

보존 기간이 돼지 액상정액의 운동역학 및 수정능 획득에 미치는 영향

박유진¹ · 송원희¹ · 김연희¹ · E. A. Mohamed¹ · 오신애¹ · 방명걸^{1,2,*}

¹중앙대학교 산업과학대학 동물자원과학과, ²중앙대학교 생명환경연구원

Effect of Storage Times on the Kinematics and Capacitation Status in Liquid Boar Semen

Yoo-Jin Park¹, Won-Hee Song¹, Yeon-Hee Kim¹, E. A. Mohamed¹, Shin-Ae Oh¹ and Myung-Geol Pang^{1,2,*}

¹Department of Animal Science and Technology, Chung-Ang University, Gyeonggi-Do 456-756, Korea

²BET Research Institute, Chung-Ang University, Gyeonggi-Do 456-756, Korea

ABSTRACT

The objective of this study was to estimate modification of semen quality during storage. Liquid boar semen samples extended in Beltsville Thawing Solution were stored at 17°C up to 5 days. While % motility and linearity significantly decreased from day 3 in extender, the qualitative motility patterns were maintained satisfactorily. Also the storage of boar semen up to 5 days before insemination did not significantly changed the acrosome intactness. However, acrosome changed sperm significantly increased and capacitated sperm significantly decreased from day 4. No significant modifications in acrosome integrity were showed during sperm storage; these results suggest that liquid boar semen may keep the quality in extender for 3 days.

(Key words : Acrosome integrity sperm motion kinematics, Semen storage)

요 약

본 연구는 정액의 보존 기간 동안 정액의 질적 변화를 알아보고자 시행하였다. 돼지 정액을 Beltsville Thawing Solution (BTS)에 희석한 후 17°C에서 5일 동안 보존하였다. 보존 기간 동안 정자의 운동성(%)과 linearity는 3일째부터 유의하게 감소하였으나, 다른 운동 역학 변수에서는 유의적 변화를 나타내지 않았다. 또한, 5일 동안 정액을 보존할 경우 침체의 온전성에도 변화가 없었다. 그러나 제 4일째부터 침체 변화가 야기된 정자는 유의적으로 증가하였으나, 수정능 획득이 일어난 정자는 유의적으로 감소하였다. 정액의 보존 기간 동안 침체의 온전성의 유의적 변화가 없었다. 즉, 보존 기간 3일 동안 정자의 질적 운동성 및 침체 온전성에는 유의적인 변화가 없었으므로 상업용 돼지 액상정액은 17 °C에서 적어도 3일간 수정능력을 만족스럽게 유지함을 보여준다.

서 론

돼지의 인공수정은 오래전부터 시행되어 왔으며, 액상 정액을 이용한 인공수정은 최근 15년 간 약 3배 정도 급격하게 증가하였다. 세계적으로 약 1천 9백만 농가 중 99% 이상이 액상정액을 사용하고 있다. 이러한 액상정액들은 15~20°C에서 채취 후 5일까지 보존하여 사용하고 있다(Johnson 등, 2000). 액상정액을 이용한 인공수정 시 직접 교배를 시킬 때보다 적은 정자로 임신을 시킬 수 있으며, 정자의 수정 능력을 며칠 동안 유지할 수 있다는

장점이 있다(Clarke과 Johnson 1987; Vishwanath과 Shannon, 1997). 또한, 인공수정을 이용할 때, 전염병 예방과 고 능력 종돈군의 유전적 개량 효과 증대, 수태율 향상 및 종모돈의 능력 검정 효과를 극대화 할 수 있다.

그러나 보존 기간 동안 액상정액의 수정 능력은 점차적으로 상실되기 때문에(Huo 등, 2002) 인공수정 시 약 85 % 정도의 정액을 채취 당일이나 다음날 사용하고 있으며(Johson 등, 2000), 이러한 잦은 정액의 공급을 위한 경제적 손실이나 외부인의 농장 출입으로 질병의 유입 등의 문제점이 부각되고 있다. 또한, 정액의 질에 따라서 수태율과 산자 수에 큰 영향을 주기 때문에(Sutkeviciene

* 이 논문은 2007년도 중앙대학교 학술연구비(일반연구비) 지원에 의한 것임.

† Corresponding author : Phone: +82-31-670-4841, E-mail: mgpang@cau.ac.kr

와 Anderson, 2005), 보존 기간 동안 액상정액의 질, 즉 수정능력 유지가 매우 중요하다(Huo 등, 2002).

