

돼지정액 동결중 식빙처리가 용해후 정자생존을 및 첨체형태에 미치는 영향

김용준¹ · 김용환 · 이영준 · 김수희 · 지동범*

전북대학교 수의과대학
*지동범 동물병원

Effects of Seeding during Freezing Procedure on Post-Thaw Viability and Acrosome Integrity of Boar Spermatozoa

Yong-jun Kim¹, Yong-hwan Kim, Young-jun Lee, Sue-hee Kim and Dong-beom Ji*

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University
*Ji Dong Beom Animal Clinic

Abstract : To investigate the effects of seeding during freezing procedure on post-thaw viability, motility, and acrosome integrity of boar spermatozoa, semen from 5 Yorkshire boars were collected for this experiment. Raw semen were diluted with Merck I, subsequently added with cooling diluent containing lactose and egg yolk and with freezing diluent containing glycerol. The diluted semen were frozen on the rack in the styrofoam box filled with liquid nitrogen at the distance of 5 cm or 1 cm above LN2 level. Seeding was performed to only a group of straws frozen at 5 cm away on the surface of LN2. The frozen semen were thawed in 50°C water and the viability and local motility were analyzed by sperm analysis imaging system. A part of thawed semen was taken for the examination of morphology of apical ridge of the acrosome to compare with the effect of seeding between the seeding-treated and non treated groups. 1. Post-thaw viability was considerably higher in seeding-treated sperm than non-seeding group ($p < 0.01$), however, no difference of local motility was obtained among the groups. 2. At three hours after thawing, viability was also higher in seeding-treated group than non-treated group ($p < 0.05$), along with no difference of motility among the groups. 3. Higher normal acrosome integrity was obtained in the seeding-treated sperm than non-treated groups ($p < 0.01$). 4. Between non-seeded groups, higher normal acrosome integrity was obtained in the sperm group frozen at 5cm upper on the surface of LN2 than that frozen at 1cm away ($p < 0.01$). These results indicated that seeding treatment during freezing boar spermatozoa was beneficial to post-thaw viability and normal acrosome integrity.

Key words : boar spermatozoa, freezing semen, seeding, post-thaw viability, acrosome integrity.

서 론

돼지는 가축 중에서 중요한 산업동물의 하나로 인공수정은 질적 양적 생산성을 높이기 위하여 그리고 불필요한 종모든의 보유와 사육에 드는 경비를 절감하기 위하여 많은 관심의 대상이 되고 있다. 그리고 현재 우리나라에서는 액상정액을 이용하여 인공수정이 상당히 많이 시술되고 있다.

특히 동결정액을 이용한 인공수정^{7,11,22,27}은 생산성 향상을 위한 많은 장점을 가지고 있기 때문에 돼지정액 동결시 용해 후 정자 생존성을 높이기 위한 연구로서 희석액, 동결용기, 동결기구, 동결속도, 용해 후 첨가 배지등 여러가지 조건에 대한 연구^{1,4,10,13,14,23,28,29,32,34}가 수행되어 왔으나 아직까지도 돼지 동결정액을 이용한 인공수정 후 수태율의 저하, 산자수의 감소 등의 문제가 잘 해결되고 있지 않아 폭넓은 실용화에는 많은 어려움이 있다.

이와 같이 동결정액을 이용한 인공수정의 수태율은 신선

정액과 비교하여 낮은 성적을 나타내며, 용해 후 정자의 생존율도 동결전 생존율과 비교하여 감소된다고 하는 여러 보고들이 있다^{10,26}.

살아있는 세포의 동결시 세포에 손상을 일으키는 원인은 여러 가지가 있으나, 그중의 하나로서 여러 연구자들^{21,24,25,27}에 의하면 세포의 용액에 과냉각 발생시 결빙이 이루어지면 세포는 세포의 결빙에 대한 빠른 온도 변화에 대응하여야 하며 이때 latent heat의 상승에 의해 상해를 입게 된다고 한다.

