

調節되지 않은 室温에서의 돼지液狀精液 保存에 關한 研究

朴昌植 · 金敏奎 · 李成鎭* · 徐直** · 李千軍** · 李義海**

忠南大學校 農科大學

Study on the Preservation of Liquid Boar Semen at Uncontrolled Room Temperature

Park, C. S., M. K. Kim, S. H. Lee*, Z. Xu**, C. Z. Lee** and Y. H. Lee**

College of Agriculture, Chungnam National University

SUMMARY

This study was done to find out the preservation possibility of liquid boar semen at variable room temperature of 9 to 16°C. The percentages of sperm motility and NAR acrosome were highest in Bütschwiler extender compared to Bütschwiler+Hepes, Andro+Hepes and Andro extenders. The extenders with Hepes buffer showed detrimental effect for preservation of liquid boar semen. The pH of ejaculated sperm-rich fraction was 7.5. The pH of Bütschwiler+Hepes, Bütschwiler, Andro+Hepes and Andro extenders was 6.9, 7.5, 7.1 and 8.1, respectively. The pH of liquid boar semen with Bütschwiler+Hepes, Bütschwiler, Andro+Hepes and Andro extenders was 6.6, 6.9, 6.7 and 6.9 at 1st day of storage, and 5.5, 5.7, 5.6 and 5.8 at 7th day of storage, respectively.

Gilts and sows were inseminated twice with liquid boar semen stored at 9~16°C in Bütschwiler extender for 3~4 days. Farrowing rate, litter size and average pig weight at birth between AI and natural service did not differ significantly in gilt and sow, respectively. However, sow showed higher farrowing rate and litter size compared to gilt both in AI and in natural service. As a result of this study, we found out that liquid boar semen can be stored for 5~7 days at uncontrolled room temperature of 9~16°C in Bütschwiler extender.

(Key words : Liquid boar semen, Uncontrolled room temperature, Sperm motility, Bütschwiler extender)

I. 緒 論

지금까지 돼지의 液狀精液 利用을 위하여 開發된 稀釋液들은 15~18°C에 保存하면서 使用하도록 되어 있

는 Gottari 等(1980)의 Zorlesco, Summermatter (1984)의 Bütschwiler, Revell과 Glossop(1989)의 Reading, Weitze (1991)의 Androhep 稀釋液 等이 있고, 5°C에 保存하면서 使用하도록 되어 있는 Park 等(1996)의 Lactose-egg yolk, Cheon 等(1996)의

이 論文은 韓國科學財團의 “1994年度 韓國科學者 中國 派遣研究”의 研究結果임.

* 國立公州專門大學(Kongju National Junior College)

** Tian Jin Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science, Tian Jin 300112, China.

BF5 稀釋液 等이 있다.

그러나 中國의 農村地域은 일정한 溫度에서의 保存이 不可能한 地域이 많으므로 自然狀態下에서 液狀精液의 保存可能性을 究明하고자, 最近에 좋은 結果를 나타내고 있는 Bütschwiler 稀釋液과 Andro 稀釋液을 比較 檢討하고, 또한 buffer로 利用되는 Hepes의 效果도 調査하고자 本 試驗을 實施하였다.

II. 材料 및 方法

1. 供試豚 및 精液의 採取와 檢査

本 試驗에 使用된 種牡豚은 18~24個月齡의 랜드레이스種, 라지화이트種 및 듀록種 9頭였으며, 種牡豚은 初産 및 經産의 랜드레이스種, 라지화이트種 및 F1 (랜드레이스×라지화이트) 80頭였다. 試驗은 1995年 3月부터 1996年 2月까지 中國 天津畜牧獸醫研究所에서 實施하였다.

種牡豚의 精液 採取 間隔은 7日로 하여 午前 9~10時 사이에 採取하였다. 精液은 200ml 保溫瓶에 人工臆法으로 採取하면서 濃厚精子部分과 稀薄精子部分으로 分離하였다. 液狀精液製造에는 濃厚精子部分만 使用하였다. 原精液은 採取直後, 保存된 液狀精液은 精液製造當일을 1日로하여 48時間 間隔으로 7日까지 精子運動性과 正常尖體比率을 Pursel과 Park(1987)의 方法에 의하여 評價하였으며, pH의 變化도 調査하였다.

