

개 정자의 동결보존에 있어서 Glycerol 농도, 동결 및 융해 속도가 정자의 생존율 및 운동성에 미치는 영향

이제협 · 박 향 · 박흠대 · 김재명^{1,†}
대구대학교 식품·생명·화학공학부

Influence of Glycerol Concentration, Freezing Rate and Thawing Rate on Survival of Canine Spermatozoa Frozen

J. H. Lee, H. Park, H. D. Park and J. M. Kim^{1,†}

Division of Food, Biological and Chemical Engineering, Daegu University

SUMMARY

This study was carried out to establish most suitable freezing condition, to evaluate the different condition of freezing and thawing rates on the viability and motility of frozen canine spermatozoa. The ejaculated semen was added to obtained 200~400 × 10⁶/ml with extender I and was cooled to 4°C over 30, 60 and 120 minutes. And then, semen was diluted with extender II containing 4, 6 and 8%(v/v) glycerol for 60 min, respectively and packaged in 0.5ml straw, equilibrated for 30, 60 and 120 min at 4°C and cryopreserved in liquid nitrogen vapor at different distance(3, 5, 7 and 9 cm, respectively), plunged into nitrogen tank. Samples were thawed by placing straws into 27, 37, 47, 57°C water bath for 120, 20 and 12 sec, respectively.

The results were as follows;

1. The survival and motility rate immediately post-thawing was significantly higher in samples frozen in 4% glycerol than 6 or 8% glycerol(P<0.05).
2. According to equilibration time at 4°C, the survival and motility rate immediately post-thawing was significantly higher in samples frozen after 60 min equilibration than 30 or 120 min equilibration(P<0.05).
3. Freezing in distance of 5 cm from liquid nitrogen yield better survival and motility rate than the others(3, 7 or 9 cm)(P<0.05).
4. The effect of thawing rate on sperm survival were higher when the thawing was done at 37°C for 120 sec(P<0.05).

(Key words : dog, sperm, freezing, thawing, motility, survival)

서 론

국민소득의 증가와 더불어 애완동물 애호가
점점 증가함에 따라 애완동물 수입의 증가가 현저

하게 증가하여 8월말까지 26,000마리의 애완견이
수입되었다. 이들 중 종건의 수입이 증가추세에 있
는바 현존하는 우수한 종건으로부터 정액을 채취
하여 동결보존 후 상업적으로 이용할 수 있다면

¹ 포천중문의과대학교 생리학교실(College of Medicine, Pochon CHA University)

[†] Correspondence : E-mail : dangi2359@hanmail.net

중견수입두수가 현저하게 줄 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 개 정액의 동결보존 후 정액의 보관, 용해 후 낮은 생존율 및 인공수정 시술의 어려움과 인공수정 후 낮은 수태율 등의 문제가 제기됨에 따라 기피되어 타 축종에 비하여 동결보존에 관한 연구가 미미한 실정이다. 그러나 개 정자의 동결보존의 기술이 확립되면 우수 종모건의 활용도를 극대화할 수 있고 오랜 기간 저장할 수 있으며 장소에 구애받지 않고 여러 지역에서 이용 가능하기 때문에 선진 외국에서는 체계적인 연구가 실시되어 실용화 되었다.

개 정액의 동결보존은 1969년 Seager에 의해 처음 시도된 후 여러 연구자들(Gill 등, 1960; Rota 등, 1996; Ivanova-Kicheva 등, 1997; Szasz 등, 2000; 이 등, 2003; 유와 공, 2003)에 의해서 실시되어 왔다. 개 정자의 동결보존 시 희석액에 이용되는 buffer의 종류(Abdelhakeam 등, 1991), 동결보호제의 농도, 동결속도(Dobrinski 등, 1993), 동결보존 방법(Smith, 1994; Battista 등, 1988), 용해속도(정 등, 2001), 용해 시 물의 온도 등(Olar 등, 1984) 많은 요인에 의해 정자의 생존성 및 운동성에 영향을 받는 것으로 알려져 있다.

