

개 자궁내 인공수정기에 의한 인공수정 후 산자생산

공일근¹ · 조성균 · 임용택 · 이상인 · 위섬하*
순천대학교 농과대학 동물자원과학과, 전남축산기술연구소*

Production of Pups Following Artificial Insemination by Canine Intrauterine Inseminator

I.K. Kong¹, S.G. Cho, Y.T. Im, S.I. Lee and S.H. Wee*
Department of Animal Science and Technology, Suncheon National University
*Chonnam Livestock Research Institute

ABSTRACT : This study was conducted to develop an intrauterine inseminator (IUI) to deposit of frozen semen into uterus and to evaluate the results obtained after artificial insemination by IUI. Two Japanese spitzs (2 to 4 years of age) were used as semen donors. Semen was collected by manual masturbation into sterile glass collection tubes and separated into 3 fractions with only the sperm-rich fractions retained for further examination. Sperm motility >70%, sperm concentration of 200 to 400×10⁶ cells/ml, and up to 15% abnormal and dead spermatozoa were used. Each ejaculate was centrifuged at 400×g for 5 min and poured out the suspended solution, and then diluted with 2 ml Tris-buffer which was consisted of 2.4 g Tris, 1.4 g citric acid, 0.8 g glucose, 0.1 µg/ml streptomycin, 100 IU/ml penicillin, 20 ml egg yolk to 100 ml mili-Q water (Ext I) or supplemented with 8 ml glycerol and 1 ml Equex STM paste to 100 ml (Ext II). The diluted semen was cooled to 5°C in cold room, where the temperature in the sample reached 5°C. Two h after beginning the cooling procedure, 2 ml of Ext II, also at 5°C, was added and mixed by gently reversing the tubes several times during 1 h. The final sperm concentration for freezing was approximately 50×10⁶ cells/ml. After equilibration, the semen was loaded into 0.5 ml straw and frozen on the liquid nitrogen vapour in styrofoam box. The straws were thawed at 70°C for precisely 6 sec. After thawing of each straw, the frozen semen can survived over 50% motility. All the females were inseminated twice with 1 ml of 25×10⁶ cells/ml concentration at 48 and 96 h after optimal insemination days estimated by vaginal epithelial cells staining. The semen was deposited into uterine body by IUI. The catheter of IUI can passed the cervix and deposited frozen semen in intrauterine body instead of vagina. Four out of five females inseminated were pregnant and three out of four pregnant female were delivered 11 pups. The results obtained indicated that Tris-buffer contained Equex STM paste could be frozen the canine semen successfully, and IUI can also be improved the pregnancy rate and reduced the total semen concentration per AI rather than that of vagina insemination.

Key words : canine, frozen semen, artificial insemination, intrauterine inseminator

서 론

동결정액을 이용한 개의 인공수정에는 임계적인 많은 요인에 대한 세심한 주의가 요구된다. 이러한 요인들에는 정액채취, 희석, 희석액, 평형, 동결보존, 저장, 용해, 수정적기판단 및 정액주입부위 등이 있다. 동결정액을 이용한 인공수정의 성공에 영향을 미치는

이러한 요인들에 대한 분석을 위하여 많은 연구가 이루어져 왔다^{6,10,17,19}. 또한 동결방법에 따른 체외영향에 대하여도 많은 연구가 이루어져 왔다^{11,14,15,20,23,26,27,30,33}. 국내에서도 개 동결정액제조에 관하여 methanol을 이용한 동결방법^{34,36}, Tris-buffer 완충액과 자동세포동결기를 이용한 완만동결법³⁵ 및 Tris-buffer 완충액과 간이급속동결법¹⁶에 관하여 보고된 바 있다. 동결정액을 이용한 인공수정은 인공수정당 정액수, 인공수정횟수 등 인공수정방법에 따라 수태율에 많은 차이를 나타

¹Corresponding author.