2. 液狀精液의 製造 및 保存

本 試驗에 使用된 稀釋液들의 成分은 Table 1과 같으며 製造 및 保存 方法은 다음과 같다.

- 1) 保溫瓶에 採取된 濃厚精子部分은 9~16℃의 室溫에서 1~2時間 동안 冷却시켰다.
- 2) 濃厚精液은 9~16℃의 室溫에서 500ml의 비이커에 옮겨졌으며, 濃厚精液 1 : 稀釋液 2의 比率로 稀釋하여 保存하였다.
- 3) 本 試驗期間의 하루동안 室外溫度差는 最低氣溫 1~5℃, 最高氣溫 9~18℃를 나타냈으며, 室內 保存溫度는 9~16℃의 範圍를 나타내었다.

3. 人工授精과 自然種付

- 1) 發情調査는 하루에 아침과 저녁 2회로 나누어 實施하였다.
- 2) 人工授精時는 Bütschwiler 稀釋液으로 3~4日 保存된 液狀精液 30ml($4\sim5 \times 10^8$ sperm/ml)과 50ml BTS 稀釋液을 混合하여 人工授精用 100 ml 플라스틱瓶이나 50ml 注射器를 利用하여 人工授精을 實施하였다.
- 3) 人工授精은 허리부분을 두손으로 눌러서 種牡豚 許容姿勢를 보이는 時間으로 부터 22~26時間後 80ml의 液狀精液을 rubber spiral tip catheter를 使用하여 1次 授精을 子宮頸內에 實施 하였다. 그리고 1次 授精後 12時間 지난 다음 같

Table 1. The composition of extenders

Ingredient	Bütschwiler+Hepes	Bütschwiler	Andro+Hepes	Andro
Glucose, monohydrate	35.0	35.0	26.0	26.0
Sodium citrate	6.9	6.9	8.0	8.0
Sodium bicarbonate	1.0	1.0	1.2	1.2
EDTA, disodium	2.35	2.35	2.4	2.4
Tris, buffer	5.65	5.65	—	—
Citric acid	3.15	3.15	—	—
Cysteine	0.054	0.054	—	—
BSA	3.0	3.0	2.5	2.5
Hepes	9.5	—	9.5	—
pH	6.9±0.06	7.5±0.06	7.1±0.09	8.1±0.07

Table 2. Comparison of percentage of motility on the liquid boar semen diluted with four extenders and preserved at 9~16℃

Extender	Incuvation time (h)	Storage length of liquid semen (day) ¹			
		1	3	5	7
Bütschwiler+Hepes	0.5	85.0±2.24 ^a	73.0±2.00 ^a	71.0±2.45 ^a	61.0±5.10 ^a
Bütschwiler		86.0±2.45 ^a	78.0±2.00 ^a	75.0±2.24 ^a	70.0±4.18 ^a
Andro+Hepes		82.0±2.55 ^a	58.0±5.83 ^b	44.0±2.45 ^b	32.0±8.15 ^b
Andro		85.0±2.24 ^a	65.0±6.32 ^{ab}	59.0±5.57 ^{ab}	58.0±6.04 ^a
Bütschwiler+Hepes	2	73.0±3.74 ^a	69.0±2.45 ^a	62.0±3.74 ^b	53.0±6.20 ^a
Bütschwiler		77.0±3.74 ^a	71.0±1.00 ^a	72.0±2.00 ^a	62.0±4.03 ^a
Andro+Hepes		58.0±3.74 ^b	50.0±3.16 ^b	39.0±5.57 ^d	23.0±5.81 ^c
Andro		62.0±5.84 ^{ab}	54.0±5.10 ^{ab}	50.0±8.94 ^c	37.0±4.50 ^b

¹ Values were observed after 0.5 and 2h incuvation in water bath of 37℃. Mean±S.E. for 5 ejaculates from Large White boar.

^{a,b,c,d} Mean in the same column with different superscripts at 0.5 and 2h incubation time differ significantly ($p<0.05$), respectively.

은 방법으로 2次 授精을 實施하였다.

- 4) 自然種付도 種牡豚 許容姿勢를 보이는 時間으로 부터 人工授精時와 같은 時期에 自然種付를 2回 實施하였다.