이에 본 실험은 개 정액의 동결보존에 이용되는 동결보호제인 glycerol의 농도, 상온에서 -4℃까지의 냉각속도, 동결보호제의 첨가 후 평형시간, 동결 시 액체질소 표면으로부터의 거리, 용해시의 용해온도 등에 따른 정자의 생존율 및 운동성을 조사하여 체계적인 동결보존법의 확립과 이의 상업적 이용을 목적으로 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물

본 실험에 공시된 개는 18~24개월령인 룯트와일러, 텐, 셰퍼드, 샵살개, 시베리안 허스키 등 5마리의 중대형 애완견을 이용하였다. 이들의 체중은 25~56Kg이었고, 각각의 개체는 충분히 운동할 수 있는 사육장내에서 단독 사육하며 하루에 2회의 사료급여와 무제한 자유급수를 실시하였다.

2. 정액채취

중견의 정액 채취는 주 1회씩 수압법을 이용하여 정액을 채취하였다. 채취하기 전 생식기 주위의 이물질 제거 후 음경을 마사지하여 발기를 유도시킨 후, 구선 부위를 잡고 압력을 가하여 정액을 채취하였다. 이때 1차 정액은 버리고 2차 3차 fraction만을 선별하여 채취하였다. 채취된 정액은 외부의 영향을 피하기 위해 가능한 한 빠른 시간 내에 실험실로 이동하여 일반적인 정액검사를 실시하였다.

3. 정액검사

채취된 개체의 정액검사를 실시하기 위해 일정 시간 실온에 방치하여 정자의 액화를 유도한 후 일정량의 희석액을 사용하여 희석시킨 후 Markler Chamber를 이용하여 정자의 수 및 운동성 등 일상적인 정액검사를 조사하였다.

4. 정액의 동결 및 용해

정액의 동결은 modified-TYB를 정액의 동결 보호제로 사용하였다(Table 1). 채취된 정액은 일반적인 정액 검사를 실시하여 동결정액 제조 가능의 여부를 판단한 후 동결이 가능한 정액은 실온에서 Ext I 용액으로 일정량 희석한 후에 각각 30분, 1 또는 2시간의 간격으로 4℃까지 냉각시킨 후에 4℃에 보관된 동량의 Ext II 용액을 각각 30분, 1시간 또는 2시간에 걸쳐 희석 및 평형을 유도하였다. 평형이 된 정자는 ml당 $20 \sim 40 \times 10^6$ 으로 숫자를 조정된 후에 0.5 ml의 straw에 충전 봉합하여 액체질소의 표면에서 각각 3, 5, 7, 9 cm 높이에 straw를 노출시켜 예비 동결을 실시한 후에 액체질소에 침지하여 동결을 완료하였다. 동결된 정액은 일정 시간동안 LN₂ tank에서 보관한 후에 필요시 용해하여 사용하였다. 동결정액의 용해는 각각 27℃에서 2분, 37℃에서 2분, 47℃에서 20초 또는 57℃에서 10초 동안 노출시켜 용해를 완료한 후 일정량의 동결정액을 이용하여 정액검사를 실시하였다.

5. 통계처리

본 연구에 의해 얻어진 실험결과와 통계처리는 Student's T-test를 이용하여 분석하였으며 P<0.05 일 때 유의적 차이를 인정하였다.

