시 임신율과 산자수를 검증하여 그 효율성을 조사하였다.

1. 개의 인공수정시에 자연발정, clomifene, bromocriptine 단독 투여 그리고 GnRH + bromocriptine/GnRH 혼합 투여에 따른 발정유도방법은 임신율과 산자수에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났으며, 신선정액을 이용한 인공수정방법은 자연교미방법과 유사한 임신율과 산자수를 보였으나, 동결정액을 이용한 인공수정 시에는 비교적 낮게 나타났다.
2. 자연발정 유도군 또는 clomifene, bromocr-

iptine 단독 투여군, GnRH + bromocriptine/GnRH 병용 투여로 발정이 유도된 암캐를 자연교배시 생산된 총 산자수는 54두, 신선정액을 이용한 인공수정에서는 50두로 유의적 ( $P<0.05$ )인 차이가 없었고, 동결정액을 이용한 인공수정에서는 35두를 분만하여 자연교배에 비해 유의적( $P<0.05$ )으로 총 산자수가 적었다.

본 실험의 결과에서 무발정견에 호르몬을 투여하여 발정을 유도시켜 수정을 해도 수태율과 산자수는 영향을 미치지 않으며, 신선정액에 의한 인공수정과 자연교배 시의 수태율과 산자수에는 차이가 없으나, 동결정액에 의한 인공수정 시에는 수태율과 산자수가 낮아짐을 알 수 있었다.

### 참고문헌

- Anderson K. 1975. Insemination with frozen semen based a new insemination technique. *Zuchthygiene*, 10:1-4.
- Bouchard P. 1990. GnRH antagonists. Therapeutic and practical aspects. *J. Gynecol. Obstruct. Biol. Reprod.*, 19:607-608.
- Cain JL, Cain GR, Feldman EC, Lasley BL and Stabenfeldt GH. 1988. Use of pulsatile intravenous administration of gonadotropin-releasing hormone to induce fertile estrus in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 49:1993-1996.
- Cain JL, Lasley BL, Cain GR, Feldman EC and Stabenfeldt GH. 1989. Induction of ovulation in dogs with pulsatile or continuous infusion of GnRH. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 39:143-147.
- Concannon PW, Hansel W and Visek WJ. 1975. The ovarian cycle of the bitch: Plasma estrogen, LH and progesterone. *Biol. Reprod.*, 13:112-121.
- Farstad W. 1984. Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with fresh or frozen semen. *J. Small Animal Pract.*, 25: 561-565.
- Farstad W and Berg KA. 1989. Factors influencing the success rate of artificial insemination with frozen semen in the dog. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 39:289-292.
- Fontbonne A and Badinand F. 1993. Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of intrauterine and deposition of semen. *J. Reprod. Fert.*, 47:325-327.
- Kooistra HS, Okkens AC, Bevers MM, Popp-Snijders C, van Haften B, Dieleman SJ and Schoemaker J. 1999. Bromocriptine-induced premature oestrus is associated with changes in the pulsatile secretion pattern of follicle-stimulating hormone in beagle bitches. *J. Reprod. Fert.*, 117:387-393.
- 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. Fert. Suppl.*, 39: 299-310.
- Linde-Forsberg C. 1991. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Vet. Clin. No. Am. Sm. Anim. Prac.*, 21:467-485.
- Mazur P and Cole KW. 1985. Influence of cell concentration on the contribution of unfrozen fraction and salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes. *Cryobiology*, 22:509-536.
- Mialot JP, Dumon C and Casson B. 1985. Artificial insemination in bitches: Introduction of fresh semen with the Osiris flexible gun. *Pratique Medicale et Chirurgicale de l'animal de Compagnie*, 20:213.
- Milovanov VK. 1951. Methods of storage of semen of ruminants. In 'News in the Biology of Reproduction of Farm Animals'. 13:9-65.
- Nothling JO, Gerstenberg C and Volkmann DH. 1995. Success with intravaginal insemination of frozen-thawed dog semen--a retrospective study. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, 66:49-55.

- Olson PN, Bowen RA, Behrendt MD, Olson JD and Nett TM. 1984. Concentrations of testosterone in canine serum during late anestrus, proestrus, estrus, and early diestrus. *Am. J. Vet. Res.*, 45:145-148.
- Seager SW, Platts CC and Fletcher WS. 1975. Conception rates and related data using frozen dog semen. *J. Reprod. Fertil.*, 45:189-192.
- Silva LDM, Onclin K, Snaps F and Verstegen J. 1995. Laparoscopic intrauterine insemination in the bitch. *Theriogenology*, 43:615-623.
- Silva LD, Onclin K, Lejeune B and Verstegen JP. 1996. Comparisons of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. *Vet. Rec.*, 138:154-7.
- Sirivaidyapong S, Ursem P, Bevers MM, Colenbrander B. 2001. Effect of prostatic fluid on motility, viability and acrosome integrity of chilled and frozen-thawed dog spermatozoa. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 57:383-386.
- Spallanzani L. 1776. *Opuscoli di fiscal animale e vegetabile. Opuscolo II. Obsercazioni e sperienze intorno ai vermicelli spermaici dell' homo e degli animal.* Modena(cited by Watson, 1979).
- Strom Holst B, Rota A, Andersen Berg K, Lindforsberg C and Rodrigues-Martinez H. 1998. Canine sperm head damage after freezing-thawing: Ultrastructural evaluation and content of selected elements. *Reprod. Dom. Anim.*, 33:77-82.
- Wilson MS. 1992. Artificial insemination in the bitch using frozen semen. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 46:32-56.
- Wilson MS. 1993. Non-surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 47:307-311.
- 공일근, 조성균. 2001. Royal Jelly 첨가가 동결융해 후 개 정자의 활력도 및 생존성에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지*, 16:53-60.
- 공일근, 조성균, 임용택, 이상인, 위성하. 1999. 개 자궁내 인공수정기에 의한 인공수정 후 산자 생산. *한국임상수의학회지*, 16:375-380.
- 정정란, 유재규, 양성열, 여현진, 박종식, 예은하, 노규진, 최상용. 2001. 개 정자의 보존방법에 따른 침체 및 생존성의 변화 II. 동결보존에 따른 효과. *한국수정란이식학회지*, 16:133-138.

---

(접수일 : 2003. 3. 11/ 채택일 : 2003. 4. 15)