

최한우 정액 동결에 있어서 희석액과 수소의 연령이 정자의 동결성, 체외수정란 발달 및 인공수정 임신율에 미치는 효과

박용수^{1,*}, 장종식²

¹경상북도축산기술연구소, ²경북대학교 축산BT학부

Effect of Freezing Buffers and Age of Bulls on Freezability of Semen, *In Vitro* Embryo Development and the Pregnancy Rate after Artificial Insemination of Korean Native Stripped Bull

Yong-Soo Park^{1,*} and Jong-Sik Jang²

¹Gyeongbuk Livestock Research Institute, Yeungju 750-871, Korea

²Department of Animal Science & Biotechnology, Kyungpook National University, Sangju 742-711, Korea

ABSTRACT

The purpose of this study was to examine the effect of growing stages of the Korean Native Striped Bull (KNSB) on the freezability and fertility of frozen-thawed semen. First, we investigated the total motility (TM) and progressive motility (PM) according to the diluent used for semen freezing. Second, we examined the effect of the age of KNSB on semen volume, TM and PM of fresh and frozen-thawed semen. Third, we examined the effect of frozen semen from the different age of KNSB on the *in-vitro* fertilization rate, and the artificial insemination pregnancy rate. The diluents used in this experiment were Triladyl[®] and Tris-egg yolk extender (EYE). Semen was collected from 5 KNSB in the growing stage (15 months) and 5 adult KNSB (36 months). When Triladyl or Tris-EYE extender was used for semen freezing, there was no difference of the mean TM and the mean PM. However, the mean TM was significantly higher in Bull No. 1885 than Bull No. 4283 ($p < 0.05$). The mean volume of semen collected from the 15-month-old bulls (2.3 ml) was significantly lower ($p < 0.05$) than that from the 36-month-old bulls (5.0 ml). The mean semen concentration was similar for the 15-month-old (2.1×10^9 spermatozoa/ml) and 36-month-old (1.8×10^9 spermatozoa/ml) bulls. For the 15-month-old and 36-month-old bulls, the mean TM of fresh semen were 93.7% and 88.3%, respectively, and the mean PM were 97.0% and 88.3%, respectively; the 15-month-old bulls showed a particularly high PM ($p < 0.05$). For the 15-month-old and 36-month-old bulls, the mean TM (56.0% and 58.0%, respectively) and the mean PM (64.0% and 70.7%, respectively) of frozen-thawed semen did not differ. The development rates of embryos after *in-vitro* fertilization and the pregnancy rate after artificial insemination using frozen-thawed semen did not differ according to the bull's age. In summary, semen volume differed according to the bull's age, but semen concentration and survival rate, the *in-vitro* fertilization rate, and the pregnancy rate did not differ according to the stripe bull's age. Accordingly, semen from bulls in the growing stage can be collected and frozen for the preservation and multiplication of rare livestock.

(Key words : Korean native striped cattle, semen, freezing, pregnancy)

서 론

한우의 털 빛깔은 노란빛을 띤 갈색으로 정의하고 있으나, 현존하고 있는 한우는 모색에 따라 황색을 띠는 한우(Korean Cattle, *Bos taurus coreanae*), 최한우(Korean Native Striped Cattle), 흑우(Korean Jeju Black Cattle)로 분류하고, FAO에

등록되어 있다. 최한우는 전국적으로 1,700여 두가 사육되고 있는 것으로 추정하고 있으나, 번식 가능한 수소의 숫자가 매우 적고, 인공수정보다는 자연 종부를 위주로 하고 있어 근친의 위험에 노출되어 있으며, 털색의 유전 양식이 복잡하여 최한우 간의 교배로도 최한우의 특징인 세로줄무늬(호피무늬)가 나타나지 않는 등의 문제점을 가지고 있다. 최한우에 대한

* 본 연구는 농촌진흥청 어젠더기술개발사업(과제번호 : PJ906937호) 지원에 의해 이루어진 것임.

* Correspondence : E-mail : dvmpys@korea.kr

연구는 유전적 특성(이 등, 2002; 김 등 2011), 정액동결(박 등, 2007; 조 등, 2011), 모색 분포(박 등, 2007; 이 등, 2011) 등 아주 제한적으로 보고되고 있어서 증식과 보존을 위해서는 많은 연구가 필요하다.