Table 1. Modified-test yolk buffer

Solution	Extender 1	Extender 2
TES	2.0g	2.0g
Xylose	0.9g	0.9g
Citric acid	1.0g	1.0g
Gentamycin	100 μ l (0.1%)	100 μ l (0.1%)
Egg yolk	20ml(20%)	20ml(20%)
Glycerol		8ml
D.W	to 100ml	to 100ml
pH	6.6	6.6

결과 및 고찰

1. 일반적인 정액 성상

공시된 중 대형견으로부터 채취된 정액을 본 실험에 이용할 수 있는가를 조사하기 위하여 각각의 종견으로부터 채취된 정액을 일정시간 정치시킨 후 일반적인 정액 검사를 실시하였다. Table. 2에 나타난 것과 같이 5마리의 공시견으로부터 채취된 평균 정액량은 6.8 ± 1.1 /ml이었으며, 정자 수는 $244.8 \pm 34.7 \times 10^6$ /ml, 평균 정장의 운동성은 $94 \pm 2.7\%$, 정상적 형태의 정자 수는 $80.2 \pm 3.3\%$ 를 나타내었다. 그러나 이 등(2003)은 ml당 $1.2 \pm 0.3 \times 10^6$ 정액량과, 정자수와 차이를 보였고, 당 평균 정액량 3.4 ± 1.2 ml, ml당 $260 \pm 91.2 \times 10^6$, 운동성은 $91.5 \pm 4.7\%$ 등을 보고한 Pena 등(1998, 1999)과는 유사한 결과를 얻었는데, 이 차이는 사육환경, 계절, 공시된 개의 품종 등의 개체차이로 사료된다.

2. 정자의 동결보존에 있어 Glycerol 농도에 따른 정자의 생존율 및 운동성

Table 2. Parameter of fresh semen quality (n=15)

	Mean \pm SD
Volume (ml)	6.8 ± 1.1
Concentration ($\times 10^6$ /ml)	244.8 ± 34.7
Motility (%)	94 ± 2.7
Normal spermatozoa (%)	80.2 ± 3.3

개 정자를 각기 다른 Glycerol 농도에서 동결보존 후 용해하였을 때 정자의 생존율 및 운동성에 대한 결과가 Table 3에 나타나 있다. 4%의 Glycerol에서 동결보존 후의 정자의 생존율은 $68.8 \pm 7.4\%$ 로서 6%와 8%의 Glycerol 농도에서 동결보존하였을 때 각각 $25.4 \pm 9.2\%$, $14.2 \pm 4.4\%$ 로서 유의하게 높은 생존율을 나타냈으며 정자의 운동성에 있어서도 4%의 Glycerol을 이용하여 동결하였을 때 가장 높은 운동성을 보였다($p < 0.05$). 그러나 Pena 등(1998)은 Tris-fructose-citric acid 희석액을 이용하여 2, 4, 6 및 8%의 glycerol을 함유한 동결보호제를 이용하여 정자를 동결하였을 때 8%의 glycerol을 함유한 군에서 $57.0 \pm 12.8\%$ 로서 가장 높은 성적을, 4%군에서는 $39.8 \pm 12.7\%$ 로서 유의하게 낮은 생존율을 보고해 본 실험과 상반된 결과를 얻었다. 유 등(2003)은 희석액에 70mM fructose + trehalose을 첨가했을 때 유의하게 높은 운동성과 정상정자의 침체율을 보고하였다. 이는 사용된 희석액 및 동결법의 차이에 의한 것으로 사료된다. 또한 동결정액의 제조시 희석액에 첨가되는 당 성분은 fructose 및 glucose가 일반적으로 이용되고 있으며(Ivanova-kicheva 등, 1997; Rota 등 1997), 동결 용해 후 정자의 생존율 및 운동성 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Aslan 등, 1992).

Table 3. Survival rate and motility of sperm according to different glycerol concentration

Glycerol concentration	Survival rate (%)	Motility rate (%)
4%	68.8 ± 7.4^a	73.2 ± 8.3^a
6%	25.4 ± 9.2^b	64.0 ± 8.7^b
8%	14.2 ± 4.4^b	59.2 ± 9.1^b

^{ab} Values with different superscripts within column are significantly different($p < 0.05$).