따라서 식빙 (seeding)은 세포의 용액이 과냉각 되기 전 빙정형성을 유도하여 세포내 온도와 일치시켜 살아있는 세포에 대한 손상을 방지하기 위한 방법으로 응용되었다.

Whittingham³⁶이 mouse 수정란에서 식빙을 처음 시도한 이래로 여러 연구자들은 dry ice¹⁵, liquid nitrogen을 이용한 blowing¹⁶, liquid nitrogen으로 냉각시킨 forcep^{이용법}¹⁷ 및 silver iodide^{이용법}^{18,19}등의 식빙 방법을 포유동물의 수정란 동결시 적용하였으며 식빙은 주로 수정란 동결시 필수 과정⁹으로 이용되고 있다.

식빙 처리를 정액에 이용한 경우로서는 Crister 등⁸이 사람

¹Corresponding author.
E-mail : yjk@chonbuk.ac.kr

정액 동결과정 중 식빙 처리를 하여 식빙 처리군에서 비처리군보다 용해 후 활력이 높게 나타났다고 하였고, Chiravuch 등⁶은 정자무력증을 가진 사람의 정액 동결시 식빙 처리를 하여 정자활력이 개선되었다고 하였다.

한편 가축에서는 Chen 등⁵이 소 정액 동결시 식빙 처리를 하였으며, 국내에서는 김 등³⁷이 개 정액에 대한 식빙 처리를 하여 식빙 처리군에서 더 높은 용해 후 생존율을 보고한 바 있다.

그러나 아직 돼지 정액에 대한 식빙 처리에 대한 연구는 연구진전이 없는 상태이므로 이 실험에서는 돼지 정액 동결시 용해 후 생존성을 높일 수 있는지 그 여부와 식빙 처리시 정상 침체 형태를 비처리군과 비교하고자 하였으며, 아울러 이 실험에서는 system에 의한 보다 객관적인 자료를 제시하고자 image analysis system을 이용하여 용해 후 정자의 생존율과 운동성을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 동물

실험에 이용된 종모돈은 과거 번식력이 증명되었고 임상 검사상 건강한 3-5년령의 Yorkshire 5두이었다.

정액채취

정액은 수지법으로 채취하였고, 정액 채취시 정액 채취통 입구를 멸균 거즈로 덮어 뇨도구선액과 이물질을 제거하였다.

정액의 검사

정액 채취 후 정액을 실험실로 옮겨 일반적인 현미경 검사 즉, 정자활력, 정자농도 및 기형을 검사를 실시하였다.

동결정액의 희석액 제조

1) 1차 희석액

정액 동결을 위한 1차 희석액은 Merck 1 (Merck chemical Co, Germany)을 원정액과 1:1로 희석하였다. Merck 1 희석액은 glucose-monohydrate 6.0 g, Na-citrate 0.37 g, Na-bicarbonate 0.12 g, EDTA 0.37 g, gentamycin 0.025 g, streptomycin 0.08 g을 3차 증류수 100 ml에 혼합하여 제조하였다. 원정액을 희석한 후 17°C 배양기에서 하루저녁 보존하였고, 즉시 동결시는 다음 동결과정으로 진행하였다.

2) 냉각 및 동결 희석액

냉각희석액은 11% lactose 80 ml와 난황 20 ml를 혼합하여 100 ml가 되도록 하였다. 동결희석액은 냉각희석액 92.5%, glycerol 6%, OEP를 1.5% 되도록 조성하였으며, 냉각희석액과 동결희석액의 혼합비율은 2:1이 되도록 하여 최

종 glycerol 농도는 2%가 되었다.

3) 희석액 총량

실험을 위한 희석액은 총량이 100 ml 이내에서 정자수가 4×10^8 /ml이 되도록 하였다.