III. 結果 및 考察

1. 9~16℃에서 保存된 液狀精液의 稀釋液別 保存性

돼지의 濃厚精子部分을 Bütschwiler+Hepes, Bütschwiler, Andro+Hepes 및 Andro 稀釋液에 稀釋하여 하루동안 溫度差가 9~16℃로 變化하는 室溫에서 保存하면서 0.5 및 2時間 培養하였을 때 貯藏期間別 精子運動性의 變化는 Table 2에 나타난 바와 같다.

貯藏期間別 稀釋液間의 差異點을 살펴보면, 0.5時間 培養時 3日齡 부터 差異點이 認定되어 Bütschwiler稀釋液들이 Andro稀釋液들보다 좋은 結果를 나타내었는 바, 이는 Bütschwiler稀釋液에 包含된 Tris buffer가 溫度變化에 따른 衝擊을 줄여주기 때문인 것으로 생각된다. 또한 Hepes가 包含된 稀釋液들이 包含되지 않은 稀釋液들보다 낮은 運動性을 나타낸 바, Hepes의 添加가 精子運動性의 比率를 增加시킨다는 Weitze(1991)의 報告와 反對되는 結果를 보여 좀 더 研究 檢討해야 될 것으로 생각된다. 2時間 培養時도 稀釋 當日부터 Bütschwiler 稀釋液들이 Andro 稀釋

液들보다 좋은 結果를 나타내면서 0.5時間 培養時와 비슷한 傾向을 나타내었다.

돼지의 濃厚精子部分을 Bütschwiler+Hepes, Bütschwiler, Andro+Hepes 및 Andro 稀釋液에 稀釋하여 하루동안의 溫度差가 9~16℃로 變化하는 室溫에서 保存하면서 0.5 및 2時間 培養하였을 때 貯藏期間別 正常尖體의 變化는 Table 3에 나타난 바와 같다.

貯藏期間에 따른 正常尖體比率는 稀釋液들 사이에 統計적으로 有意성이 認定되지 않았으나, Bütschwiler, Bütschwiler+Hepes, Andro, 그리고 Andro+Hepes 稀釋液의 順序로 좋은 成績을 나타내어 精子運動性에서와 비슷한 傾向을 나타내었다. 以上の 結果는 Andro+Hepes稀釋液을 利用하여 15℃에서 6日 保存한 경우 Hepes의 濃도에 따라 培養直後 精子運動性과 正常尖體比率이 各各 73.3~81.7%와 87.9~90.3%라는 Weitze(1991)의 報告보다 Bütschwiler와 Bütschwiler+Hepes稀釋液을 除外한 稀釋液들에서 특히 精子運動性이 상당히 낮은 結果를 나타내었는 바, 室溫의 變化가 주된 原因으로 思料된다. Bütschwiler와 Bütschwiler+Hepes稀釋液은 室溫에서 6日 保存한 Revell과 Glossop(1989)의 Reading稀釋液이나, 15℃에서 7日 保存한 Cheon 등(1996)의 Bütschwiler稀釋液의 試驗結果와 비슷한 傾向을 나타내어 하루동안의 溫度差가 9~16℃로 變化하는 室

Table 3. Comparison of percentage of NAR on the liquid boar semen diluted with four extenders and preserved at 9~16°C

Extender	Incubation time (h)	Storage length of liquid semen (day) ¹			
		1	3	5	7
Bütschwiler+Hepes	0.5	92.0±2.17 ^a	82.4±1.94 ^a	81.0±3.03 ^a	74.0±3.33 ^a
Bütschwiler		92.8±0.37	86.4±1.81	83.6±2.09	78.6±2.73
Andro+Hepes		91.8±1.59	81.2±2.80	78.4±2.94	71.6±1.57
Andro		92.4±1.29	84.8±1.93	79.2±4.40	72.2±3.56
Bütschwiler+Hepes	2	88.6±2.11	75.4±4.23	73.0±2.89	55.8±3.81
Bütschwiler		90.6±1.44	81.0±4.30	76.6±3.20	62.6±3.76
Andro+Hepes		86.4±1.29	72.4±3.61	70.4±1.36	52.2±2.18
Andro		87.2±1.86	74.8±4.71	72.8±1.93	55.2±4.33

¹Values were observed after 0.5 and 2h incubation in water bath of 37°C. Mean±S.E. for 5 ejaculates from Large White boar.

^aMean in the same column at 0.5 and 2h incubation time did not differ significantly, respectively.