최한우 등 재래가축의 보존과 증식에 활용 가능한 번식 기술로는 수정란이식과 인공수정이 있으며, 수정란에 비하여 정액은 취급이 용이하고 안정적이므로 활용도가 높다(최 등, 2011). 또한 동결정액을 이용한 인공수정이 유전자의 보급과 가축 유전자 품질을 향상시키기 위한 방법으로 제시되고 있으나(Vishwanath와 Shannon, 2000), 최한우의 인공수정을 위해서는 정액의 동결 체계가 우선 확립되어야 한다. 한편, 소의 정액 생산 능력은 개체의 유전 능력과 환경에 영향을 받으며(Everett와 Bean, 1982; Everett 등, 1978), 품종, 연령, 계절, 채취 빈도 및 영양 수준 등이 영향을 미친다(Field 등, 1979; Garner 등, 1996; Everett 등, 1978; Everett와 Bean, 1982; Flipse와 Almquist, 1961). 젖소에서는 연령이 증가할수록 정액량이 증가하며, 총 사출정자수도 차이가 있다고 하였으나(Amann 등, 1974; Hahn 등, 1969), 최한우의 연령에 따른 정액량 및 정자수 등에 대한 보고는 없다.

수소의 유전 능력이 평가되어 정액이 생산 되는 데에는 평균 5년 이상이 소요되고, 능력 검정 기간 동안 수소는 여러 가지 질병과 영양 문제 등 각종 위협에 노출되어 있다. 또한 유전 능력을 판정하기 위해서는 자신의 유전 능력 평가(당대 검정)와 많은 수의 암소에 교배하여 생산한 자손에 대한 평가(후대 검정)가 반드시 필요하지만 (Garner 등, 1996), 최한우는 사육 기반이 취약하고 개체수가 적어 후대검정이 어려운 실정이다.

성숙성이 완료된 15개월령 수소에서 정액을 채취·동결 보존한 후 거세하여 비육 후 자신 또는 형제의 성장률과 육질판정 결과를 바탕으로 씨수소로 선발하는 방법이 최한우와 같은 소수 재래가축의 개량에 효과적일 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 최한우 정자의 동결성 비교를 위하여 Tris-egg yolk와 Trilady®(Minitube, Germany) 희석제를 비교하였으며, 15개월령 및 36개월령 수소의 정액량, 신선 및 동결을 해 정자의 생존율과 직진 운동성, 체외수정란 발달율 및 인공수정 임신율을 비교 검토하였다.

재료 및 방법

1. 시험축 및 정액 채취

정액 채취에 사용된 최한우는 경상북도 축산기술연구소와 울릉군에서 사육 중인 최한우 수소 15개월령 5두와 36개월령 5두를 공시하였고, 매주 1회 정액을 채취하였다. 정액 채취는 인공질(FHK, Japan)을 이용하였다. 인공질은 온수로 38℃를 유지하였으며, 내부에는 non-spermicidal gel(Continental, USA)를 도포하였다. 최한우 수소의 승가를 유도하기 위하여 발정

징후를 보이는 한우 암컷을 보정틀에 고정시킨 후, 수컷의 음경을 인공질에 삽입하여 정액을 채취하였다.

2. 희석제 및 동결

본 실험에 이용된 정액 동결용 희석제는 Tris-based egg yolk extender(Tris-EYE; Shiva Shankar Reddy 등, 2010) 또는 시판용 Triladyl 희석제를 이용하였다. Tris-EYE 희석제의 조성은 Tris 33.2 g/l, citric acid 18.3 g/l, dextrose 7.8 g/l, egg yolk 20%(v/v), glycerol 6.4%, benzyl penicillin 10,000,000 IU/l 및 streptomycin 1 g/l이다. 채취된 정액은 실험실에서 Tris-EYE 희석제를 이용하여 정자수 100×10^6 이 되도록 하였다. 희석된 정액은 4℃에서 1시간 동안 1차 냉각을 하였다. Glycerol 첨가된 Tris-EYE 희석제를 15분 간격으로 4회에 나누어 첨가하여 정자수 50×10^6 /ml로 조정된 후 0.5 ml 스트로우에 충전하였다. 동결은 액체질소 표면 5 cm 높이에서 10분간 예비 동결 후 액체질소에 침지하였다.