희석과정

일일저녁 보존한 희석정액을 3,000 rpm에서 12.5분간 원심분리하였고 상층액을 제거한 후 정자 pellet에 냉각희석액을 총 희석량의 2/3가 되도록 주입하고 나서 조심스럽게 혼합하였다. 그 후 냉각희석액이 혼합된 정액, 동결희석액, 스트로, straw ball을 5°C 냉장실에서 1시간 반 동안 보존하였다. 그리고 나서 5°C 냉장실에서 희석액 총량의 1/3로 준비된 동결희석액을 첨가한후 조심스럽게 혼합하였다.

스트로내 정액의 충전

동결을 위한 정액 스트로는 5 ml 스트로를 이용하였고 10 ml 주사기를 이용해 스트로내 정액을 충전하였다. 이때 중심부에 공기층을 소량이 되도록 형성하였다. 스트로 양쪽을 straw ball로 막았다.

동결과정

정액 동결을 위한 동결기로는 스티로폼 상자를 이용하였고 일정량이 되도록 액체질소를 채웠다. 액체 질소 수면 위 각각 1 cm 또는 5 cm가 되도록 철제 rack를 놓고 그 위에 스트로를 올려놓았다. 동결은 액체질소 수면위로부터 1 cm 거리인 경우 20분, 5 cm 거리인 경우는 30분 동안 수행하였다.

식빙처리

식빙처리는 액체 질소 수면으로부터 5 cm 떨어진 거리에서 동결되는 스트로 중 일부에 대하여 수행되었다. 식빙처리는 동결이 개시된지 2분 30초에 실시되었다. 식빙처리는 needle holder를 액체질소에 담구었다가 스트로 양쪽을 순간적으로 집어서 실시하였다.

동결정액의 보존

동결이 완료된 스트로는 액체질소통내로 옮겨 용해시까지 보존하였다.

동결정액의 용해

동결된 정액 스트로는 50°C 수조에 넣어 40초 동안 용해하였다. 용해후 정액을 30-32°C로 보존된 Merck 1희석액 50 ml에 넣어 조심스럽게 혼합하였고 정액병을 38°C 수조에 놓아 15분간 유지하였다.

Table 1. Criteria for examination of the apical ridge of the acrosome

Normal acrosome		Abnormal acrosome			
Intact	With vesicle	Ruptures	Part detached	No acrosome	Deformed

용해 정자의 검사

용해된 정액은 Semen analysis imaging system (SAIS, Mika motion analyzer, Germany)로 정자의 생존율 및 국소 운동성을 분석하였다. 이를 위해 용해된 정액 30 µl를 Mackler Chamber에 떨군후 현미경으로 옮겼으며, 5개 시야를 임의로 선택하여 그 자료를 자체 프로그램으로 종합 분석하도록 하였다.

용해 정자의 침체 형태 검사

용해된 정자의 침체 형태 검사를 위하여 동결정액의 용해 후 즉시 200 µl를 취하였으며 이중 50 µl를 formal citrate solution 300 µl에 혼합하였다. Formal-citrate 용액은 Tris-Na-Citrate-dehydrated 2.9 g을 증류수 100 ml에 혼합하였고 여기에 35% formalin 4 ml를 혼합하여 조성하였다. 침체 형태 검사는 위상차 현미경 1000배 시야에서 수행되었다. 검사시 200개의 정자를 검사하였으며 침체가 온전한 정자와 침체 apical ridge에 이상이 있는 정자의 수를 세었다. 침체 형태 검사를 위한 판정기준은 Table 1과 같다.

통계분석

이 실험에서 얻어진 결과는 ANOVA로 통계처리하였으며 ANOVA 통계처리 후 유의성이 있는 경우는 Turkey-Kramer Multiple Comparison Test로 실험군간 유의차를 구하였다.