그러나 대부분 현장이나 실험실에서 사용되고 있는 인공수정용 정액의 질적 평가 방법은 시간과 비용의 소모가 크며, 실험 방법이 매우 까다로운 것이 큰 문제점이다. 따라서 여러 실험실에서는 비용을 절약할 수 있으며, 빠른 시간 내에 정확한 평가를 할 수 있는 방법을 통하여 정액의 보존 기간을 설정함으로써 인공수정 센터와 농가의 안정적인 생산 수급에 도움을 줄 방안을 모색하여야 한다.

수정 능력을 객관적으로 평가하는 방법으로 정자의 운동성을 객관적으로 관찰할 수 있는 computer-assisted sperm analyzer (CASA)가 1980년 후반부터 개발되어 현재 까지 사용되고 있다. 정자의 운동경로를 화면상에 표시하며, 정자의 기능과 정액의 특성을 측정하는데 이용되고 있다(Holt 등, 2007). CASA를 이용한 정자의 특정 운동역학 변수와 수정 능력 간에 밀접한 관련이 있음이 보고되었고(Hirai 등, 2001), 정자의 운동성(% motility, MOT)과 정액 내 정자의 농도, 곡선 운동 속도(curvilinear velocity, VCL), 직선 운동 속도(straight line velocity, VSL), 평균 경로 속도(average path velocity, VAP), 선형도(linearity LIN) 그리고 평균 이동 경로와 실제 이동 경로와의 측방거리차인 측두 이동 거리(mean amplitude of head lateral displacement, ALH) 등을 포함한 정자의 특성은 자궁점막 내 침투성(cervical mucus penetration)으로 측정된 수정 능력과 밀접한 관계가 있다(Aitken 등, 1982c).

수정능 획득 및 침체 반응 시 칼슘 이온이 작용하는데, 정자 두부 특정 부위 내에 칼슘 이온의 존재를 antibiotic chlorotetracycline (CTC) 형광 물질로 측정하는 CTC 방법이 개발되었으며 (Fraser 등, 1995), Kommisrud (2002) 등은 이 CTC 방법을 이용하여 수정능 획득 및 침체 반응과

수정 능력간의 관계를 보고하여 CTC를 이용한 정액 질에 대한 평가 가능성을 제시한 바 있다.

또한, 현재 가장 많이 사용되고 있는 Beltsville Thawing Solution (BTS)은 단기보존 희석액으로써 돼지 정액 보존 시 사용되며(Dube 등, 2004), 보존 기간 동안 정액의 운동성을 유지시켜준다(Estienne 등, 2007).

본 연구에서는 BTS를 사용하여 5일 동안 정액을 보존하였으며, 보존 기간 동안 정자의 운동성, 운동 역학, 침체막 변화를 각각 CASA와 CTC 방법을 이용하여 측정하였으며, 이 결과를 이용하여 인공수정에 사용하는 액상 정액의 적절한 보존 기간을 설정하고자 하였다.

재료 및 방법

정액의 수집

공시 종모돈은 (주)다비육종에서 보유하는 요크셔와 듀록 종으로 각각 다른 37두를 공시하였고, 희석액은 BTS를 사용하였다. 5일 동안 17°C에서 보존 시에 운동성, 운동역학 및 침체막 변화 양상을 관찰하였다.

CASA를 이용한 운동성 측정

보존된 정액을 39°C, 2분간 배양한 다음, 10 µl의 정액 샘플을 39°C로 가열된 Makler chamber에 올린 후 CASA를 이용하여 운동성(%) 및 운동 역학 변수를 측정하여 보존 기간 동안 정자의 운동성 변화 양상을 조사하였다. 정자의 운동 역학 변수 측정에 대한 각 항목의 정의는 Table 1과 같다.