Triladyl 희석제는 750 g의 초순수 물에 250 g의 난황을 첨가하여 교반하면서 250 g의 Triladyl 희석제를 첨가하였다. 채취한 정액을 정자수 50×10^6 /ml이 되도록 희석하여 0.5 ml straw에 충전하였다. 충전된 straw는 4℃에서 2시간 동안 냉각한 후 액체질소 표면 5 cm 높이에서 30분 간 예비 동결을 한 후 액체질소에 침지하여 동결을 하였다.

3. Total Motile(TM)과 Progressive Motile(PM) 비율 측정

냉장 또는 동결 정액을 37℃ 수조에서 1분간 담근 후 잘 혼합한 정액 10 μ l를 counting chamber에 넣고 CASA system(Minitube, Germany)상에서 3회 측정하여 TM과 PM 비율을 측정하였다.

4. 체외성숙, 수정 및 배양

1) 배양액

난소로부터 난포란의 회수 및 세척용은 25mM HEPES와 3 mg/ml BSA(Sigma, A6003)가 첨가된 Hepes-TALP 용액, 체외성숙용은 0.2 mg/ml pyruvate(Sigma, P3662), 1 μ g/ml FSH(Sigma, F8174), 10 μ g/ml LH(Sigma, L9773) 및 10% FBS(Sigma, F0643)가 첨가된 TCM-199(Gibco, 12340-030) 용액, 체외수정용은 6 mg/ml BSA와 10 μ g/ml heparin(Sigma, H3149)이 첨가된 TALP 용액, 체외 배양용은 3 mg/ml BSA 또는 10% FBS가 첨가된 CR1aa 용액을 각각 이용하였다. 그리고 실험에 제공되는 배양액의 미세소적은 mineral oil(Sigma, M8410)을 도포하여 39℃, 5% CO₂ 배양기에서 최소한 4시간 이상 평형을 하였다.

2) 난포란의 회수 및 체외성숙

도축 한우에서 난소를 적출하여 25 μ g/ml gentamycin(Sig-

ma, G1264)이 첨가된 0.9% 생리식염수(30~33°C)가 들어있는 보온병에 담아 2~3시간에 실험실로 운반하였다. 난소는 penicillin G(Sigma, P3032)가 첨가된 생리식염수로 3~4회 세척하여, 18 G 주사침이 부착된 10 ml 주사기를 이용하여 직경 2~8 mm의 가시난포로부터 난포란을 회수하였다. 회수된 난포란은 실험현미경하에서 난구세포의 부착 상태가 치밀한 것만을 선별하여, 50 µl의 체외성숙용 배지에 15개 난포란을 옮겨 22시간 동안 39°C, 5% CO₂ 배양기에 배양함으로써 체외성숙을 유도하였다.

3) 체외수정

최한우 동결정액 1개를 실온에서 10초간, 37°C의 항온수조에서 용해하여 90% percoll(Sigma, P4937) 위에 놓고, 700 g에서 20분간 원심분리 후 정자괴를 회수하였다. 정자괴는 2 ml의 신선 체외수정용액으로 350 g에서 10분간 원심 분리함으로써 정자를 세척하였다. 정자 농도를 25×10⁶ sperms/ml가 되도록 조절하여, 15개씩의 난포란이 함유되어 있는 46 µl의 체외수정용액에 heparin 2 µl와 정자 2 µl를 각각 첨가하여(최종 정자 농도 1×10⁶ sperms/ml) 39°C, 5% CO₂ 배양기에 20시간 동안 배양함으로써 체외수정을 유도하였다.

4) 체외배양

체외수정 후 형태적으로 정상이라고 판단된 수정란만을 회수하여, 15개씩의 수정란(배양 1일)을 3 mg/ml BSA가 첨가된 CR1aa 용액 20 µl에 넣고, 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였으며, 배양 3일째와 5일째에는 10% FBS가 첨가된 CR1aa 용액으로 교환하여 배양하였다.

5. 인공 수정 및 임신 진단

최한우 암소의 발정발견은 오전(6시) 및 오후(6시)에 20분씩 실시하였고, 인공수정은 발정발견 후 10~12시간에 동결정액 1스트로우를 주입하였다. 임신 진단은 인공수정 후 40일경에 초음파(Honda, Japan)로 하였다.

6. 실험설계

1) 희석제 비교

최한우 정자의 동결에 효과적인 희석제를 선별하기 위하여 Tris-EYE 희석제 및 Triladyl 희석제로 제조된 동결-용해 정자의 TM과 PM을 조사하였다. 최한우 36개월령 2두(1885번과 4283번)의 정액을 각각 3회 채취하여 실험에 활용하였다.