결 과

돼지 정자의 동결과정중 식빙처리한 군과 비처리군의 용해후 생존율을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 액체 질소 수면에서 5 cm 거리에서 동결된 정액중 식빙처리가 된군은 식빙처리되지 않은 다른 군들보다 현저히 높은 생존율을 나타내었다($p < 0.01$). 식빙처리되지 않은 1 cm 거리 동결군과 5 cm 거리 동결군간에는 유의적인 차이가 인정되지 않았다.

돼지 정자의 동결과정중 식빙처리한군과 비처리군의 용해 후 국소적인 운동성을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 운동성은 5 cm 거리 동결군중 식빙처리군이 가장 높은 수치를 나타내기는 하였으나 실험군간의 유의적인 차이는 인정되지 않았다.

돼지정자의 동결과정중 식빙처리한군과 비처리군의 용해 후 3시간에 생존율을 조사한 결과는 Table 4와 같다.용해직 후와 마찬가지로 액체질소 수면위 5 cm 거리에서 동결 및 식빙처리된군은 식빙처리되지 않은 다른 군들보다 유의성있게 높은 생존율을 나타내었다($p < 0.05$). 식빙처리되지 않은 1 cm 거리 동결군과 5 cm 거리 동결군간에는 유의적인 차이가 인정되지 않았다.

돼지정자의 동결과정중 식빙처리한군과 비처리군의 용해 후 3시간에 국소적인 운동성을 조사한 결과는 Table 5와 같다. 식빙처리군이 비처리군들보다 높은 수치의 운동성을 나

Table 2. Viability* of boar spermatozoa immediately after thawing between seeding-treated and not treated groups during freezing (n=13)

	Experimental group			
	Frozen at above LN ₂	Not seeding-treated		Seeding-treated
		1 cm	5 cm	5 cm
Viability		14.8±4.54 ^a	15.2±4.38 ^b	22.3±6.21 ^b

^{a,b}: Different superscripts denote significant differences within rows ($p < 0.01$)

*: Viability was assayed by sperm analysis imaging system (SAIS)

Table 3. Comparison of motility of boar spermatozoa immediately after thawing between seeding-treated and not treated groups during freezing (n=13)

	Experimental group			
	Frozen at above LN ₂	Not seeding-treated		Seeding-treated
		1 cm	5 cm	5 cm
Motility		18.8±5.10	20.0±5.40	21.8±6.06

*: Local motility was analysed by sperm analysis imaging system

Table 4. Viability* of boar spermatozoa 3 hours later after thawing between seeding-treated and not treated groups during freezing (n=9)

	Experimental group			
	Frozen at above LN ₂	Not seeding-treated		Seeding-treated
		1 cm	5 cm	5 cm
Viability		12.4±2.96 ^a	13.9±4.08 ^a	20.0±5.66 ^b

^{a,b}: Different superscripts denote significant differences within rows ($p < 0.05$)

Table 5. Comparison of motility of boar spermatozoa 3 hours later after thawing between seeding-treated and not treated groups during freezing (n=9)

	Experimental group			
	Frozen at above LN ₂	Not seeding-treated		Seeding-treated
		1 cm	5 cm	5 cm
Viability		17.8±4.41	18.0±5.55	19.3±6.22

Table 6. Pate of normal acrosome integrity* of boar spermatozoa after thawing between seeding-treated and not treated groups during freezing (n=7)

	Experimental group			
	Frozen at above LN ₂	Not seeding-treated		Seeding-treated
		1 cm	5 cm	5 cm
Normal acrosome integrity		76.1±2.88 ^a	81.0±1.41 ^b	85.5±2.05 ^c

^{a,b,c}: Different superscripts denote significant differences within rows ($p < 0.01$)

*: Acrosome integrity was assayed by examining acrosome apical ridge

타내기는 하였으나 실험군간의 유의적인 차이는 인정되지 않았다.