CTC Staining을 이용한 침체막의 변화 측정

Table 1. Definition of chosen motility descriptions

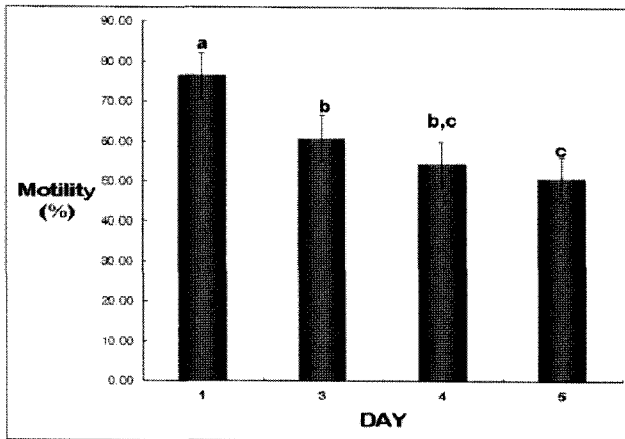
Name	Units	Description
Curvilinear velocity (VCL)	µl/s	Time-average velocity of sperm head along its actual curvilinear trajectory as perceived in two dimensions under the microscope
Straight-line velocity (VSL)	µl/s	Time-average of a sperm head along the straight line between its first detected position and its last position
Average path velocity (VAP)	µl/s	Time-average velocity of a sperm head along its spatial average trajectory
Linearity (LIN)	%	VSL/VCL
Mean amplitude of head lateral displacement (ALH)	µl	Mean head displacement along its curvilinear trajectory around the mean trajectory

Table 2. Definition of sperm membrane pattern by CTC staining

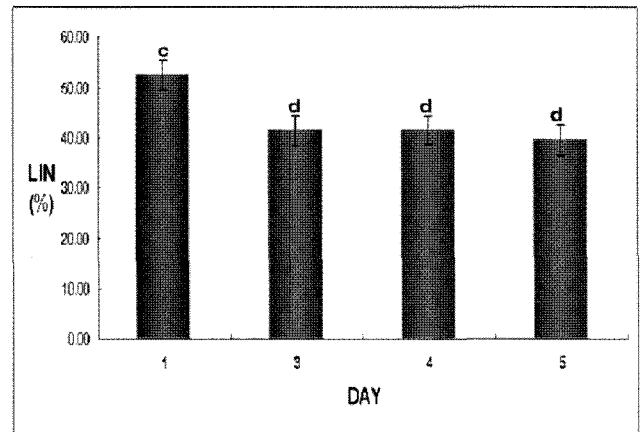
Pattern	Description
F	Full fluorescence characteristic of ejaculated spermatozoa: Characteristic of uncapacitated sperm
B	Banded-indicative of capacitated spermatozoa and fluorescence only in the post acrosomal region: Characteristic of capacitated sperm
AR	Typical acrosome reacted spermatozoa

침체막의 변화 양상을 측정하기 위하여 CTC 염색법을 사용하였으며, 이 방법으로 정자의 수정능 획득과 침체막 변화 양상을 조사하였다. 액상 정액을 400 g에서 10분

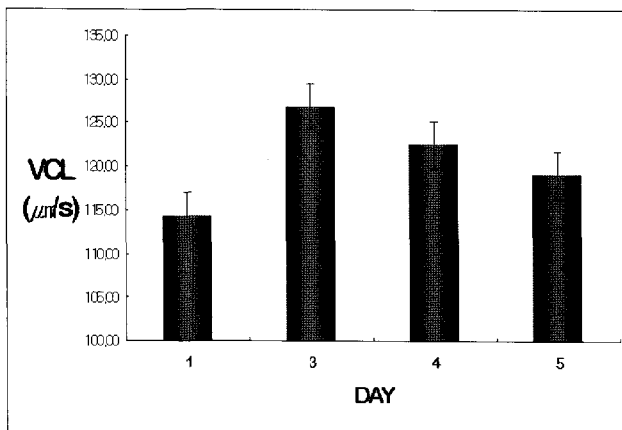
간 1회 원심분리하여 세척하였다. 정자의 생사 판정을 위해 1 ml 정액 샘플에 15 μ l Hoechst33258 (H33258; 100 μ l/ml in PBS)와 135 μ l PBS를 첨가 후 38°C에서 10분



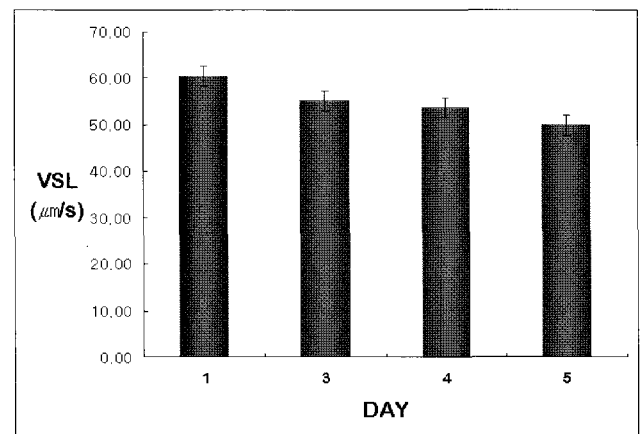
(a)



