

돼지정액의 동결에 관한 연구

II. 동결한 돼지정액의 체내, 체외수정능력

김 광 식[†] · 송 해 범¹
천안연암대학

Studies on the Freezing of Boar Semen II. *In Vitro* and *In Vivo* Fertilizing Capacity of Frozen Boar Spermatozoa

K. S. Kim[†] and H. B. Song¹

Cheonan Yonam College

SUMMARY

This experiment was carried out to investigate the effects of saccharide in the lactose-egg yolk(LEY) extender for freezing of boar semen on the viability, normal acrosome, fertilizable of *in vitro* or *in vivo* oocyte after thawed. Normal acrosome post-thawed spermatozoa was higher when increasing of glucose concentration in LEY extender with 3 or 4% glycerol, but viability was not significant. Viability of the post-thawed spermatozoa was higher when fructose or fructose and glucose were added to LEY extender with 3% glycerol than glucose and sucrose or fructose, glucose and sucrose($P<0.05$). Rate of normal acrosome of post thawed spermatozoa was higher when both fructose and glucose(81.4±2.3%) were added to the LEY extender than saccharide not added(41.6±0.6%) to it($P<0.001$). The percentage of fertilization, cleavage and development to blastocyst of oocytes fertilized with post-thawed spermatozoa from freezing by LEY extender were 70.8~80.7%, 44.6~45.7 and 13.6~16.0%, respectively. Conception rate by artificial insemination with frozen boar semen was higher(83.1±0.3%) than commercial frozen semen from SGI company(50.0±0.1%, $P<0.05$), but litter size were no significant differences between frozen by LEY extender(9.4±1.7~10.4±0.7head/sow) and SGI semen(8.0±1.1head/sow).
(Key words : boar semen, freezing of semen, LEY extender, saccharide, insemination)

서 론

동결보존한 돼지정액을 이용한 인공수정 기술을 성공적으로 정착시키기 위해서는 돼지정액의 동결방법, 보존액의 개발, 용해액과 용해방법 및 정액의 주입시기 등에 관한 연구가 선행되어야 하며(Reed, 1985), 이러한 요인들의 규명을 위해 그

동안 돼지정자의 동결성과 긴밀한 연관을 맺고 있는 냉각속도 및 냉각 또는 동결시 정자에 있어서의 변화 등에 관한 연구가 진행되어 왔으며(Almlid와 Johnson, 1988; Almlid 등, 1989, Fiser와 Fairfull, 1990), 보존액 또는 희석액에 대해서는 Obando 등(1984), Paquignon(1985) 및 Almlid 등(1989)이 보존액 중 당류 및 동해 방지제가 동결시

¹ 대구대학교(Daegu University)

[†] Correspondence : E-mail : etlab@yonam.ac.kr

정자에 미치는 영향을 조사하여 보존액(Tris-glycerine, BF5)을 개발하였으나, 액상 정액과 비교하여 아직 만족한 결과는 얻고 있지 못하다. 또한 동결정액의 보존형태에 의한 영향을 검토하기 위해 straw 법(Westendorf, 1975), plastic bag 법(Rodriguez-Martinez 등, 1996), maxi-straw 법(Weitze 등, 1987) 등이 개발되었고, 최근에는 flat plastic package 법(Eriksson과 Rodriguez-Martinez, 2000)의 개발과 함께 정자의 생존율과 침체 손상을 최소화시키는 용해온도와 노출시간 등에 대한 연구도 함께 진행되어 왔다(Wilmot, 1977; 川倉 등, 1984). 한편 동결한 돼지정자의 수정능력을 평가하기 위해서는 실질적인 번식성적을 검토하는 것이 바람직하지만 여건이 허락하지 않는 경우에는 동결융해후의 정자생존율(Johnson, 1992; Garner와 Johnson, 1995)과 침체 변화(Maxwell 등, 1997b)를 검토하는 것과 함께 그 동안 개발된 체외수정 기술을 이용한 체외성숙시킨 돼지 난모세포로의 정자 침입율과 배발생을 검토하는 것이 활용되고 있다(Bavister, 1990). 그러나 이러한 방법에도 인공수정을 통한 수태율과 자돈 생산능력을 입증하기에는 부적합하다(Barth, 1992). 즉 동결정자는 생존시간이 짧아 수정부위인 난관팽대부에 도달하는 정자수가 적으며, 수정부위에서 난자의 배란을 기다리지 못하고 짧은 시간내에 사멸되기 때문에 수태율과 산자수가 저조한 것이다. 따라서 Johnson 등(2000)은 동결정액을 이용한 수태율과 산자수를 높이기 위해서는 배란시기에 임박한 시기에 인공수정을 하여 야만 생존시간이 짧은 정자가 배란된 난자를 만나 수정할 수 있는 기회가 제공된다고 하고 있다.