2) 연령에 따른 정자의 동결성

최한우 수소의 연령에 따른 정자의 동결성을 조사하기 위하여 15개월 및 36개월령 최한우 5두씩, 3회 정액을 채취하였다. 정액 채취 직후 정액량, 정자 농도, TM 및 PM 비율을 조사하였고, Triladyl 희석제로 생산된 동결-용해 정자의 TM과 PM 비율을 비교하였다.

3) 체외수정란 발달을 및 인공수정 임신율

최한우 15개월령 및 36개월령 수소로부터 생산된 동결정액과 한우 미성숙 난자를 이용하여 체외수정란 발달율을 조사하였고, 최한우 암소에 인공수정하여 임신율을 비교하였다.

7. 통계 처리

정액량, 정자 농도, 생존율과 직진운동성은 Mean±SE로 나타냈으며, 각각의 평균에 대한 통계학적 분석은 SAS package를 이용하여 분산 분석 후 Duncan's 다중 검정을, 수정란 발달율과 임신율은 χ^2 -test를 실시하였다. $p < 0.05$ 수준에서 유의차를 검정하였다.

결 과

정액 동결에 사용하는 희석제에 따른 동결-용해 최한우 정자의 TM과 PM 비율을 조사한 결과는 Table 1과 같다. Triladyl 희석제에서는 최한우 1885번의 TM 비율이 평균 79%, PM 비율은 평균 68%, 최한우 4283번은 각각 평균 68% 및 73%였

Table 1. Effect of freezing buffer on total motility and progressive motility of frozen-thawed Korean Native Striped Bull spermatozoa

Buffers	Bull No. 1885		Bull No. 4283	
	Total motility* (%)	Progressive motility** (%)	Total motility* (%)	Progressive motility** (%)
Triladyl	79 ± 3.6 ^a	68 ± 2.6	68 ± 5.6 ^b	73 ± 4.9
Tris-EYE***	72 ± 4.1 ^a	70 ± 6.1	60 ± 3.3 ^b	63 ± 5.3

^{a,b} Entries with different superscripts are statistically different ($p < 0.05$).

* Total motility; Live spermatozoa / Total spermatozoa.

** Progressive motility; Progressive spermatozoa / Number of total motility spermatozoa.

*** Tris-EYE; Tris-egg yolk extender.

고, Tris-EYE 희석액에서는 칩한우 1885번이 각각 평균 72% 및 70%, 칩한우 4283번은 각각 60% 및 63%로서 차이가 없었다. 한편, 수소 개체간에는 희석제와 관계없이 칩한우 1885번의 TM 비율이 평균 72~79%로서 칩한우 4283번의 평균 60~68%에 비하여 유의하게 높았으나($p<0.05$), PM 비율은 유사한 경향이였다.

칩한우 15개월령 및 36개월령 수소의 정액량, 정자 농도, 정자의 TM과 PM 비율을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 정액량은 15개월령이 평균 2.3 ml이었고, 36개월령이 평균 5.0 ml로서 유의하게 많았다($p<0.05$). 정자의 농도는 15개월령이 평균 2.1×10^9 /ml로서 36개월령의 1.8×10^9 /ml보다 많았으나, 유의차는 인정되지 않았다. 한편, 채정 직후의 신선정자의 TM 비율이 15개월령 및 36개월령이 각각 평균 93.7% 및 88.3%, PM 비율이 각각 97.0% 및 88.3%로서, 특히 PM 비율이 15개월령에서 유의하게 높았다($p<0.05$).

칩한우 15개월령 및 36개월령 수소로부터 생산된 동결-융해 정액의 TM과 PM 비율을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 15개월령 동결-융해 정자의 TM 비율이 평균 56.0%, PM 비율이 평균 64.0% 그리고 36개월령 동결-융해 정자는 각각 평균 58.0%, 평균 70.7%로서 차이가 없었다.

칩한우 15개월령 및 36개월령 수소로부터 생산된 동결정액을 이용한 체외수정란 발달율을 조사한 결과는 Table 3과 같

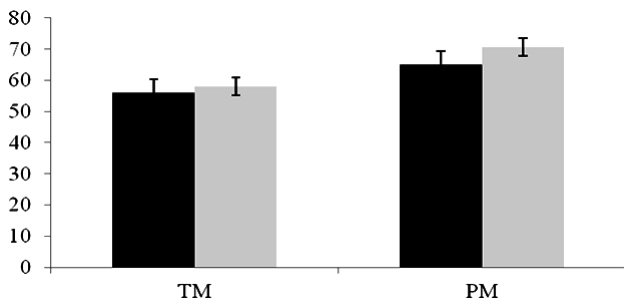


Fig. 1. Total motility(TM) and progressive motility(PM) of Korean Native Striped Bull's frozen-thawed semen collected when they were 15-(■) and 36-(■) month-old.