냈다^{7,8}. 개의 정액은 1회채취시 약 2~4억마리 정도의 정자가 채취되나 현재까지 일반적으로 이용되고 있는 질내정액주입법으로는 1회수정시 약 1~2억의 정자를 주입해야함으로 우수종견의 효율적인 이용과 대량번식을 위한 인공수정의 의미를 찾을 수 없었다. 개의 인공수정은 정액의 질내주입법이 처음으로 시도된 후에 많은 방법들이 개발되었으나^{1,29}, 자궁내 정액주입법은 Fougner 등¹²에 의하여 최초로 보고된 후 Fougner¹³에 의하여 개발되어 왔다. 그러나 지금까지 개발된 자궁내 정액주입기는 개의 자궁경관의 특수한 구조 때문에 일반적으로 쉽게 이용할 수 없는 단점이 있다. 즉, 자궁경관을 직접 잡을 수 없으므로 경관통과를 위해 주입기를 조절하기가 쉽지 않았다. 이와같은 문제점을 개선하고 동결정액의 효율적인 이용을 위하여 내시경을 이용한 자궁내 정액주입법을 개발하여 성공하였으나^{4,32}, 이러한 기구가 고가(약 1천만원대)로서 대중화하는데 성공하지 못하였다. 국내에서도 신 등³⁷이 내시경을 이용한 자궁내 정액주입에 의한 인공수정을 보고한 바 있다. 또한 외과적인 방법도 많이 이용되고 있으나 마취의 위험성과 계속적인 사용이 어렵다는 문제점, 그리고 수술을 원하지 않는 축주들의 욕구에 부합되지 않아 실용화에 한계점이 있다^{21,28}. 이와같은 문제점을 극복하기 위해 효과적이면서도 간단한 자궁내 인공수정기구를 개발한다면 1회/1두당 주입하는 정액량을 줄일 수 있을 뿐만 아니라 사용상에 편리함과 기자재의 저렴성 등으로 우수한 종견들의 효율적인 이용과 상업적인 응용이 가능하여 국제적인 동결정액의 무역을 통한 수입대체효과와 우수 종견들의 시간적, 공간적 이용성을 향상시킬 수 있을 것으로 판단한다.

본 연구는 동결정액의 제조방법의 정립과 동결정액을 이용한 자궁내 정액주입방법에 의한 인공수정기구의 개발 및 이를 이용한 인공수정성공의 가능성을 조사하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

공시동물의 관리와 정액채취

동결정액제조를 위하여 정액채취는 2~4년생의 Japanese spitz 수캐 2두와 인공수정용 암캐 6두를 공시하였다. 공시축은 순천대학교 동물사육장의 애견사육실에서 물과 사료(우성사료)를 자유급식 시키면서 독립cage에 각각 사육하였다. 정액채취를 위하여 수캐는 2~3일마다, 즉 주당 2회씩 마사지법으로 정액을 채취하였다¹³. 정액채취용 수캐는 정액채취실(약 30°C

이상으로 유지)로 옮기고 10 ml tube를 semen collection cone(AG-TEK, KANE Enterprises, S. Dakota, USA)에 연결시키고 음경을 마사지하여 발기와 돌출을 유도하여 돌출된 음경의 구선부위(bulbus glandis)를 잡고 압력을 가하면서 자연교미와 같은 자세를 취하면서 정액을 채취하였다. 이때 음경에 상처를 주지 않고 적당한 압력을 주면서 2차 fraction(sperm-rich fraction)만을 채취하여 400×g로 약 5분간 원심분리하여 상층액은 버리고 37°C의 2 ml Ext I으로 희석하여 warm stage위에서 정자의 생존율, 전진운동을 확인하고 다시 Hemocytometer로 정자수를 계산하였다.

동결보존과 정자검사

희석된 정액은 생존율, 전진운동을 및 농도 등을 조사하고 동결정액제조에 이용 가능여부를 판단하였다. Tris-buffer는 Table 1에서와 같은 조성으로 Ext I과 II로 제조하여 이용하였다. Ext I로 희석된 정액은 5°C cold room에서 약 2시간정도 방치하여 5°C까지 냉각시킨 후 같은 용량과 온도의 Ext II를 약 1시간에 걸쳐 희석 후 평형을 유도하였다. 평형 후 정액의 최종 정자농도가 50×10⁶ cells/ml 되게 조정된 후에 0.5 ml straw에 loading하여 액체질소표면 5 cm위에 올려놓아 예비동결을 유도하였다. 예비동결된 straw는 액체질소에 침적하여 goblet에 담아 LN₂ tank에 저장하였다. 용해는 70°C 물에 약 6초간 실시하였다. 용해한 정자는 warm plate위에서 정자의 활력도와 전진운동성을 검사하고 인공수정에 이용여부를 판단하였다.