동결보존 후 정자의 생존성에 영향을 미치는 요인 으로서는 희석액에 사용되는 buffer의 종류(Abdel-hakeam 등, 1991) 당의 분자량(Molinia 등, 1994; 유 등, 2003), 동결방법(Pena, 1999), 용해온도 등 (Pena 등, 2000) 여러 요인들에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다.

3. 상온에서 4℃까지의 동결속도에 따른 정자의 생존율 및 운동성

정자의 동결에서 희석액 I을 첨가한 후 상온에서 4℃까지 각각 30, 60 및 120분의 간격으로 4℃까지 온도를 하강시킨 후에 동결을 실시하였을 때 용해 후 정자의 생존율 및 운동성에 관한 결과가 Table 4에 나타나 있다. 상온에서 30, 60 및 120분에 4℃까지 하강시킨 후 동결 용해하였을 때 생존율은 각각 60.6±8.0, 71.4±7.3 및 62.6±9.2%였고, 정자의 운동성은 각각 64.8±8.5, 74.6±7.5 및 67.6±9.1%로서 60분간의 속도로 하강시킨 후 동결보존을 실시한 군에서 30분간의 속도로 하강시킨 군보다 유의하게 높은 생존율 및 운동성을 나타냈으나(p<0.05), 120분간의 속도로 하강시킨 군과는 유의차가 나지 않았다. Pena 등 (1998)에 의하

면 glycerol의 첨가시간에 따라 운동성은 유의차가 없었으나, 생존성에 있어서는 2시간 동안 -4℃로 하강시킨 후 glycerol을 첨가한 군에서 가장 높은 생존율을 나타냈다.

4. 동결보존액 첨가 후 평형시간에 따른 정자의 생존율 및 운동성

상온에서 희석액 I을 첨가하여 4℃까지 60분에 걸쳐 하강시킨 후에 동결보존액 II를 첨가하여 각각 30, 60 및 120분간 정자를 평형시킨 후 동결보존 하였을 때의 결과가 Table 5에 나타나 있다. 30, 60 및 120분간의 평형시간을 유지시킨 후에 동결하였을 때 정자의 생존율은 각각 53.6±7.5, 71.4±7.3 및 68.0±7.4%, 운동성은 각각 61.6±11.7, 74.6±7.5 및 69.0±7.9%로서 60분 동안 평형을 유지시킨 군에서 30분간 평형을 시킨 군보다 유의하게 높은 생존율 및 운동을 보였으나(p<0.05), 120분간의 평형을 시킨 군보다 다소 높은 생존성 및 운동성을 나타냈다.

5. 동결 속도에 따른 정자의 생존율 및 운동성

Straw에 loading된 정액을 액체질소의 표면에서

Table 4. Survival rate and motility of sperm according to freezing rate to 4℃

Time to 4℃ from room temperature (min)	Survival rate (%)	Motility rate (%)
30	60.6±8.0 ^a	64.8±8.5 ^a
60	70.6±6.8 ^{ab}	72.8±8.4 ^{ab}
120	62.6±9.2 ^b	67.6±9.1 ^b

^{ab} Values with different superscripts within column are significantly different(p<0.05).

Table 5. Survival rate and motility of sperm according to holding time

Holding time (min)	Survival rate (%)	Motility rate (%)
30	53.6±7.5 ^a	61.6±11.7 ^a
60	71.4±7.3 ^b	74.6± 7.5 ^{ab}
120	68.0±7.4 ^b	69.0± 7.9 ^b

^{ab} Values with different superscripts within column are significantly different(p<0.05).

Table 6. Survival rate and motility of sperm according to freezing rate

Height (cm)	Survival rate (%)	Motility rate (%)
3	43.8±7.2 ^a	57.0±8.4 ^a
5	77.0±7.0 ^b	80.2±6.3 ^b
7	63.4±8.5 ^{ab}	64.8±6.1 ^{ab}
9	37.2±5.3 ^a	63.0±5.0 ^{abc}

^{abc} Values with different superscripts within column are significantly different(p<0.05).