Table 2. Ejaculate values for volume, sperm concentrations, total motility and progressive motility of Korean Native Striped Bulls from semen collected when they were 15 and 36 month old

Age (month)	Volume of semen	Concentration of spermatozoa ($\times 10^9$ /ml)	Total motility* (%)	Progressive motility* (%)
15	2.3 ± 0.2^b	2.1 ± 0.5	93.7 ± 1.1	97.0 ± 0.5^a
36	5.0 ± 0.2^a	1.8 ± 0.2	88.3 ± 2.8	88.3 ± 1.9^b

^{a,b} Entries with different superscripts are statistically different ($p<0.05$).

* Total motility; Live spermatozoa/Total spermatozoa.

** Progressive motility; Progressive spermatozoa/Number of total motility spermatozoa.

다. 체외수정 후 2세포기 발달율은 53.8% 및 57.6%, 8세포기 발달율은 26.2% 및 28.1%, 그리고 배반포 발달율은 13.3% 및 16.2%로서 비슷한 경향이였다.

칩한우의 암소에 칩한우 수소 15개월 및 36개월령 동결정액으로 인공수정 후 임신율을 조사한 결과는 Table 4와 같다. 칩한우 암소의 임신율이 15개월령 수소 42.1% 및 36개월령 수소 47.4%로서 36개월령 수소의 것이 높았으나 유의차는 없었다.

고찰

동결보존용 희석제는 정자에 에너지원, 온도 변화와 관련된 손상의 보호, 그리고 정자의 생존에 적합한 환경 부여와 증량의 목적을 위하여 에너지원, 보호고질, 전해질, 비전해질, 항생 물질 또는 특수 첨가물 등이 첨가된다(Chaveiro 등, 2006; Purdy, 2006). Non-penetrating cryoprotectant(milk 또는 egg yolk), penetrating cryoprotectant (glycerol, ethylene glycol, dimethyl

Table 3. Effect of frozen-thawed semen from 15- or 36-month-old Korean Native Striped Bulls on the development rates of embryos after *in vitro* fertilization

Age (month)	No. of oocytes	No (%) of developed to		
		≥ 2 cell	8 cell	Blastocyst
15	210	113 (53.8)	55 (26.2)	28 (13.3)
36	210	121 (57.6)	59 (28.1)	34 (16.2)

Table 4. Pregnancy rates of Korean Native Striped (KNS) Cow after artificial insemination using frozen-thawed semen from 15- or 36-month-old KNS Bulls

Age (month)	No of recipients	Pregnancy (%)	Parturition	
			Male	Female
15	19	8 (42.1)	4	4
36	38	18 (47.4)	10	8

sulfoxide), 버퍼(Tris, Test), 에너지원(glucose, lactose, raffinose, saccharose, trehalose), 염류(sodium citrate, citric acid) 그리고 항생제(penicillin, streptomycin) 등으로 구성되어 있다(Arriola와 Foote, 1987; Evans와 Maxwell, 1987). 국내에서 정자의 동결-희석제는 주로 난황구연산 완충액을 제조하여 사용하거나, 상업용으로 판매되는 AndroMed(Minitube, Germany) 희석제 또는 Triladyl 희석제를 이용하고 있다(Chaveiro 등, 2006; 박 등, 2007; Shiva Shankar Reddy 등, 2010; 조 등, 2011). 조 등(2011)은 AndroMed 희석제와 Tris-egg yolk 희석제를 사용하여 최한우 정자를 동결한 결과, Tris-egg yolk 희석제가 평균 89.7%로서 AndroMed 희석제에 비하여 생존율이 높았으나, 활력은 차이가 없었다고 하였다. 또한 Triladyl 희석제를 이용한 최한우 동결용해 정자의 생존율이 평균 56.4%, 활력은 평균 89.0%를 보고하였다(박 등, 2007). 흑우에서 AndroMed 희석제를 이용한 동결용해 정자의 생존율이 평균 43%, 활력은 평균 66%였다(조 등, 2009). 본 연구에서는 채정 직후 정자의 생존율과 직진운동성이 개체간의 차이는 인정되었으나, 희석제에 따른 차이는 없었다(Table 1). 이상의 결과에서 각 희석제의 동결 과정을 고려한다면 상온에서 충전과 봉입이 가능한 Triladyl 희석제의 활용도가 높을 것으로 생각된다. 한편, Triladyl 희석제를 이용하였을 때 최한우 연령(15개월령 및 36개월령)에 따른 동결-용해 정자의 TM과 PM 비율은 차이가 없었다(Fig. 1).