자궁내 인공수정기구의 개발

자궁내 정액주입을 위한 인공수정기구는 질경, balloon sheath 및 injection catheter로 구성되어있다. 질경은 질과 자궁경관을 관찰하기 위해 빛을 제공할 수 있는 장치와 주입기를 조절하기 위한 injection catheter guard 장치를 제작하였다. 또한 balloon sheath는 인공수정시 자궁경관을 확인하고 자궁경관 입구의 질내부의 공간을 확보하기 위하여 질경 외부에 장착하여 최대한으로 자궁경관 가까운 질내부로 주입한 후 balloon sheath에 공기를 주입하면 경관 입구의 질내부가 부풀어 올라 자궁경관이 외음부쪽으로 당겨지게 됨으로 질경과 injection catheter의 이동 공간을 확보할 수 있을 뿐만 아니라 bolloon 자체가 자연교미시 음경의 bulbus glandis와 같은 작용을 하기 때문에 발정은 암캐를 진정시키는 효과가 있다. 자궁경관을 확인하고 injection catheter를 injection guard에 걸고 천천히 자궁경관을 통과시킨다. 자궁내 정액

Table 1. Composition of Tris-buffer extenders for canine semen freezing

Compounds	Extender I	Extender II
Tris	2.4 g	2.4 g
Citric acid, monohydrate	1.4 g	1.4 g
Glucose	0.8 g	0.8 g
Na-benzylpenicillin	0.06 g	0.06 g
Streptomycin sulphate	0.1 g	0.1 g
Egg yolk	20 ml	20 ml
Glycerol	---	8 ml
Equex STM paste	---	1 ml
D.W.	to 100 ml	to 100 ml
pH	6.53	6.48
Osmolarity	740 mOsm/kg	1370 mOsm/kg

(Rota 등, 1997)

주입기인 인공수정기구는 개의 크기에 따라 대, 중 및 소로 제작되었으며, 자연교미와 거의 같은 느낌을 받을 수 있게 제작되어 시술이 매우 효과적이다.

수정적기의 판단

개의 수정적기는 질세포의 염색에 의한 질상피세포의 형태변화로 판단하였다. 질세포의 염색을 위하여 Renton 등²⁵의 방법에 준하여 Eosin-methylene blue로 염색하여 질상피세포의 50~60% 이상의 cornification (각질화 및 세포핵의 상실) 일어났을 때를 1차 수정적기로 판단하고 48시간후 2차수정을 실시하였다.

자궁내 인공수정기에 의한 인공수정

수정적기로 판단되는 개는 후구부위가 약 20~30 cm 높게 위치하도록 보정하여 balloon sheather가 장착된 인공수정기구를 질의 자궁경관입구까지 최대한 삽입한다. 이때 air supplier에 50 ml 주사기를 연결하여 개의 크기에 따라 약 20~50 ml 공기를 주입하여 balloon 형성을 유도하여 충분한 질의 확장으로 자궁경관입구를 관찰할 수 있도록 공간확보를 하게하고 light source를 켜서 질내부 및 경관입구를 확인한다. 이때 동결정액을 용해하여 생존율을 조사한 후에 0.5 ml straw를 용해하여 0.5 ml Ext I을 희석하여 total volume이 1 ml가 되도록 희석한 후 2.5 ml syringe에 장착하여 대기시킨다. 이때 자궁경관부위의 복벽을 등쪽으로 밀어서 자궁경관의 입구를 보면서 catheter의 경관통과를 용이하게 움직인다. Balloon sheather의 작용으로 인공수정기구의 질내에서 공간확보가 용이하기 때문에 자궁경관 입구의 관찰이 매우 용이하다.

Catheter의 자궁경관 통과는 자궁체의 약 2~3 cm 이내까지만 통과될 수 있도록 조절하고 그 위치에서 catheter에 정액이 장착되어 있는 2.5 ml syringe를 연결시켜 천천히 정액을 주입한다. 정액주입 후 catheter를 천천히 후진시켜 뽑은 후에 약 5분간 주입할 때의 자세로 유지시킨다.

임신감정 및 산자생산

임신감정은 인공수정 후 약 30일령에 초음파기구로 임신여부를 확인하였다. 이렇게 임신이 확인된 개체는 개체관리를 하면서 분만실로 옮겨 분만유도를 하였다. 분만을 위한 분만실은 사양관리자만이 출입을 허용하고 사료와 물을 충분히 제공하였다.