각각 3, 5, 7 및 9 cm의 거리에 정치시킨 후에 동결을 실시하였을 때 정자의 생존성 및 운동성에 관한 결과가 Table 6에 나타나 있다. 액체질소의 표면에서 5 cm의 높이에서 동결을 실시한 군의 생존율 및 운동성은 각각 77.0±7.0, 80.2±6.3%로서 3, 7 또는 9 cm 높이에서 동결을 실시한 군보다 유의하게 높은 생존성과 운동성을 나타냈다. 개 정자의 동결 시 일반적으로 이용되는 방법은 액체질소 표면에서 4~6 cm 높이에서 straw를 수평으로 약 10분간 정치시키거나(Andersen, 1975; Morton, 1988; Strom, 1997), straw를 액체질소 표면에 수직으로 고정된 후에 3단계로 하강시켜 동결을 완료하는 방법(Rota, 1999; Strom, 1997)이 널리 이용되고 있는데 이들 방법은 간단하고 고가의 장비가 불필요하다. Pena 등(2000)은 액체질소에 수직으로 동결을 실시한 군보다 수평으로 실시한 군에서 높은 생존율을 보고했으며, 이때 straw의 높이가 액체질소로부터 4cm의 거리에서 동결을 실시할 때 유의하게 높은 성적을 얻었다. Smith(1994)는 다른 희석액을 사용하여 액체질소 표면 위에서 1.5, 4 및

8 inch 높이에서 동결을 실시할 때 -10℃에서 -30℃ 사이에서 분당 -8.3℃의 비율로 하강시킬 때 용해 후 가장 높은 운동성을 보고하였다.

6. 용해 시 용해온도와 시간에 따른 정자의 생존율 및 운동성

일정 기간 액체질소에 보존된 정자를 용해하였을 때 용해온도와 용해시간에 따른 정자의 생존율 및 운동성에 관한 결과가 Table 7에 나타나 있다. 용해시 straw를 37℃에서 120초 동안 녹였을 때 정자의 생존율 및 운동성이 각각 77.0±7.0, 80.2±6.3%로서 47℃에서 20초 동안 녹인 군보다 높은 생존율을 나타냈으나 용해 후 운동성은 유의한 차이가 없었다. 정자의 생존율 및 운동성은 동결과 용해과정에서 많은 영향을 받으므로 적절한 동결 속도 및 용해속도가 많은 영향을 미친다(Mazur 등, 1985; Foote, 1964; Oettle 등, 1986). 용해 시 Olar (1984)은 straw를 75℃의 온도에서 용해하는 것이 35℃에서 용해하였을 때 보다 높은 운동성을, Yubi 등(1984)과 Smith 등(1994)은 37℃에서 용해하였

Table 7. Survival rate and motility of sperm according to thawing rate

Thawing temperature (℃) /Thawing time (sec)	Survival rate (%)	Motility rate (%)
27 / 120	58.6±8.7 ^a	59.8±9.3 ^a
37 / 120	77.0±7.0 ^a	80.2±6.3 ^a
47 / 20	54.4±8.0 ^{ab}	53.0±9.1 ^a
57 / 12	40.2±3.1 ^a	45.8±8.2 ^a

^{ab} Values with different superscripts within column are significantly different(p<0.05).

을 때가 55℃에서 용해한 정자보다 생존율, 운동성, 침체의 정상적인 상태가 유의하게 높다고 보고 하였으며 이는 본 실험의 결과와도 일치하였다.

적 요

본 실험은 실험건의 정액 동결 시 희석 액에 첨가되는 Glycerol 농도, 동결속도, 동결보존액 첨가 후 평형시간, 용해온도와 시간에 따라 정자의 생존성과 운동성을 조사하여 최적의 동결조건을 확립하기 위해 실시하였다.