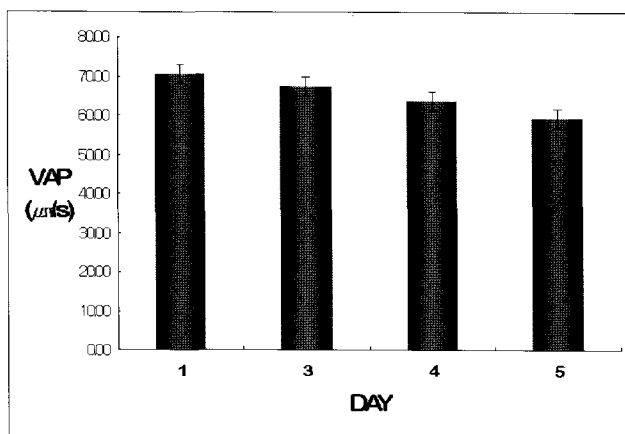
(b)



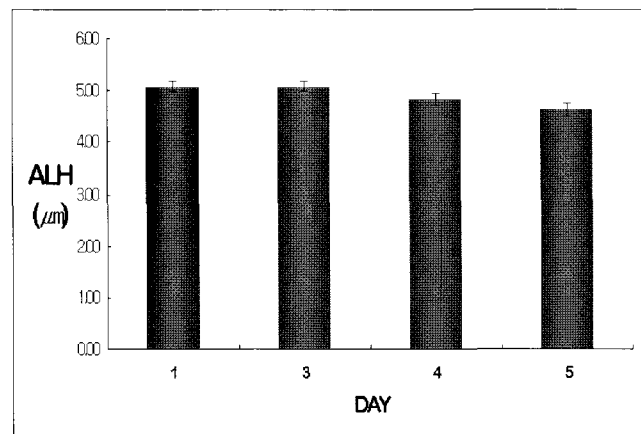
(c)



(d)



(e)



(f)

Fig. 1. Sperm motility (%) and kinematic assessment using CASA during 5-day storage. (a) MOT (%), (b) LIN (%), (c) VCL (μ /s), (d) VSL (μ /s), (e) VAP (μ /s), and (f) ALH (μ m) assessment using CASA. ^{a,b,c} values with different superscripts in sperm motility differ significantly ($p < 0.05$). ^{cd} values with different superscripts in LIN differ significantly ($p < 0.05$).

간 배양하였다. 이 후 암실에서 250 μ l의 2% polyvinylpyrrolidone-40 (PVP-40 in PBS)을 첨가하고, 400 g에서 10분간 원심분리를 실시하였다. 상층액을 제거한 후 500 μ l CTC 용액(750 μ M CTC, 130 mM NaCl, 5 mM cystein in 20 mM Tris buffer; pH 7.8)과 500 μ l PBS를 혼합하여 20초간 암실에서 상온배양하였다. CTC의 반응을 고정시키기 위하여 10 μ l의 12.5% glutaldehyde solution (in 0.5 M Tris-buffer; pH 7.4)을 첨가하였다. 염색된 정액은 빛이 차단된 4°C에서 보관하였으며, 염색 후 24시간 이내에 판독하였다. 정자의 침체 막 변화양상의 판독은 Fraser 등(1995)의 분류를 따랐다(Table 2).

통계 분석

통계 분석은 통계분석프로그램 (SPSS Version 12.0)을 이용하였으며, ANOVA를 실시하여 유의성을 검정하였다.

결 과

보존 기간 동안 정자의 운동성(%) 변화

보존 기간 동안 정자의 운동성 변화를 1일, 3일, 4일 그리고 5일 째에 측정을 하였고, 정자의 운동성 변화 양상은 Fig. 1과 같다. 운동성(%)에 있어 1일째에 비교하여 3일째부터 유의한 감소를 나타냈으며($p<0.05$), 시간이 흐름에 따라 4일째와 5일째에도 유의적인 운동성 감소를 보였다($p<0.05$). 그러나 3일과 4일, 그리고 4일과 5일 사이에는 유의적 차이가 나타나지 않았다. LIN의 경우, 운동성(%)와 마찬가지로 1일째에 비교하여 3일째에 유의적인 감소를 하였으나($p<0.05$), 3일, 4일 그리고 5일째 사이의 유의적 차이는 나타나지 않았다. 그러나 운동성과 LIN을 제외한 다른 운동성 항목 즉, VCL, VSL, VAP 및 ALH에 있어서는 정액의 보존 기간 동안 유의적인 변화를 보이지 않았다.