따라서 본 연구에서는 동결보존액에 당류의 첨가가 돼지정자의 동결 융해후에 생존율과 침체에 미치는 영향을 형광염색법으로 확인하고, 체외에서 성숙시킨 돼지난자와의 체외수정율과 배발달 및 인공수정을 통한 수태율과 산자수를 확인하여 돼지 정액의 동결 보존 기술 개발을 위한 기초 자료를 얻기 위해서 실시하였다.

재료 및 방법

1. 정액 채취 및 동결정액 제조

동결을 위한 정액은 천안연암대학 유전자원센터에서 액상 정액 공급을 목적으로 사육하고 있는 종모돈을 이용하여 수압법으로 농후 정액만을 분리하여 채취하고 30℃로 유지시켰다. 채취한 농후 정액을 Table 1의 용액으로 등량 희석하고 25℃로 조절된 원심분리기에서 3,000rpm, 5분간 원심분리후 상층액을 제거하고, Lactose-Egg Yolk(LEY)의 1차 희석액(11% lactose, 20% egg yolk)으로 최종 희석량(2차 희석액 포함)의 1/2량까지 희석하고 5℃로 준비한 방안에서 25℃로 설정한 program 동결기(FHK, ET1N, Japan)에 넣어 냉각준비를 하였다.

2. Glycerol과 당류의 조합에 따른 동결 정액 제조

LEY 1차 희석액으로 희석을 완료한 농후 정액을 90분간에 걸쳐서 25℃에서 5℃까지 냉각을 하였다. 냉각개시후 온도가 18℃에 도달하였을 때, LEY 2차 희석액(LEY 1차 희석액 +1.5% Orvus ES paste)에 glycerol 3 또는 4%와 glucose 0, 15, 31, 62.5 및 125mM, 또는 3% glycerol과 각각 10mM씩의 fructose, glucose, sucrose를 단독 또는 조합)을 최종 희석량의 10%, 13℃, 10℃ 및 8℃로 냉각되었을 때 20%, 30% 및 40%를 첨가하여 정자의 최종농도를 12×10^8 /ml이 되도록 하고, 5℃까지 냉각후 한쪽 끝을 steel ball로 봉인한 5ml의 macrotube straw(Minitube, Germany)에 주사기를 이용하여 주입한 다음, 선단을 color plastic ball로 봉인하고 스티로폼 상자에 준비한 액체 질소 상면 5cm에서 20분간 두어 예비동결을 시켰고, 이어서 액체질소 중에 침지시켜 동결을 완료하였다.

3. 정액의 융해 및 생존율, 침체 검사

동결보존한 정액을 47℃의 온수에서 10초간 녹

Table 1. Composition of semen washing solution

Reagents	Amount(g/ℓ)
Glucose	60.0
Sodium citrate	3.75
NaHCO ₃	1.20
EDTA-2Na	3.70
Streptomycin	1.0
Penicillin G	100만 단위



Fig. 1 Live(green) and red spermatozoa stained by SYBR-14 and PI.

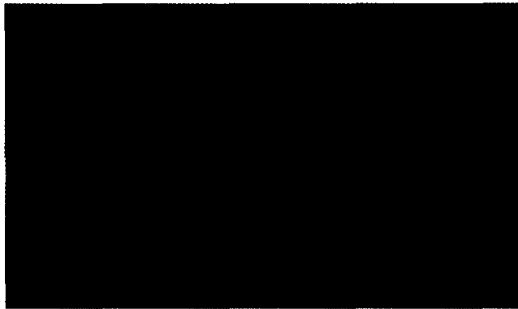


Fig. 2 Intact acrosome stained by FITC-PSA and PI.