1. 각기 다른 Glycerol 농도를 함유한 동결보존액에서 동결보존 후 용해하였을 때 4%의 Glycerol 농도에서 각각 $68.8 \pm 7.4\%$, $73.2 \pm 8.3\%$ 로서 다른 군보다 유의하게 높은 생존율과 운동성 나타냈다($P < 0.05$).
2. 희석액 I을 첨가한 정액을 상온에서 4℃까지 각각 30, 60, 120분간 속도로 하강 시켜 동결보존 후 용해하였을 때 60분간의 속도로 하강시킨 군에서 생존성은 $70.6 \pm 6.8\%$, 운동성은 $72.8 \pm 8.4\%$ 로서 다른 군보다 유의하게 높은 생존율과 운동성을 나타냈다($P < 0.05$).
3. 희석액 I을 첨가 후 상온에서 4℃까지 60분의 속도로 하강시킨 후 희석액 II를 첨가하여 각각 30, 60, 120 분 동안 평형을 유지시킨 후 동결보존 하였을 때 60분 동안 평형을 유지시킨 군에서 생존성은 $71.4 \pm 7.3\%$, 운동성은 $74.6 \pm 7.5\%$ 로서 다른 군보다 유의하게 높은 생존율 및 운동성을 나타냈다($P < 0.05$).
4. 정액을 동결함에 있어 액체질소의 표면에서 각각 3, 5, 7, 9cm의 높이에서 정치시킨 후 동결을 실시하였을 때 액체질소의 표면 5cm의 높이에서 동결을 실시한 군에서 용해 후 생존성과 운동성은 각각 $77.0 \pm 7.0\%$, $80.2 \pm 6.3\%$ 로서 다른 군보다 유의하게 높은 생존율과 운동성을 나타냈다($P < 0.05$).
5. 일정기간 보존된 동결정액을 용해 시 용해온도에 따른 정자의 생존성과 운동성은 37℃의 온도에서 120초 동안의 기간에 녹였을 때 각각 $77.0 \pm 7.0\%$, $80.2 \pm 6.3\%$ 로서 다른 군보다 유의하게 높은 생존율을 나타냈다($P < 0.05$).

참고문헌

- Abdelhakeam AA, Graham EF, Vazquez IA and Chaloner KM. 1991. Studies on the absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen : Development of an extender for freezing : Effects of osmotic pressure, egg yolk levels, type of sugars, and the method of dilution. *Cryobiology*, 28: 43-49.
- Andersen K. 1975. Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique. *Zuchthyg*, 10:1-4.
- Aslam M, Ahmad KM, Ahmad M and Gill SA. 1992. Additive effects of carbohydrates in tris as bull semen extenders equilibration for three od five fours. *Pakistan Vet. J.*, 12:174-177.
- Battista M, Parks J and Concannon P. 1988. Canine sperm post-thaw survival following freezing in straws or pellets using PIPES, lactose, tris or TEST extenders. *Proc. XI Int. Cong. Anim. Reprod. Artif. Insem.*, 3:229 (abstr).
- Dobrinski I, Lulai C, Barch AD and Post K. 1993. Effects of four different extenders and three different freezing rates on post-thaw viability of dog semen. *J. Reprod.*
- Foote RH. 1964. Extenders of for freezing dog semen. *Am. J. Vet. Res.*, a 25:37-39.
- Foote RH. 1964 The effects of electrolytes, sugars, glycerol, and catalase on survival of dog sperm stored in buffered-yolk mediums. b 25:32-36.
- Gill HP, Kaufman CF, Foote RH and Kirk RW. 1970. Artificial insemination of beagle bitches with freshly collected, liquid-stored and frozen semen. *Am. J. Vet. Res.*, 31:1807-1813.
- Ivanova-Kicheva MG, Bobadov N and Somlev B. 1997. Cryopreservation of canine semen in pellets and 5ml aluminium tubes using three extenders. *Theriogenology*, 48: 1343-1349.
- Marzur P, Leibo SP, Farrant J, Chu EHY, Hanna MG and Smith LH. 1970 Interactions of cooling rate, warming rate and protective additive