돼지정자의 동결과정중 식빙처리한군과 비처리군에 대하여 정상적인 침체형태를 조사한 결과는 Table 6과 같다. 침체 apical ridge의 이상여부를 조사한 결과 액체질소 수면위 5 cm 거리 동결군중 식빙처리된 군은 식빙처리가 되지 않은 다른 군들보다 현저히 높은 정상 침체율을 나타내었고 ($p < 0.01$), 식빙처리가 되지 않은 군들중 5 cm 거리 동결군은 1 cm 거리 동결군보다 현저히 높은 정상 침체율을 나타내었다($p < 0.01$).

고 찰

이 실험에서 얻어진 결과는 액체질소 수면에서 5 cm 거리에서 동결된 돼지 정액중 식빙 처리군은 처리되지 않은 다른 군들보다 현저히 높은 생존율을 나타내었다.

이 실험성적은 Leibo²⁴가 식빙 처리는 세포의 동결과정중 빙정형성을 유도하여 과냉각을 짧게 함으로서 세포내 온도 상승을 억제하여 삼투압 조건 및 결빙 상태에서 세포가 손상되는 것을 방지한다고 한 보고와 관련성이 많은 실험성적이라 할 수 있다. 또한 Crister 등⁸이 사람정자 동결시 식빙 처리군에서 비처리군보다 융해 후 정자 활력이 높게 나타났다고 한 보고, 그리고 Chiravuch 등⁶이 역시 사람에서 질이 떨어지는 정액 동결시 식빙 처리결과 정자활력이 개선되었다고 한 보고, 김 등³⁷이 개 정액 동결과정중 식빙 처리군이 비처리군보다 더 높은 활력 및 생존율을 나타내었다고 한 보고와 유사한 결과로 보여진다.

이 결과를 볼때 정액 동결시 식빙 처리는 정자 활력 및 생존능력을 더 향상시킬수 있는 방법으로 판단된다.

한편 액체질소위 1 cm와 5 cm에서 각각 동결된 비처리군 간에는 생존율에서 차이가 인정되지 않았는데 1 cm 거리 동

결시 20분의 동결시간 조건은 5 cm 거리 동결시 30분 동결시간 조건과 큰 차이가 없음을 시사한다.

이 실험에서 1 cm 거리 동결시 식빙 처리군을 두지 않은 것은 동결시간이 짧아 식빙 처리 작업이 용이하지 않기 때문이었다.

이 실험에서 정액 동결은 styrofoam box를 이용한 동결방법으로 수행되었으나 향후 programmed freezer를 이용하여 충분한 holding time을 부여하여 식빙 처리한 것과 styrofoam box에서 동결시 식빙 처리한 것과 그 성적을 비교하는 연구가 더 수행되어야 할 것이다.

이 실험에서 돼지 정자의 융해 후 생존율 범위는 14.8-22.3%의 범위이었다. 이것은 다른 가축의 융해 후 생존율의 범위보다 상당히 낮은 수치라고 판단된다. 한편, 이 실험에서는 주관적인 평가는 제시되어 있지 않으나 주관적인 평가시 SAIS 평가보다 10-20%를 더 높게 평가할 수 있었던 점을 참고로 제시할 수 있지만, 이 실험에서는 주관적인 평가를 피하고 SAIS에 의한 평가자료만을 제시하고자 하였다.

이 실험에서 돼지 정자의 동결과정중 식빙 처리군과 비처리군의 융해후 국소적인 정자 자체의 운동성을 조사한 결과 운동성은 5 cm 거리 동결군중 식빙 처리군이 가장 높은 수치를 나타내기는 하였으나 실험군간의 유의적인 차이는 인정되지 않았다.

이 결과를 비교할 수 있는 다른 연구결과 보고를 접하지는 못하였으나 이 결과를 상기 생존율의 결과와 비교하면 식빙 처리는 생존율에 영향을 주나 융해후 정자 운동성에는 크게 영향을 주지 않는 것으로 보여진다.