보존 기간 동안 정자의 수정능 획득과 침체막의 변화

보존 기간 동안 제1일, 3일, 4일 그리고 5일 째에 정자의 침체 막 변화를 조사하였고, 정자의 침체 막의 변화 양상은 Fig. 2 및 Fig. 3과 같다. AR pattern은 제 1일째와 비교했을 때 3일째부터 유의적으로 증가하였고, 3일째 이후부터는 유의적으로 증가하지는 않았으며, 정자의 수정능 획득을 나타내는 B pattern은 제 1일 째와 비교했을 때 제 4일 째와 제 5일 째에서 유의성을 나타내며 감소하였다. 반면에 침체막의 온전성을 가진, 즉 수정능 획득이 일어나지 않은 정자, F pattern은 보존 기간 동안 변화하지 않았다. 또한, B pattern과 AR pattern은 제 3일 째와 비교했을 때 제 4일 째부터 유의적으로 증가하였다.

고 찰

일반적으로 정액의 검사는 정자의 운동성 측정과 형태학적인 분석으로 이루어진다. 정자의 수정능력 측정을 위해 정자의 운동성, 정자의 수, 정자 막의 온전성, 정자의

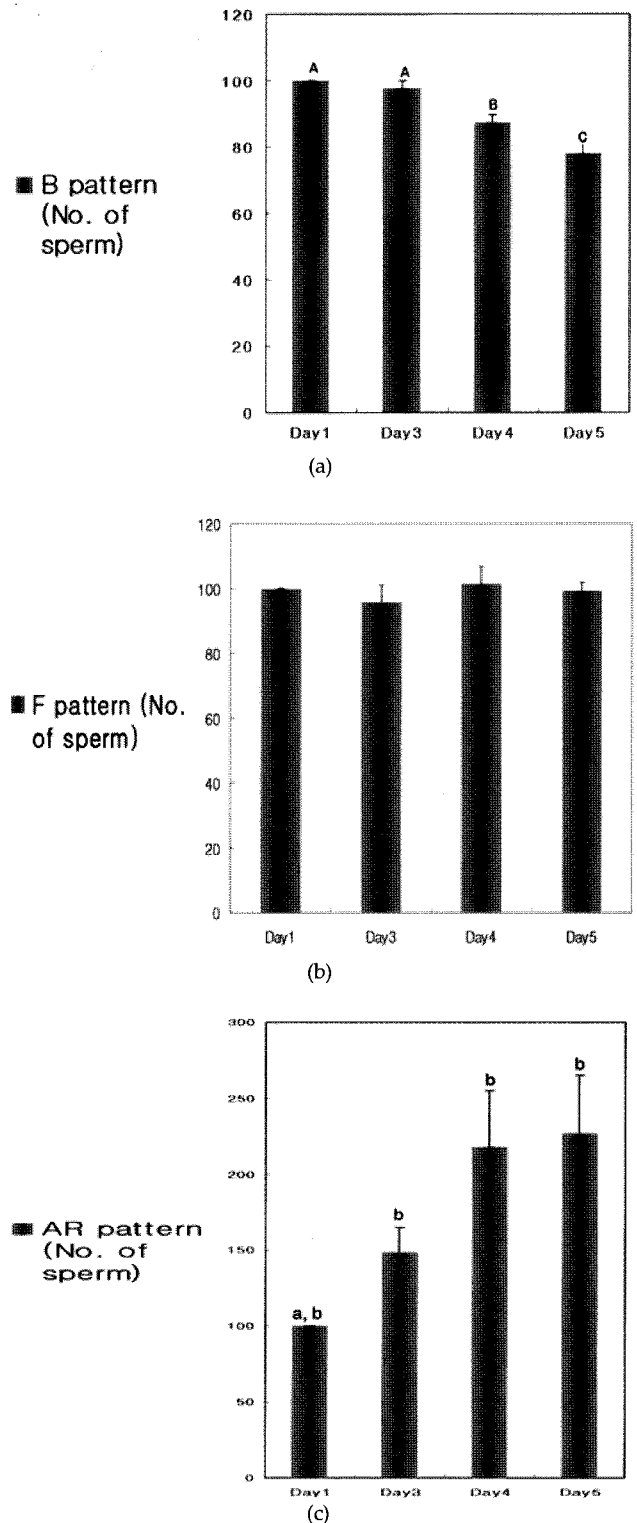


Fig. 2. The average percentages of sperm displaying the various CTC fluorescence patterns during 5-day storage. (a) B pattern, (b) F pattern, and (c) AR pattern assessment using CTC staining. ^{a,b} values with different superscripts in AR pattern differ significantly ($p<0.05$). ^{A,B,C} values with different superscripts in LC differ significantly ($p<0.05$).

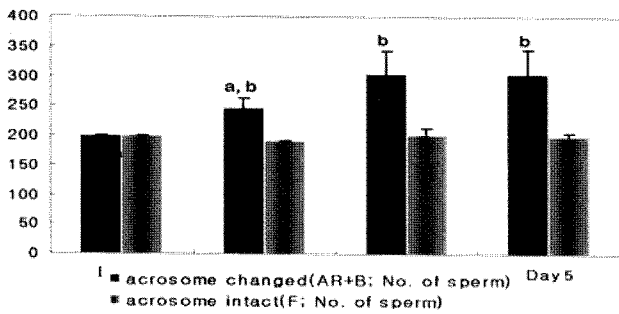


Fig. 3 The acrosome changed and acrosome intact assessment using CTC assay during 5-day storage. ^{a, b} values with different superscripts in acrosome changed (B pattern + AR pattern) differ significantly ($p < 0.05$).