溫에서는 Bütschwiler와 Bütschwiler+Hepes稀釋液만이 精子濃厚部分의 精液을 5~7日 保存하여 使用할 수 있다고 判斷되었다.

2. 稀釋液別 pH의 變化

돼지의 濃厚精子部分을 Bütschwiler, Bütschwiler+Hepes, Andro, 그리고 Andro+Hepes 稀釋液에 稀釋하여 하루동안의 溫度差가 9~16°C로 變化하는 室溫에서 保存하였을 때 貯藏期間別 pH의 變化는 Table 4에 나타난 바와 같다.

稀釋液들 사이에 差異點을 살펴보면 Hepes를 添加한 稀釋液들의 pH가 Hepes를 添加하지 않은 稀釋液들보다 貯藏期間 내내 낮은 傾向을 나타내었다. 貯藏期間別 pH의 變化를 살펴보면 5日齡부터 pH가 急激히 낮아졌는데, pH의 低下는 精子運動性を 低下시킨

다는 Carr 等(1985)의 報告와, 正常尖體의 反應에 큰 影響을 미치지 않는다는 Meizel과 Deamer (1978), 그리고 Murphy와 Yanagimachi (1984)의 報告와 本 試驗의 結果와는 잘 一致되고 있다. 앞으로 液狀精液의 長期保存을 위해서는 pH의 變化를 줄이는 方法을 究明할 必要가 있다고 생각된다.

3. 液狀精液의 人工授精과 自然種付의 繁殖成績 比較

自然種付와 Bütschwiler稀釋液으로 9~16°C에서 3~4日間 保存한 液狀精液으로 人工授精한 後 繁殖成績은 Table 5에 나타난 바와 같다.

分娩率은 經產豚이 初產豚에 비하여 높게 나타났으며, 自然種付와 人工授精 사이에 差異가 없었다. 腹當 出生時 生存仔豚數는 經產豚이 初產豚에 비하여 높게

Table 4. Change of pH on the liquid boar semen diluted with four extenders and preserved at 9~16°C

Extender	Storage length of liquid semen (day) ¹			
	1	3	5	7
Bütschwiler+Hepes	6.7±0.04 ^a	6.6±0.02 ^a	5.9±0.06 ^b	5.5±0.07 ^c
Bütschwiler	6.9±0.05 ^a	6.8±0.02 ^a	6.1±0.05 ^b	5.7±0.09 ^c
Andro+Hepes	6.8±0.07 ^a	6.6±0.02 ^a	6.0±0.08 ^b	5.6±0.08 ^c
Andro	6.9±0.04 ^a	6.8±0.04 ^a	6.2±0.06 ^b	5.8±0.05 ^c

¹Mean±S.E. for 5 ejaculates from Large White boar. The pH of ejaculated sperm-rich fraction was 7.5±0.02.

^{a,b,c}Mean in the same row with different superscripts differ significantly (p<0.01).

Table 5. Comparison of artificial insemination of liquid semen with natural service for gilt and sow

Item	No. of pigs ¹	Farrowed		No. of pigs born alive per litter	Average pig weight at birth (kg)
		No.	%		
Gilt, AI	16	13	81.3	7.8±0.41 ^b	1.43±0.05
Gilt, natural service	24	20	83.3	7.5±0.47 ^b	1.39±0.04
Sow, AI	16	14	87.5	9.9±0.39 ^a	1.46±0.04
Sow, natural service	24	20	87.5	9.4±0.34 ^a	1.51±0.05

¹Gilts and sows were mated and inseminated twice. Liquid boar semen stored at 9~16°C in Bütschwiler extender for 3~4 days was used for AI. Sperm concentration was 50×10⁸ sperm/80ml in 100ml plastic bottle.

^{a,b}Means in the same column with different superscripts differ significantly (p<0.05).

나타났으나, 自然種付와 人工授精 사이에 差異가 없었다. 頭當 平均 生時體重은 經産豚과 初産豚, 그리고 自然種付와 人工授精 사이에 差異가 없었다.

以上の 結果는 經産豚과 初産豚에 自然種付와 液狀精液의 人工授精을 實施하여 受胎率과 産仔數를 比較한 結果 서로 差異가 없다는 Morretti 等(1976)의 報告와 비슷한 傾向을 나타내었다.