인 다음, 35℃로 가온하여 준비한 NTS-1액으로 20배 희석하였다. 생존율과 침체검사는 Maxwell과 Johnson(1997)의 방법에 준하여, NTS-1액으로 희석한 정액 500 μ l를 1.5ml의 tube에 담고, 여기에 SYBR-14(Molecular Probe, USA, L-7011) 5 μ l (0.1mM)와 Propidium Iodide(PI) 3 μ l (2.4mM)을 각각 첨가하고 암실의 상온에서 20분간 방치하여 형광염색을 실시한 다음, 암실에서 염색한 정액 10 μ l를 무형광 slide glass에 올리고 cover glass를 덮은 다음, 형광현미경하에서 400배율로 200개의 정자를 관찰하여 녹색과 적색으로 염색된 정자를 계산하고, 녹색으로 염색된 정자는 생존한 것으로, 적색으로 염색된 것은 사멸한 정자로 하여 생존율을 계산하였다(Fig. 1). 침체 검사는 용해하여 희석한 정액 30 μ l를 무형광 slide glass에 도말하고 상온에서 건조시킨 후, 2분간 0℃의 methyl alcohol에 침지하여 고정하고, 다시 상온에서 건조하였다. 건조된 도말 sample에 150 μ l의 FITC-PSA(Sigma, L-0770)와 2.4mM의 PI 75 μ l를 각각 떨어뜨리고 그 위에 투명 필름을 덮어 염색액이 slide glass 전체

에 퍼지도록 하고 암실에서 20분간 염색을 하였다. 염색이 종료된 후, 투명필름을 제거하고 증류수에 10분간 침지시켜 탈염색하고 풍건시킨 다음, 다시 antifading solution을 50 μ l 떨어뜨리고 slide glass와 같은 크기의 cover glass를 덮어 압착시킨 다음, 형광현미경하에서 1,000배율로 200개의 정자를 관찰하여, 노란색으로 염색된 침체가 적색으로 염색된 두부에 밀착한 정자만을 정상적인 침체로 하고, 나머지는 손상된 침체로 판단하였다(Fig. 2).

4. 동결 정액의 체외수정능력 평가

도축장에서 채취한 돼지난소를 25℃의 생리식염수에 담아 실험실로 옮겨서 직경 2~5mm의 난포에서 난자를 채취하고 1.0 μ g/ml의 estradiol, 10IU/ml의 hCG와 PMSG 및 10%의 돼지난포액을 포함한 NCSU-23액(Petters와 Wells, 1993)에 넣어 38.5℃, 5% CO₂ 조건하에서 40~42시간 동안 성숙배양을 하였다. 성숙배양이 완료된 난자를, 동결보존한 정액을 47℃에서 10초간 용해시킨 다음, 수정용 용액(mTBM+1mM caffeine+1.0mg/ml BSA)으로 원심분리하여 세척하고 1 \times 10⁵마리, 5 \times 10⁵마리 및 1 \times 10⁶마리/ml로 조절하여 준비한 정자 drop에 넣어 6시간 공배양하여 수정을 시켰다. 수정완료후 20시간에 일부 난자를 orcein 염색하여 정자 침입율에 의한 수정율을 조사하고, 나머지의 난자는 주변의 난구세포와 정자를 제거하고 NCSU-23액에 BSA (4.0mg/ml)를 첨가한 배양액에서 배양을 하였으며, 수정후 48시간, 72시간 및 144시간에 분할율, 6~8세포기 및 배반포배로의 발달율을 조사하였다.

5. 동결정액의 인공수정 및 임신진단

인공수정을 위한 정액은 LEY에 3% glycerol + 30mM fructose와 4% glycerol+15mM fructose를 첨가한 보존액으로 동결보존한 정액을 47℃에서 10초간 용해후 37℃로 가온하여 준비한 NTS-1 용액으로 20배 희석하여 준비하고, 암컷 중 발정개시 후 28~32시간에 1차, 1차 수정후 6시간에 2차 수정을 실시하였다. 대조구로서 미국의 SGI사에서 수입한 정액을 동일한 조건으로 인공수정을 실시하였다. 인공수정후 25일째에 화상임신진단기를 이용하여 수태 여부를 확인하고, 화상에 나타난 수

를 확인하여 산자수를 결정하였다.