난자 내 침투 능력(Gadea 등, 1998), 침체의 상태검사, 침체 반응, 난관상피세포 부착 반응(Waberski 등, 2005), 정자의 난자 투명대 부착 반응, 정자 염색질 구조 분석(Evenson 등, 1994) 등의 방법이 보고되었다. 또한, 인공수정을 통한 수태율, 분만율, 산자수 등에 관한 분석은 종모든의 수정 능력(fertility)을 평가하는데 있어서 보다 정확한 정보를 얻을 수 있는 유용한 방법이다(Gadea 등, 1998). 하지만 이러한 방법은 시간이 오래 걸리고 비용이 많이 들며 실험기법이 까다롭다는 단점이 있다.

Johnson 등(2000)은 정자의 운동성, 침체 반응 그리고 막의 온전성의 측정을 공통적으로 사용할 경우 정액의 측정에 더욱 신뢰성이 있다고 보고하였다. 정자의 전진운동 (progressive motility)는 대사 작용의 감소나 정자 두부 막의 온전성을 예측하는 척도로 사용된다(Johnson 등, 2000). 그러므로 정자의 운동성 측정은 정액의 질을 측정하는 중요하고도 기본적인 요소가 된다. 더욱이 운동성의 비율은 인공수정 시 사용되는 정액의 양 중 온전한 상태의 정자의 수를 측정하고, 희석 배율을 조절하는데 필수적이다. 또한, Johnson 등(2000)은 보존 기간 동안 정자의 운동성 측정이 각 개체마다 정액의 보존 가능성을 측정하는데 중요한 정보를 준다고 밝혔다. 또한, 이들의 발표 자료에 따르면 돼지 정자의 경우 다른 종에 비해 원운동의 비율이 높으므로 전진 운동을 포함한 여러 가지 운동성의 형태를 다른 포유동물 정자의 운동성 측정법과는 다르게 접근하여야 한다고 제시하였다.

일반적으로 액상 정액을 보존 시 온도나 희석액 또는 저장기간 등의 영향으로 정자의 기능이 달라진다(Johnson 등, 2000). Lee 등(2005)은 미니 돼지 액상정액의 보존 기간 동안 정자의 운동성 및 생존률의 유의적 감소를 보고하였으며, Watson (1990)은 12일 간 BTS에 정액을 희석하여 보존 시 운동성은 유의성이 있게 감소하였지만 6일 이후에는 유의적 감소가 나타내지 않았다고 발표하였다. 그리고 Dube 등(2004)은 BTS내 정자의 생존성은 12일간 관찰하였을 때 95%에서 55%로 감소한다고 나타냈으며, 전진 운동은 보존 기간 동안 현저히 저하하였다(Dube 등, 2004). 또한, Estienne 등(2007)은 VSL, VCL, VAP 등의 전진 운동은 보존 기간 동안 유의적으로 변화하지만, LIN에는 변화가 없었다고 보고하였다. 그러나 본 실험의 결과는 정자의 운동성(%)의 경우, 보존 기간 동안 유의적인 변화를 나타낸 반면, VSL, VAP, VCL, VAP 등의 운동역학 변수에서는 변화가 없었다. 또한 LIN에