- on the survival of mammalian cells. In : Wolstenholme GEW O Connor M. (eds.). The frozen cell. CIBA Foundation symposium. 69-88.
- Molinia FC, Evans G and Maxwell WMC. 1994. *In vitro* evaluation of zwitter ions buffers in diluents for freezing ram spermatozoa. *Reprod. Nutr. Dev.*, 34:491-500.
- Morton DB. 1988. Artificial insemination with frozen semen in the dog : principles of 'DNA fingerprinting'. In: Jones DE and Joshua JO (eds), *Reproductive clinical problems in the dog*. Bristol : Wright and Sons Ltd. 169-186.
- Oettle EE and Soley JT. 1986. Ultrastructural changes in the acrosome of human sperm during freezing and thawing : a pilot trial. *Arch. Androl.*, 17:145-150.
- Olar TT. 1984. Cryopreservation of dog spermatozoa. MS Thesis, Colorado University, Fort Collins, 158.
- Pena AI, Barrio F, Quintela LA and Herradon PG. 1998. Effect of different glycerol treatment on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. *Theriogenology*, 50:163-174.
- Pena AI, Barrio F, Quintela LA and Herradon PG. 1998. Effects of sodium dodecyl Sulphate on post-thaw dog semen quality during *in vitro* incubation at 39°C and 22°C. *Reprod. Dom. Anim.*, 33:393-398.
- Pena A, Johannisson A and Linde-Forsberg C. 1999. Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using a new triple fluorescent staining and flow cytometry. *Theriogenology*, 52:965-980.
- Pena A and Linde-Forsberg C. 2000. Effect of equex, one-or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 54:859-875.
- Rota A, Strom B, Linde-Forsberg C and Rodriguez-Martinez H. 1997. Effects of Equex STM Paste on *in vitro* viability of frozen-thawed dog spermatozoa subjected to a thermoresistance test. *Theriogenology*, 47:1093-1101.
- Rota A, Iguer-Ouada M, Verstegen J and Linde-forsberg C. 1999. Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a tris extender with or without equex stm paste. *Theriogenology*, 51:1045-1058.
- Smith FO. 1994. Cryopreservation of Canine Semen: Technique and Performance. *Proc 10 th Int. Congr. Anim. Reprod.*, 2:216. (abstr).
- Seager SWJ. 1969. Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. *AI Digest.*, 17:6-7.
- Strom B, Rota A and Linde-Forsberg C. *In vitro* characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology*, 1997, 48:247-256.
- Szasz F, Gabor G and Solti L. 2000. Comparative study of different methods for dog semen cryopreservation and testing under clinical conditions. *Acta. Vet. Hung.*, 48:325-333.
- Yubi AC. 1984. Investigations of dog semen with particular reference to freezing techniques. MVM thesis, Faculty of Veterinary Medicine. University of Glasgow.
- 이영락, 이성립, 강태영, 최상용. 2003. 개 정자의 동결용해 후 생존성 및 침체의 변화. *한국수정란이식학회지*, 18: 51-59.
- 유대중, 정수룡, 오인석, 김홍률, 이제웅, 조성균, 배인휴, 양철주, 공일근. 2002. Tris-buffer에 첨가되는 당의 종류가 동결·용해정자의 운동성에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지*, 17: 137-143.
- 정정란, 유재규, 양성열, 여현진, 박종식, 예은하, 노규진, 최상용. 2001. 개정자의 보존 방법에 따른 침체 및 생존성의 변화 II. 동결 보존에 따른 효과 *한국수정란이식학회지*, 16:133-138.

(접수일: 2003. 11. 2/ 채택일: 2003. 12. 12)