젖소의 육성기와 성숙에서 정액량을 비교하였을 때 정액량이 평균 4.9 ml에서 7.1 ml로 증가하였고(Garner 등, 1996), 한우에서는 4~5세 연령 중모우의 정액량이 4.58 ml였고, 연령이 5~7세로 많아짐에 따라 정액량도 6.25 ml로 증가하였다(이 등, 2006). 본 연구에서 최한우 수소의 정액량은 15개월령이 평균 2.3 ml, 36개월령은 평균 5.0 ml로서 연령이 높아질수록 정액량이 증가하여($p < 0.05$) 이전의 연구 결과와 일치하였다. 채정 직후 정자수는 젖소 $1.5 \sim 1.6 \times 10^9$ /ml, 한우 $12.9 \sim 16.1 \times 10^8$ /ml, 최한우 $4.1 \sim 10 \times 10^8$ /ml로 보고되었고(Garner 등, 1996; 박 등, 2007; 이 등, 2006), 본 연구에서는 정자수가 15개월령 평균 2.1×10^9 /ml 및 36개월령 1.8×10^9 /ml로서 연령에 따른 차이는 없었다. 채정 직후 정자의 생존율과 활력은 흑우가 각각 평균 80%(조 등, 2009), 최한우는 생존율 56.4%, 활력 89.0%였고(박 등, 2007; 조 등, 2011), 본 연구에서도 TM 비율이 88.3~93.7%, PM 비율은 88.3~97.0%로서 연령에 따른 차이가 인정되지 않았다(Table 2).

정액 동결에 이용되는 희석제는 정자의 생존율에 중대한 영향을 미치므로, 이의 잘못된 선택은 인공수정이나 수정란이식 시 수태율과 수정란 생산성 저하의 원인이 되기도 하므로, 동결용해 정액에 대한 수정능 평가가 필요하다(Sansone 등, 2000; 조 등, 2009). 정액의 품질 분석을 위한 현미경적 평가나 화학적 진단만으로 정액의 수정능을 예지하기에는 다소 부족하므로 본 연구에서는 각 실험실에서 많은 연구를 하고 있는 체외

수정을 이용하여 동결용해 정액의 수정 능력을 평가하였다. 체외수정란의 발달에는 난소의 운반(Yang 등, 1990), 체외성숙 조건(Ward 등, 2002), 체세포와 공동 배양(Eyestone과 First, 1985), 에너지원(Rosenkrans 등, 1993), 혈청(Nagai, 2001; Wright와 Bondioli, 1981), 성장인자(Abe 등, 2002; Hoshi, 2003), 산소 농도(Lim 등, 1996), 배양액의 종류(Gandhi 등, 2000; Gardner, 1996) 등이 영향을 미치고, 특히 난자를 제공하는 도축 암소의 품질도 수정란의 발달에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다(Kim과 Park, 2011). 한편, 흑우와 한우의 체외수정란 발달율은 차이가 없었으나(조 등, 2009), AndroMed 희석제 또는 Tris-egg yolk 희석제를 이용하여 동결한 최한우 정액으로 체외수정 한 수정란의 배반포 발달율이 Tris-egg yolk 희석제가 높았다(조 등, 2011). 또한 박 등(2007)은 최한우 동결 정액의 배반포 발달율과 인공수정 임신율이 한우 동결정액에 비하여 높다고 하였다. 본 연구에서는 최한우 수소의 연령에 따른 배반포 발달율(Table 3)과 인공수정 임신율(Table 4)의 차이는 없었다. 이상의 결과에서 체외수정란의 발달에는 정액 동결에 사용하는 희석제뿐만 아니라 체외수정란의 배양 조건 등이 종합적으로 영향을 미치지만 수소의 연령에 따른 효과는 없는 것으로 판단된다.