한편, 김 등³⁷의 연구에서 개 정자 동결시 식빙 처리한 군은 비처리군보다 융해 후 더 높은 운동성을 보인다고 하였는데 그 결과는 주관적인 현미경 검사이어서 SAIS에 의한 결과와 비교되는 점이라고 할 수 있겠다.

이 실험의 연구 결과에서 운동성의 수치는 생존율보다 다

소 높은 수치를 보였는데 이것은 정자 자체 국소 운동성에 대한 SAIS의 평가인 점을 감안해야 할 것으로 본다.

이 연구에서 돼지 정자의 용해 후 3시간에 조사된 식빙 처리군과 비처리군의 생존율 및 정자의 운동성은 용해직후의 결과와 같은 결과이었으며 단지 그 수치만이 다소 감소된 경향을 나타내었는데, 시간이 경과될수록 사멸 정자가 나타나기 때문인 것으로 판단된다.

이 연구에서 돼지 정자의 동결 과정중 식빙 처리군과 비처리군에 대하여 침체 apical ridge의 이상여부를 조사하여 정상적인 침체 형태를 조사한 결과 식빙 처리군은 비처리군들보다 현저히 높은 정상 침체율을 나타내었다.

Bane³과 Andersen²은 돼지정자에 대한 연구에서 침체는 수정능력을 갖는게 매우 중요하다고 하였으며 정액중 비정상적인 침체가 많은 경우에는 불임 또는 저수태성을 나타낸다고 하였다. 따라서 많은 연구자들^{12,30,33,35}이 동결 후 생존성을 나타내는 지표로서 침체의 형태 검사를 수행하였으며 Pursel³¹은 침체 형태 검사는 침체의 apical ridge의 형태검사에 기초한다고 하였다.

이 실험에서도 침체의 apical ridge의 이상상태를 분류하여 공포가 있는 경우(with vesicle), 붕괴된 경우(ruptured), 일부 훼손된 경우(part detached), 침체가 전혀 인정되지 않는 경우(no acrosome), 침체가 변형된 경우(deformed)로 구분하였고 침체가 온전한 형태를 나타내는 것을 정상정자로 분류하여 비교하였으며, 식빙 처리군에서 비처리군보다 높은 정상 침체출현율을 나타낸 것은 동결과정 중 식빙 처리가 결빙시 나타날 수 있는 세포의 손상을 어느 정도 보호해 줄 수 있는 것으로 판단된다.

한편, 식빙 비처리군간 비교에서도 액체질소 수면위 5cm 거리 동결군은 1cm 거리 동결군보다 더 높은 정상 침체율을 나타내었는데, 이것으로 보아 돼지 정액 동결시 20분간 1cm 거리 동결에 비해 30분간 5cm 거리 동결, 즉 완만 동결 방법이 침체 손상이 더 적은 것으로 사료된다.

이상의 결과 돼지 정자의 동결과정 중 식빙 처리는 비처리군에 비해 용해 후 더 높은 정자 생존율 및 정상 침체율을 나타낸다는 것을 알 수 있었다.

결 론

돼지 정액 동결시 식빙 처리를 하였을 때 용해 후 정자의 생존율 및 운동성 그리고 침체형태의 변화를 조사하기 위하여 Yorkshire 5두의 정액을 채취하였다. 채취된 정액을 Merck I 회석액으로 회석한 후 lactose와 난황으로 조성된 냉각 회석액과 glycerol이 포함된 동결회석액을 첨가하였고 styrofoam box를 이용하여 액체 질소 수면위 5cm, 1cm 거리에 스트로를 놓아 각각 동결 하였으며, 식빙 처리는 5cm 거리 동결 정액 중 일부에 대해 실시하였다. 동결정액의 용해는 50°C에서 실시되었고 용해 후 SAIS를 이용하여 정자의 생존율 및 국소 운동성을 조사하였으며, 일부 정자에 대해 위상차현미경을 이용하여 침체형태검사를 하여 정상 침

체율을 조사하였다.