本 試驗의 結果를 綜合해 볼 때 Bütschwiler 稀釋液을 使用할 경우 9~16°C 範圍內에서 室內 溫度가 調節되지 않은 狀態下에서 돼지의 精液을 5~7일 정도 保存할 수 있음이 立證되었다.

IV. 摘要

本 試驗은 하루 동안의 溫度差가 9~16°C로 變化하는 室溫에서 돼지 液狀精液의 保存 可能性을 究明하고자 實施하였다.

Bütschwiler+Hepes, Bütschwiler, Andro+Hepes 그리고 Andro 稀釋液들을 比較한 結果 Bütschwiler 稀釋液이 가장 좋은 精子運動性과 正常尖體比率을 나타내었으며, Hepes의 添加는 液狀精液의 保存에 해로운 效果를 나타내었다. 採取直後 濃厚精子部分의 pH는 7.5였으며, Bütschwiler+Hepes, Bütschwiler, Andro+Hepes 그리고 Andro 稀釋液들의 pH는 各各 6.9, 7.5, 7.1 그리고 8.1이었으며, 稀釋精液의 pH는 保存 1日에 各各 6.6, 6.9, 6.7 그리고 6.9였고, 保存 7日에 各各 5.5, 5.7, 5.6 그리고 5.8이었다. Bütschwiler 稀釋液으로 稀釋된 精液을 9~16°C에서 3~4日 保存된 것으로 人工授精한 結果와 自然種付한 結果의 繁殖成績을 比較한 바, 分娩率, 腹當 出生

時 生存仔豚數, 生時體重에 있어서 初産豚과 經産豚 모두 人工授精과 自然種付 사이에 差異가 없었다. 그러나 經産豚은 初産豚보다 分娩率도 높고, 腹當 出生時 生存仔豚數도 많았다. 以上の 結果를 綜合해 볼 때 Bütschwiler 稀釋液으로 稀釋한 精液은 室內 溫度條件을 調節하지 않는 9~16°C의 室溫條件下에서 5~7日 保存하여 使用할 수 있음이 立證되었다.

V. 引用文獻

1. Carr, D. W., M. C. Usselman and T. S. Acott. 1985. Effects of pH, lactate viscoelastic drag on sperm motility : a species comparison. Biol. Reprod., 33:588-595.
2. Cheon, Y. M., C. S. Park, K. W. Seo and K. S. Lee. 1996. Study on the preservation of liquid boar semen with BF5 and Bütschwiler diluents. Korea J. Emb. Trans., 11(2):159-166.
3. Gottarai, L., L. Brunel and L. Zanelli. 1980. New dilution media for artificial insemination in pigs. Proc. 9th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I., Madrid, 3:275.
4. Meizel, S. and D. W. Deamer. 1978. The pH of the hamster sperm acrosome. J. Histo. Cyto., 26:98-105.
5. Moretti, M., A. Sassi and L. Dallari. 1976. Comparison of natural mating with artificial insemination on a modern pig farm. Anim. Breed. Abstr., 44:318.

6. Murphy, S. J. and R. Yanagimachi. 1984. The pH dependence of motility and the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. *Gamete Res.*, 10:1-8.
7. Park, C. S., Y. M. Cheon and Z. Xu. 1996. Comparison of preservation of liquid boar semen between lactose-egg yolk and Bütschwil-er diluents. *Korea J. Animal Reprod.*, 20(2) :101-109.
8. Pursel, V. G. and C. S. Park. 1987. Duration of thawing on post thaw acrosome morphology and motility of boar spermatozoa frozen in 5ml maxistraw. *Theriogenology*, 28:683-690.
9. Revell, S. G. and C. E. Glossop. 1989. A long-time ambient temperature diluent for boar semen. *Anim. Prod.*, 48:579-584.
10. Summermatter, P. 1984. Möglichkeiten zur Verbesserung der Konservierbarkeit von Ebersperma. *Verhandlungsber. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung, Hannover, FRG*, 72-75.
11. Weitze, K. F. 1991. Long-term storage of extended boar semen. In : Johnson LA and Rath D(ED.) *Boar Semen Preservation II*. Paul Pariey Scientific Publishers, Berlin and Hamburg, Germany, 231-253.
(접수일자 : 1997. 1. 20 / 채택일자 : 1997. 3. 15)