6. 통계처리

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

결과 및 고찰

1. Glycerol과 당류의 조합이 정자의 생존율과 침체에 미치는 영향

LEY에 glycerol과 당류를 첨가하여 돼지정액을 동결보존하는 것이 용해후의 생존율과 정상침체율에 미치는 영향을 검토하기 위해서 3 또는 4%의 glycerol을 첨가한 LEY에 0, 15, 31, 62.5 및 125mM의 glucose를 첨가한 것으로 동결용해 한 결과는 Table 2와 같으며, 3%의 glycerol을 첨가한 LEY에 10mM의 fructose, 10mM씩의 fructose와 glucose, glucose와 sucrose 및 fructose, glucose, su-

crose를 첨가하여 동결용해한 결과는 Table 3과 같다. 생존율은 glycerol 농도와 관계없이 glucose 농도가 증가함에 따라 저하되거나 효과가 인정되지 않았으나, 정상침체율에 있어서는 glucose 농도의 증가와 함께 증가되어, Wilmut와 Polge(1977b)이 돼지정액 동결보존액에 당류를 첨가하면 정자의 생존율은 저하되지만 정상 침체율은 증가한다고 보고한 결과와 일치하였다.

3%의 glycerol을 첨가한 LEY에 다양한 당류를 첨가한 것으로 동결하였을 때, 용해후의 생존율에 있어서는 fructose를 단독 또는 fructose와 glucose를 함께 첨가한 구가 다른 구에 비하여 유의하게 높았으며($p<0.005$), 정상침체율에 있어서는 fructose와 glucose를 첨가한 구가 control 또는 다른 조합의 당류 첨가구에 비하여 유의하게 높았다($p<0.001$). 이러한 결과는 당류, 특히 fructose는 정자의 동결과정중 정자세포내로의 동해방지제의 침투속도를 조절하여 정자세포내의 소기구를 보호하는 작용을 하여 정자의 생존율을 개선하는 효과가

Table 2. Effects of glucose concentrations with 3% or 4% glycerol in LEY extender on the sperm viability and normal acrosome of post thawed frozen boar semen(mean±SE)

Glycerol	Items	Concentration(mM) of glucose				
		0	15	31	62.5	125
3%	Viability*	55.7±5.3 ^a	39.2±2.1 ^b	50.7±2.3 ^a	51.5±2.7 ^a	50.2±0.2 ^a
	Normal acrosome*	41.6±0.6 ^c	70.4±4.3 ^a	66.1±4.2 ^a	73.5±5.2 ^a	60.6±4.8 ^b
4%	Viability*	51.2±0.8 ^a	51.6±3.9 ^b	40.3±7.0 ^a	51.9±4.3 ^a	33.2±7.0 ^a
	Normal acrosome*	55.4±0.8 ^c	53.8±1.6 ^a	58.6±1.1 ^a	59.1±1.0 ^a	61.6±2.1 ^b

Different superscripts within the same column indicate significant difference at $P<0.001$ (*).

Table 3. Effects of combinations of saccharides in LEY extender on viability and normal acrosome of post thawed frozen boar semen

	% of mean±SE*					
	Control	Fruc	Fruc + Glu	Fruc + Suc	Glu + Suc	Fru + Glu + Suc
Viability*	55.7±5.2 ^{ab}	60.0±4.6 ^a	60.5±1.5 ^a	55.2±5.6 ^{ab}	44.6±3.1 ^b	44.0±4.6 ^b
Normal acrosome**	41.6±0.6 ^c	67.8±3.6 ^{ab}	81.4±2.3 ^a	70.1±5.2 ^{ab}	76.0±3.5 ^a	54.5±9.4 ^{bc}

Different superscripts within the same column indicate significant difference at $P<0.05$ (*) or $P<0.001$ (**). Fruc; Fructose, Glu; Glucose, Suc; Sucrose.