있어서 유의적 변화를 보이지 않은 Estienne(2007)의 결과와는 다르게 본 연구에선 시간의 경과에 따른 유의적 감소를 나타냈다. Aitken 등(1982c)은 정자의 운동성의 특징 중 VSL, VAP, LIN 및 ALH는 체내에서 자궁 점막 침투성과 밀접한 관계가 있다고 보고하여 이러한 운동성 양상과 수정 능력 간에 관계를 간접적으로 시사한 바 있다(Aitken 등, 1982c). 본 실험의 결과에 따르면 정자의 보존 기간이 운동성(%)과 LIN에 영향을 주는 것으로 나타났다. 수정 능력과 관계있는 다른 운동역학 변수는 보존 기간의 영향을 받지 않았다. 이는 보존 기간에 의해 정자의 수정 능력이 크게 영향을 받지 않는다는 사실을 시사한다.

정자의 수정능 획득을 측정하기 위하여 대표적으로 사용되는 방법이 CTC 방법이며, CTC에서는 Fraser 등(1995)이 제시한대로 정자를 수정능 획득이 일어나지 않은 F pattern과 수정능 획득이 일어난 B pattern 그리고 침체 반응이 일어난 AR pattern으로 분류한다. Suzuki 등(2003)은 B pattern 정자와 인공수정 시 수정 능력 간에 직접적인 관계가 있으므로 B pattern 정자의 비율이 정액의 질을 판단하는 척도로 사용할 것을 제시한 바 있다. Thomas 등(1997)은 정액의 초기 일정기간 동안의 보존은 정상적인 침체의 모양을 유지하고 있으며, 침체 반응은 수정되기 전에 살아있는 정자에서만 일어난다고 밝혔다. 또한, Thomas 등(1997)은 정자의 수정 능력을 보다 정확히 측정하기 위해서는 침체 반응과 생존 여부 모두를 동시에 판별해야 하며, 특히 CTC/H33258의 염색은 살아있는 정자와 침체 반응을 측정할 수 있는 대표적인 방법이라고 보고하였다.

수정능이 획득된 정자는 난자를 둘러싸고 있는 투명대에 의해 수정되기 전에 침체 반응이 일어나지만(Yanagimachi, 1994), 난자의 투명대와 결합하기 전에 침체 반응이 일어난 정자는 난자의 투명대와 결합에 필요한 중요한 요소를 잃어버리기 때문에 정상적인 수정에 참여할 수 없다(Adeoya-Osiguwa와 Fraser, 2004). Watson (1990)은 액상 정액의 보존 기간에 따라 F pattern은 감소하고, 이에 반해 B pattern은 증가한다고 보고하였으며, Dube 등(2004)은 초기 며칠 동안은 수정능 획득이 일어나지 않고, F pattern을 가진 정자가 일정하게 유지된다고 보고하였다. 또한, Lee 등(2005)은 여러 종류의 희석액에서 미니 돼지 정액을 보관 시 보존시간이 지남에 따라 F pattern이 감소되고, B pattern과 AR pattern이 증가한다고 보고하였다. 대부분의 연구와 대조적으로 이 연구에서 BTS에 희석한 정액을 17°C에서 5일 동안 보존 시 AR pattern은 3일째부터 유의적으로 증가하였고, 3일째부터는 다소 증가하는 양상을 보였다. B pattern은 제 4일 째와 제 5일 째에서 유의적으로 감소하였지만, 침체막이 온전한 수정능 획득이 일어나지 않은 F pattern은 보존 기간 동안 유의성을 나타내지 않았다.

이상의 결과를 요약해 보면, 인공수정 시 사용되는 액상 정액은 보존 3일째까지는 수정 능력에 영향을 주는 운동성(%)과 LIN을 제외한 전진 운동성과 침체막의 유의적인 변화가 없었으므로, 보존 3일째까지는 정자의 수정 능력 변화가 없을 것으로 사료된다. 이는 돼지 희석 정액을 3일 이내에 사용한다면 수정 능력에 유의적인 감소가 없으므로 농가에서 짚은 정액의 구입에 의한 경제적 손실을 줄일 수 있고, 정액배달 시 유입될 수 있는 외부 질병

유입의 가능성이 낮아질 것으로 사료된다.