본 연구의 결과를 종합하면 최한우 수소의 연령에 따른 정액량 차이는 인정되나, 신선 정액의 농도 및 TM 비율, 동결용해 정액의 TM과 PM 비율 및 체외 배반포 발달율과 인공수정 임신율의 차이는 없었다. 따라서 육성 단계 수소의 동결정액을 활용한다면 최한우 등의 재래희소가축의 보존과 증식에 기여할 것으로 기대된다.

결론

최한우 육성축과 성숙 정액의 동결성과 수태능을 검토하기 위하여 첫째, 동결 희석제(Tris-egg yolk extender(Tris-EYE) 및 Triladyl)에 따른 최한우 정자의 total motility(TM)과 progressive motility(PM) 비율을 조사하였고, 둘째, 15개월령 및 36개월령인 최한우 수소의 정액량, 신선 및 동결용해 정자의 TM과 PM 비율을 비교하였고, 셋째, 최한우 연령에 따라 생산된 동결정액의 체외수정란 발달율 및 인공수정 임신율을 검토하였다. 최한우 정액 동결에 사용하는 희석액에 따른 동결-용해 정액의 TM과 PM 비율은 차이가 없었으나, 최한우 개체에 따른 TM 비율의 차이는 인정되었다. 최한우 정액량은 15개월령 수소가 평균 2.3 ml이었고 36개월령 수소는 평균 5.0 ml로서 유의하게 많았으나($p < 0.05$), 농도는 15개월령이 평균 2.1×10^9 /ml로서, 36개월령의 1.8×10^9 /ml와 비슷하였다. 채정 직후 신선정자의 TM 비율은 15개월령 및 36개월령이 각각 평균 93.7% 및 88.3%, PM 비율은 각각 97.0% 및 88.3%로서, 특히 PM 비율이 15개월령에서 유의하게 높았다($p < 0.05$). 동결-용

해 정자의 TM 비율은 평균 56.0~58.0%, PM 비율은 평균 64.0~70.7%로서 차이가 없었다. 최소 연령에 따라 생산된 동결정액을 이용한 체외수정란 발달율을 조사한 결과 연령에 따른 차이는 인정되지 않았으며, 인공수정 후 임신율도 비슷한 경향이였다. 이상의 결과를 종합하면 최한우 수소의 연령에 따른 정액량 차이는 인정되나, 신선 정액의 농도 및 TM 비율, 동결용해 정액의 TM과 PM 비율 및 체외 배반포 발달율과 인공수정 임신율의 차이는 없었다. 따라서 육성 단계 수소의 동결정액을 활용한다면 최한우 등의 희소재래가축의 보존과 증식에 기여할 것으로 기대된다.