1. 식빙 처리군은 비처리군보다 용해 후 현저히 높은 생존율을 나타내었으나($p < 0.01$), 국소 운동성은 실험군간 유의적인 차이가 없었다.

2. 용해후 3시간에 식빙 처리군은 비처리군보다 유의성 있게 높은 생존율을 나타내었으나($p < 0.05$), 국소운동성은 실험군간 차이가 인정되지 않았다.

3. 식빙 처리군은 비처리군보다 용해 후 현저히 높은 정상 침체 나타내었다($p < 0.01$).

4. 식빙 비처리군에서도 액체질소 수면위 5cm 거리 동결군은 1cm 거리 동결군보다 더 높은 정상 침체율을 나타내었다($p < 0.01$).

참 고 문 헌

- Almid T, Johnson LA. Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. J Anim Sci 1988; 66: 2899-2905.
- Andersen K. Morphological abnormalities in the acrosome and nucleus of boar spermatozoa. Nord Vet-Med 1974; 26: 215-218.
- Bane A. Acrosomal abnormality associated with sterility in boar. Proc IVth Int Congr Anim Reprod., The Hague 1961; 4: 810-817.
- Bwanga Co, De Braganca M, Einarsson S, et al. Freezing of boar semen in mini and maxi-straws. J Vet Med., A 1990; 37: 651-658.
- Chen Y, Foote RH, Tobback C, et al. Survival of bull spermatozoa seeded and frozen at different rates in egg yolk-tris milk extenders. J Dairy Sci 1993; 76: 1028-1034.
- Chiravuch S, Bruns ES, Prins GS. Improvement of post-thaw sperm motility in poor quality human semen. Fertil & Steril 1993; 60(4): 706-710.
- Coulter GH. Bovine spermatozoa in vitro: a review of storage, fertility estimation and manipulation. Theriogenology 1992; 38: 197-207.
- Crister JK, Huse-Benda AR, Aaker DV, et al. Cryopreservation of human spermatozoa I. Effects of holding procedure and seeding on motility, fertilizability, and acrosome reaction. Fertil & Steril 1987; 47(4): 656-663.
- Farrand GD, Elsdon RP, Seidel GE. Effect of slow cooling end point temperature on survival of frozen bovine embryos. J Anim Sci 1985; 61(2): 460-465.
- Fiser PS. Interactions of cooling velocity, warming velocity and glycerol concentration on the survival of frozen-thawed boar sperm. Reprod Dom Anim Suppl 1991; 1: 123-137.
- Graham EF, Crabo BG, Pace MM. Current status of semen preservation in the ram, boar and stallion. XII Biennial Symposium on Animal Reproduction. J Anim Sci 1978; 47(Suppl. II): 80-119.
- Hillman KH and Treu H. Deep freezing of boar semen: Demonstration and estimation of morphological and enzyme changes of deep-frozen boar semen. Zuchthygiene 1973; 8: 105-112.
- Hofmo PO and Almid T. Recent developments in freezing of boar semen with special emphasis on cryoprotectants. Reprod