있기 때문이라고 추측된다. Visser와 Salamon(1973)도 fructose가 glucose보다 효과적으로 정자를 보호하며, 첨가되는 당의 농도에 의해 정자 보호 능력에 차이가 인정되며(Salamon 등, 1973a; Wilmut와 Polge, 1977b), maltose의 농도가 증가되면 정자의 생존율은 저하되지만 정상 침체율은 증가한다고 보고하고 있다. 이러한 것으로 보아 돼지 정액을 동결 보존할 때, 희석액에 첨가하는 당은 그 종류에 따라 보존액 및 세포내의 삼투압 조절능력 또는 막 투과성 조절 능력이 다르며, 이러한 능력은 정자의 세포막을 포함한 정자 내부 세포 물질의 보호에 효과적으로 작용한다고 할 수 있어, 앞으로 다양한 당류 및 그 조합 또는 첨가 농도에 대한 검토가 필요하다고 할 수 있다.

2. 동결정액의 체외수정능력

NCSU-23액으로 성숙시킨 돼지 난자를 이용하여 LEY액으로 동결보존한 정자의 체외수정 능력을 검토한 결과는 Table 4와 같다. 응성 전핵 형성에 있어서는 정자농도 및 동결희석액에 관계없이 70.8~80.7%로 나타났다. Nagai 등(1988)은 체외 성숙시킨 난자를 정소상체로부터 얻은 동결보존한 정자와 수정시켜 42%의 수정율을 얻었다고 보고하고 있어, 정자의 유래는 다르지만 본 실험이 높은 수정율을 얻었다. 또한 Abeydeera와 Day(1997a)는 동결융해한 정자의 농도를 본 실험과 같은 농도인 1×10^5 , 5×10^5 및 1×10^6 /ml로 하여 체외수정을 실시한 결과, 수정율이 39.9±5.2%, 83.5±4.3% 및 86.9±3.1%로 농도간의 유의한 성적을 얻었다고 보

고하고 있으나, 본 실험에서는 그 차이가 인정되지 않아 이러한 차이가 생긴 것은 아마도 정자의 활력과 정상 침체율에 영향을 미치는 희석액의 종류, 동결방법 및 융해방법이 다르기 때문이라고 생각된다.

수정후 분할율, 8~16세포기배 및 배반포배로의 발생율은 각각 44.6~45.7%, 23.8~28.0% 및 13.6~16.0%로 나타나, 수정율과 같이 농도간과 희석액에 따른 유의한 차이가 인정되지 않았으며, 이러한 결과는 Abeydeera와 Day(1997a)가 보고한 40.1±3.6%, 19.0±1.8%의 분할율과 배반포배로의 발달율과 일치하고 있으며, Yoshida 등(1990), Funahashi와 Day(1993) 및 Rath 등(1995)이 돼지 정자의 수정능력을 체외성숙시킨 난자와의 수정을 통하여 수정율과 배 발생능력을 검토하는 방법으로 판단하고 있어, 실험실적인 동결보존한 돼지정자의 수정능력 판단방법으로 체외수정 기술이 유용할 수 있다.

3. 인공수정 및 임신진단

체외수정 기술을 이용하여 정자의 수정능력을 판단하기 위해 사용한 동일한 정액을 이용하여 암컷의 1회 발정에 2회의 인공수정을 실시하여 얻은 수태율과 복당 산자수는 Table 5와 같으며, 상용화되어 있는 SGI사의 동결정액과의 비교에 있어서, 수태율은 83.3±0.1%로 유의하게 높았으며($p < 0.05$), 분만전 화상 임신 진단에서 확인된 평균 산자수에서도 유의한 차이는 인정되지 않았으나 9.4±1.7~10.4±0.7두로서 SGI사의 8.0±1.1두보다 높았고,

Table 4. Effects of sperm concentrations on fertilization and embryo development of *in vitro* fertilized porcine oocytes

Source	Sperm concentrations(ml)	MPN*(%)	Develop to(%)		
			Cleaved	8~16 cell	Blastocyst
3% glycerol + 30mM fructose	1×10^5	60/80(75.0)	58/130(44.6)	35/130(26.9)	19/130(14.6)
	5×10^5	58/75(77.3)	56/125(44.8)	35/125(28.0)	20/125(16.0)
	1×10^6	67/83(80.7)	66/141(46.8)	38/141(26.9)	22/141(15.6)
4% glycerol + 15mM fructose	1×10^5	46/65(70.8)	36/ 80(45.0)	19/ 80(23.8)	11/ 80(13.6)
	5×10^5	44/58(75.9)	35/ 78(44.9)	19/ 78(24.4)	12/ 78(15.4)
	1×10^6	48/61(78.7)	37/ 81(45.7)	20/ 81(24.7)	13/ 81(16.0)