인용문헌

1. Adeoya-Osiguwa SA, Fraser LR (2005): Cathine and norephedrine, both phenylpropanolamines, accelerate capacitation and then inhibit spontaneous acrosome loss. *Hum Reprod* 20:198-207.
2. Aitken RJ, Best FS, Richardson DW, Djahanbakhch O, Mortimer D, Templeton AA, Lees MM (1982c): An analysis of sperm function in cases of unexplained infertility: Conventional criteria, movement characteristics and fertilizing capacity. *Fertil Steril* 38:212-221.
3. Clarke RN, Johnson LA (1987): Effect of liquid storage and cryopreservation of boar spermatozoa on acrosomal integrity and the penetration of zona-free hamster ova *in vitro*. *Gamete Res* 16:193-204.
4. Dubé C, Beaulieu M, Reyes-Moreno C, Guillemette C, Bailey JL (2004): Boar sperm storage capacity of BTS and androhep plus: viability, motility, capacitation, and tyrosine phosphorylation. *Theriogenology* 62:874-886.
5. Estienne MJ, Harper AF, Day JL (2007): Characteristics of sperm motility in boar semen diluted in different extenders and stored for seven days at 18°C. *Reprod Biol* 7:221-231.
6. Evenson DP, Thompson L, Jost L (1994): Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology* 41:637-51.
7. Fraser LR, Abeydeera LR, Niwa K (1995): Ca²⁺-regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Mol Reprod Dev* 40:233-241.
8. Gadea J, Matás C, Lucas X (1998): Prediction of porcine semen fertility by homologous *in vitro* penetration (hIVP) assay. *Anim Reprod Sci* 54:95-108.
9. Hirai M, Boersma A, Hoeflich A, Wolf E, Foll J, Aumüller TR, Braun J (2001): Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars: relation to fertility and seminal plasma growth factors. *J Androl* 22(1):104-10.
10. Holt WV, O'Brien J, Abaigar T (2007): Applications and interpretation of computer-assisted sperm analyses and sperm sorting methods in assisted breeding and comparative research. *Reprod Fertil Dev* 19(6):709-718.
11. Huo LJ, Ma XH, Yang ZM (2002): Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long-term storage. *Theriogenology* 58:1349-1360.
12. Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WM (2000): Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci* 62:143-172.
13. Kommisrud E, Paulenz H, Sehested E, Greule IS (2002): Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for 5 days. *Acta Veterinaria Scandinavica* 43:49-55.
14. Lee SH, Cheong HT, Yang BK, Park CK (2005): Development of semen extenders by assessment of sperm viability in miniature pig semen. *Reprod Dev Biol* 29:247-252.
15. Sutkeviciene N, Andersson M (2005): Assessment of boar semen quality in relation to fertility with special reference to methanol stress. *Theriogenology* 63:739-747.
16. Suzuki K, Geshi M, Yamauchi N, Nagai T (2003): Functional changes and motility characteristics of Japanese Black bull spermatozoa separated by Percoll. *Anim Reprod Sci* 77:157-172.
17. Thomas CA, Garner DL, DeJarnette JM, Marshall CE (1997): Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 56(4):991-998.
18. Vishwanath R, Shannon P (1997): Do sperm cells age? A review of the physiological changes in sperm during storage at ambient temperature. *Reprod Fertil Dev* 9:321-331.
19. Waberski D, Magnus F, Mendonca Ferreira F, Petrunkina AM, Weitze KF, Töpfer-Petersen E (2005): Importance of sperm-binding assays for fertility prognosis of porcine spermatozoa. *Theriogenology* 63:470-484.
20. Watson P (1990): Artificial insemination and the preservation of semen. In: Lamming G (ed). *Marshall's Physiology of Reproduction*. Churchill Livingstone, Edinburgh, UK, pp 747-869.
21. Yanagimachi R (1994): Mammalian fertilization. In Knobil E and Neill JD (eds). *The Physiology of Reproduction* 2nd ed. Raven Press. New York, USA, pp 189-317.

(접수일자: 2008. 3. 4 / 채택일자: 2008. 3. 13)