- Dom Anim suppl 1991; 1: 111-122.
14. Johnson LA. 1980. Artificial insemination of swine: Fertility with frozen boar semen. Copenhagen: Int Pig Vet Congr. 1980: 37.
 15. Kasai M, Niwa K, Iritani A. Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos. J Reprod Fert 1981; 63: 175-180.
 16. Kim HK, Ko MS, Kim IC, *et al.* Deep freezing of boar semen in liquid nitrogen container. Korean J Anim Sci 1989; 31(3): 155-157.
 17. Kim JK, Kim CK, Kang MJ, *et al.* Studies on simplified procedures for freezing and thawing of bovine embryos IV. Effects of simplified procedures of freezing and seeding using a cryoprotectant containing sucrose on the rabbit embryo survival rate determined with the FAD test. Korean J Anim Sci 1988; 31(10): 183-189.
 18. Kojima T, Soma T, Oguri N. Effect of ice nucleation by droplet of immobilized silver iodide on freezing of rabbit and bovine embryos. Theriogenology 1988; 30(6): 1199-1207.
 19. Kojima T. Studies on cryopreservation of mammalian embryos induction of ice formation with droplets of silver iodide immobilized in alginate gel. Jpn J Anim Reprod 1991; 37(5): 13-23.
 20. Kuzan FB, Quinn P. Cryopreservation of mammalian embryos. In vitro fertilization and embryo transfer. A Manual of Basic Techniques. 1988: 301-347.
 21. Kuzan FB and Quinn P. Cryopreservation of mammalian embryos. In: In vitro fertilization and embryo transfer. New York: Plenum Press. 1988: 301-306.
 22. Larsson K. Current research on the deep freezing of boar semen. World Rev Anim Prod 1978; XIV: 59-64.
 23. Larsson K. Boar sperm viability after freezing and thawing. 1st Intl Conf. Deep freezing boar semen. Uppsala. 1985: 177-188.
 24. Leibo SP. The theory and practice of seeding in embryo cryopreservation. Embryo Transfer Newslett. 8(1): 7.
 25. Mazur P. Basic concepts in freezing cells. 1st Intl Conf. Deep freezing boar semen. Uppsala. 1985: 91-112
 26. Park Cs, Yang MH, Hwang Ds, *et al.* Study on fresh and deep-fresh and deep-frozen storage of korean native goat spermatozoa. Korean J Anim Sci 1989; 31(7): 412-419.
 27. Parkinson TJ, Whitfield CH. Optimization of freezing conditions for bovine spermatozoa. Theriogenology 1987; 27(5): 781-789.
 28. Parquignon M, Martinat-Botte F, Bariteau F, *et al.* Preoccupations et connaissances techniques en matiere de reproduction porcine. Jour Rech Porcine en France. 1978: 63-92.
 29. Parquignon M. Freezing and thawing extenders for boar spermatozoa. 1st Intl Conf. Deep freezing boar semen, Uppsala. 1985: 129-146.
 30. Pursel VG, Johnson LA. Procedure for the preservation of boar spermatozoa by freezing. U.S. Dept Agric ARS. 1971: 44-227.
 31. Pursel VG. Advances in preservation of seine spermatozoa. In: H.W. Hawk ed. Beltsville Symponia III. Animal Reproduction Allanheld, Osmun and Co., Montclair, NJ. 1979: 145-157.
 32. Rodriguez-Martinez H, Ericksson B, and Lundeheim N. Reproduction in domestic animals: Boar semen preservation. Proc. of the Third international conference on boar semen preservation. Mariensee. 1996: 161-168.
 33. Romeny E, Hillman KH, and Richter L. Deep freezing of boar semen 4th communication: Laboratory experiments and inseminations with frozen boar semen using the extender. Hulsenberg IV. Dtsch. tierarztl Wschr. 1974; 81: 353-354.
 34. Waberski D, Meding S, Dirksen G, *et al.* Fertility of long-term stored boar semen: Influence of extender(Androhep and Kiev), storage time and plasma droplets in the semen. Animal Reproduction Science 1994; 36: 145-151.
 35. Westerdorf D, Richter L, and Treu H. On the deep freezing of boar semen: Laboratory and insemination results with the Hulsenbergstraw procedure. Dtsch tierarztl Wschr 1975; 82: 261-267.
 36. Whittingham DG. The freezing of mammalian embryos(Eds). Ciba Foundation symposium 52, Amsterdam. 1977: 97-124.
 37. 김종호, 이필돈, 유일정, 김용준. 건 정액 동결시 seeding 처리가 용해 후 정자의 활력 및 생존율에 미치는 효과. 한 국가축 위생학회지 1995; 19(1): 1-12.