Table 5. Fertility results of AI by frozen boar semen(Mean±SE)

Sources of frozen semen	No. of sows	Conception rate(%)*	No. of piglets/sow
Commercial(SGI)	16	50.0±0.1 ^b	8.0±1.1
3% glycerol + 30mM fructose	6	83.3±0.1 ^a	9.4±1.7
4% glycerol + 15mM fructose	6	83.3±0.1 ^a	10.4±0.7

Different superscripts within the same column indicate significant difference at $P<0.05$ (*).

Jonson(1985)이 보고한 평균 산자수 7.5두보다도 높았다. 그러나 액상 정액과 비교하여 인공수정에 있어서 수태율과 평균 산자수가 낮으므로 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 동결을 위한 희석액의 개발과 냉각속도 및 동결정자의 생존시간을 고려한 정확한 수정적기의 판정 등에 관하여 더 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

적 요

본 실험은 LEY에 다양한 당류를 첨가한 용액으로 동결보존한 돼지정자의 용해후 생존율과 정상 침체율, 체외성숙한 난자와의 수정능력과 배 발달 능력 및 인공수정을 통한 수태율과 산자수에 미치는 효과를 조사하기 위해 실시하였다. 용해후의 정상 침체율은 glucose 농도 증가와 함께 증가되었으나, 생존율에 있어서는 효과가 인정되지 않았다. LEY에 fructose를 단독 또는 glucose와 함께 첨가하면 용해후의 생존율이 유의하게 증가되었으며 ($p<0.05$), 정상 침체율에 있어서는 LEY 보존액에 fructose와 glucose를 첨가한구가 81.4±2.3%로 control의 41.6±0.6%에 비하여 유의하게 높았다 ($p<0.001$). 체외성숙 난자와의 수정율, 분할율 및 배반포 발생율은 70.8~80.7%, 44.6~45.7% 및 13.6~16.0%로 glycerol과 fructose 농도 및 정자농도 간에 차이가 인정되지 않았다. 1회 발정당 2회의 인공수정을 하였을 때, 수태율은 83.3±0.1%, 산자수는 9.4±1.7~10.4±0.7두로서 SGI사의 동결정액의 50.0±0.1%($p<0.05$)과 8.0±1.1두에 비하여 높았다.

참고문헌

Abeydeera LR and Day BN. 1997a. *In vitro* pene-

tration of pig oocytes in a modified Tris-buffered medium: Effect of BSA, caffeine and calcium. *Theiogenology*, 48:537-544.

Almid T, Clarke VG, Pursel VG and Johnson LA. 1989. Effectiveness of *in vitro* methods for predicting *in vitro* fertilizing capacity of boar spermatozoa cryopreserved with 2% or 4% glycerol. *Zuchthygiene*, 24:8-15.

Almid T and Johnson LA 1988. Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa in straws. *J. Anim. Sci.*, 66:2899-2905.

Barth AD. 1992. The relationship between sperm abnormalities and fertility. In: Proc 14th Tech Conf Artif Insem and Reprod. Nat. Assoc. Anim. Breeders, Columbia, Missouri. p. 47.

Bavister BD. 1990. Test of sperm fertilizing ability. In: Asch RH, Balmaceda JP, Johnson I(eds), *Gamete Physiology*. Sero Symposia, USA pp. 77-705.

Eriksson BM and Rodriguez-Martinez H. 2000. Export of frozen boar semen in a new flat package. 4th Int. Conf. Boar semen preservation, p. 244.

Fiser PS and Fairfull RW. 1990. Combined effect of glycerol concentration and cooling velocity on motility and acrosomal integrity of boar spermatozoa frozen in 0.5 ml. straws. *Mol. Reprod. Dev.*, 25:123-129.