참고문헌

- Abe H, Yamashita S, Satoh T and Hoshi H. 2002. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum containing media. *Mol. Reprod. Dev.* 61:57-66.
- Amann RP, Kavanaugh JF, Griel Jr LC and Voglmayr JK. 1974. Sperm production of Holstein bulls determined from testicular spermatid reserves, after annulation of rete testis or *Vas deferens* and by dairy ejaculation. *J. Dairy Sci.* 57: 93-99.
- Arriola J and Foote RH. 1987. Glycerolation and thawing effects on bull spermatozoa frozen in detergent-treated egg yolk and whole egg extenders. *J. Dairy Sci.* 70:1664-1670.
- Chaveiro A, Machado L, Frijters A, Engel B and Woelders H. 2006. Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bull sperm using two osmotic supports. *Theriogenology* 65:1875-1890.
- Evans G and Maxwell WMC. 1987. Frozen storage of semen. In: Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butterworths, Wellington, pp. 122-141.
- Everett RW and Bean B. 1982. Environmental influences on semen output. *J. Dairy Sci.* 65:1303-1310.
- Everett RW, Bean B and Foote RH. 1978. Sources of variation of semen output. *J. Dairy Sci.* 61:90-95.
- Eyestone WH and First NL. 1985. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviducial tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fertil.* 85:715-720.
- Field MJ, Burns WC and Warnick AC. 1979. Age, season, and breed effects on testicular volume and semen traits in young bulls. *J. Anim. Sci.* 48:1299-1304.
- Flipse RJ and Almquist JO. 1961. Effect of total digestible nutrient intake to four years of age on growth and reproductive development and performance of dairy bull. *J. Dairy Sci.* 44:905.
- Gandhi AP, Lane DK, Gardner DK and Krisher RL. 2000. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. *Human Reprod.* 5:395-401.
- Gardner DK. 1996. Environment of the preimplantation human embryo *in vivo*: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertility and Sterility* 65:349-353.
- Garner DL, Johnson LA, Allen CH, Palencia DD and Chambers CS. 1996. Comparison of seminal quality in Holstein bulls as yearlings and mature sires. *Theriogenology* 45: 923-924.
- Hahn J, Foote RH and Seidel GE Jr. 1969. Testicular growth and related sperm output in dairy bulls. *J. Anim. Sci.* 29: 41-47.
- Hoshi H. 2003. *In vitro* production of bovine embryos and their application for embryo transfer. *Theriogenology* 59: 675-685.
- Kim So-Seob and Park Yong-Soo. 2011. Associations between pedigree, meat quality, and meat quantity of slaughterhouse donor cows and oocyte recovery, embryo development, and pregnancy after embryo transfer. *Livestock Sci.* 142:42-47
- Lim JM, Liou SS and Hansel W. 1996. Intracytoplasmic glutathione concentration and the role of β -mercaptoethanol in preimplantation development of bovine embryos. *Theriogenology* 46:429-439.
- Nagai T. 2001. The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology* 55:1291-1301.
- Purdy PH. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research* 63:215-225.
- Rosenkrans CF, Zeng GQ, Mcnamara GT, Schoff PK and First NL. 1993. Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates. *Biol. Reprod.* 49:459-462.
- Sansone G, Nastri MJF and Fabbrocini A. 2000. Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 55-76.
- Shiva Shankar Reddy N, Jagan Mohanarao G and Atreja SK. 2010. Effects of adding taurine and trehalose to a tris-based egg yolk extender on buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm quality following cryopreservation. *Anim. Reprod. Sci.* 119: 183-190.
- Vishwanath R and Shannon P. 2000. Storage of bovine semen

- in liquid and frozen state. Anim. Reprod. Sci. 62:23-53.
- Ward F, Enright B, Riao D, Boland M and Lonergan P. 2002. Optimization of *in vitro* bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. Theriogenology 57:2105-2117.
- Wright RW and Bondioli KR. 1981. Aspects of *in vitro* fertilization and embryo culture in domestic animals. J. Anim. Sci. 53:702-729.
- Yang NS, Lu KH and Gordon I. 1990. *In vitro* fertilization (IVF) and culture (IVC) of bovine oocytes from stored ovaries. Theriogenology Abst. 33:352.
- 김상환, 홍연식, 이호준, 윤종택. 2011. 취한우 혈액에서 DNA 다양성 분석을 통한 표지 유전자 탐색. 한국발생생물학회지 15: 315-324.
- 박연수, 황환섭, 유재원, 김남욱. 2007. 재래 취소의 정액 특성 및 인공수정에 의한 송아지 모색 분포. 한국동물번식학회지 31:43-48.
- 이성수, 양영훈, 강승률, 오운용, 양보석, 고서봉, 오성중, 김규일. 2002. 취소와 비경흑색 한우의 Melanocortin Receptor1 (MCR1) 유전자형 분석. 동물자원과학회지 44:23-30.
- 이성수, 정준, 박노형. 2006. 한우 종모우에 있어 정액 채취시 의빈대 혹은 의빈우 이용이 정액성상에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지 21:95-100.
- 이호준, 김상환, 이경태, 윤종택. 2011. 수정란 이식에 의해 생산된 취소의 모색 발현. 한국발생생물학회지 15:325-329.
- 조상래, 김성재, 손준규, 최선호, 최창용, 고응규, 이풍연, 김현중. 2011. 취소 정액 동결을 위한 AndroMed와 Tris-egg Yolk 희석제의 동결성 비교. 한국수정란이식학회지 26:65-70.
- 조상래, 최선호, 최창용, 손준규, 김재범, 김성재, 손동수, 김현중. 2009. AndroMed를 이용한 흑우 동결정액으로 체외수정란 생산 효과. 한국수정란이식학회지 24:207-212.
- 최선호, 고민희, 강태영, 조상래, 박용상, 오신애. 2011. 제주 흑우 동결 정액 제조에 있어서 Glycerol의 농도에 따른 생존율 및 정자 침체 양상의 변화. 한국수정란이식학회지 26:187-193.

(접수: 2012. 1. 15 / 심사: 2012. 1. 17 / 채택: 2012. 2. 5)