Funahashi H and Day BN. 1993. Effect of the duration of exposure to supplemental hormones on cytoplasmid maturation of pig oocytes in

- vitro*. J. Reprod. Fertil., 98:179-185.
- Garner DL and Johnson LA. 1995. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. Biol. Reprod., 53:276-284.
- Johnson LA. 1985. Fertility results using frozen boar spermatozoa: 1970 to 1985. 1st Int. Conf. on Deep Freezing of Boar Semen. Swedish Univ. Agric. Sciences, Uppsala. pp. 199-222.
- Johnson LA. 1992. Gender preselection in swine: Altered sex ratios in offspring following surgical insemination of flow sorted X- and Y-bearing sperm. Reprod. Dom. Anim., 26:309-314.
- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P and Maxwell WMC. 2000. Storage of boar semen. Anim. Reprod. Sci., 62:143-172.
- Maxwell WMC and Johnson LA. 1997b. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. Theriogenology, 48:209-219.
- Nagai T, Takahashi H, Masuda Y, Shioya M, Kuwayama M, Fukushima M, Iwasaki S and Hanada A. 1988. *In vitro* fertilization of pig oocytes by frozen boar spermatozoa. J. Reprod. Fertil., 84:585-591.
- Obando H, Tamayo T and Alvaro C. 1984. Evaluation of some factors affecting swine spermatozoa during freezing. Xth Intern. Cong. Anim. Reprod. AI. Ubana, II, 193.
- Paquignon M. 1985. Freezing and thawing extenders for boar spermatozoa. In: Deep freezing of boar semen. Proc. 1st Int. Con. Deep Freez. Boar Semen. Uppsala. p:129-145. Eds. Johnson, L.A. and Larsson, K. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Petters RM and Wells KD. 1993. Culture of pig embryos. J. Reprod. Fertil., 48:(Suppl)61-73.
- Rath D, Niemann H and Tao T. 1995. *In vitro* maturation of porcine oocytes in follicular fluid with subsequent effects on fertilization and embryo yield *in vitro*. Theriogenology, 44:529-538.
- Reed HCB. 1985. Current use of frozen boar semen future need of frozen boar semen. In: Deep freezing of boar semen. Proc. 1st Int. Con. Deep Freez. Boar semen. Uppsala. p:225-237. Eds. Johnson, L.A. and Larsson, K. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Rodriguez-Martinez H, Eriksson B and Lundeheim I. 1996. Freezing boar semen in flat plastic bags. Membrane integrity and fertility. In: Rath, D., Johnson, L.A. and Weitze, K.F.(Eds). Boar Semen Preservation III. Proc. 3rd Int. Conf. Deep Freezing Boar Semen. Reprod. Dom. Anim. 31 Blackwell, Berlin. pp. 161-168 (Suppl. 1).
- Salamon S, Wilmut I and Polge C. 1973a. Deep freezing of boar semen. I. Effects of diluent composition, protective agents and method of thawing on survival of spermatozoa. Aust. J. Biol. Sci., 26:219-230.
- Visser D and Salamon S. 1973. Fertility of ram spermatozoa frozen in a trisbased diluent. Aust. J. Biol. Sci., 26:513-516.
- Westendorf P, Richter L and Treu H. 1975. Zur Tiergefrierung von Ebersperma: Labor und Besamungsergebnisse mit dem Hulsenberger Pailleten Verfahren. Dtch. tierarztl. Wschr., 82: 261-267.
- Wilmut I and Polge C. 1977a. The low temperature preservation of boar spermatozoa. 1. The motility and morphology of boar spermatozoa frozen and thawed in the presence of permeating protective agents. Cryobiology, 14:471-478.
- Wilmut I and Polge C. 1977b. 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.
- Weitze KF, Rath D and Baron G. 1987. Neue Aspekte der Tiefgefrierkonservierung von Ebersperma in Plastikrohren. Dtsch. tierarztl. Wschr.,

94:485-488.

Yoshida M, Ishizaki Y and Kawagishi H. 1990. Blastocyst formation by pig embryos resulting from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. J. Reprod. Fertil., 88:1-8.

川倉一彦, 副島昭彦, 田博司. 1984. Straw법에 의한 돼지정액의 동결보존. 일본가축인공수정연구지. 6:61-64.

(접수일: 2004. 12. 20 / 채택일: 2005. 2. 1)