결과 및 고찰

정액채취 후 평균 정자수 검사

정자검사를 위하여 Donor I, II로부터 각각 10회씩 3일간격으로 정액을 채취하여 조사한 결과는 Table 2에서와 같다. 본 연구에 사용된 sperm donors인 2~4년생 Japanese spitz의 정자생존율 및 전진운동율은 donor I, II에서 각각 85.0±5.8, 81.0±11.3%로 나타났으며, 이들의 정자농도는 donor I, II에서 3.5±2.9×10⁸ 및 2.8±2.4×10⁸ cells/ml의 농도를 보였다. 김 등³⁵은 5.07±2.32×10⁶ cells/ml로 상당히 낮은 정자수를 보고하였고, 김과 김³⁴은 3.54×10⁸ cells/ml로 유사한 결과를 보고하였다. 일반적으로 개 정액의 정자농도는 3~5×10⁸ cells/ml 정도로서 다른 축종에 비해 높지 않다. 그러므로 인공수정시 1회당 주입정자수를 줄일 수 있는 자궁내 정액주입방법의 개발이 시급히 요구되고 있으며, 또한 이러한 문제점을 해결하지 못한다면 우수한 종건의 효율적인 이용과 상업적인 접근이 불가능할 것으로 판단된다.

동결정액 희석액에 따른 동결정액의 생존율검사

동결정액의 제조는 Rota 등²⁶의 방법에 준하여 실

Table 2. Sperm concentration of two sperm donors after semen collecting

Donors	Rate of survival and progressive (%)	No. of concentration counted (Mean±S.E.)
Donor I	85.0±5.8	3.5±2.9×10 ⁸ cells/ml
Donor II	81.0±11.3	2.8±2.4×10 ⁸ cells/ml

*Semen collections were replicated 10 times in both donor I or II.

시하였는데 이때 이용한 희석액은 glycerol이 첨가되지 않은 Ext I과 8% glycerol이 첨가된 Ext II(Equex STM Paste)을 이용하였다. 채취한 정액의 희석액에 따른 동결보존 후 생존율은 Table 3에서와 같다. 동결정액 제조시 Ext II에 Equex STM Paste의 첨가 하였을때 semen donor에 따라 용해 후 정자의 생존율에 차이를 보였다(Donor I: 72.5% 및 Donor II: 62.5%). Rota 등²⁶은 완충액에 Equex STM Paste를 첨가하여 82.1±3.9% 운동성과 92.8±2.8% 정상적인 원형질막을 얻었다고 하였다. Thomas 등³¹은 Equex STM Paste의 완충액에 첨가는 용해후 활력과 장시간 생존능력을 향상시켜 개 동결정액제조에 매우 효과적인 것으로 판단된다고 하였다. Pursel 등²⁴은 Equex STM Paste의 성분은 완충액에 함유되어 있는 난황의 변형으로서 정자의 활성을 나타내는 것인 세정제 SDS 인 것으로 판단된다고 하였다. 난황과의 상호작용은 활성분자들의 용해화에 관련있을 수 있다는 가설은 단지 상충액이 완충액의 준비에 사용되었을 때만 관찰됨으로서 지지받았고, SDS를 원심분리전에 난황에 첨가하는 것이 후에 첨가하는 것보다 용해후 운동성에 매우 효과적인 영향을 미쳤다고 보고하였다²².

수정적기의 판단기술 정립

발정발현된 암캐의 정확한 수정적기를 판단하는 것은 인공수정의 성공에 결정적인 영향을 미칠 수 있다. 현재까지 외음부관찰 및 질상피세포의 각질화의 정도^{9,12,25}, 혈중 progesterone 농도측정^{5,10,37} 및 질의 전기저항을 측정하는 SiLi 3 Heat detector(Lima A/S, Sandnes, Norway)^{7,18}의 다양한 방법들이 이용되고 있다. 본 연구에서는 암캐의 수정적기를 판단하기 위하여 질상피세포 염색에 의한 각질화를 조사하여 인공수정을 실시하였다. Eosin-methylene blue 염색액으로 질상피세포를 염색하여 상피세포의 각질화(cornification)의 정도에 따라 60% 이상일 때 1차 수정적기로 판단하고 약 48시간 후에 2차 수정적기로 판단하여 수정하였다. 이와같은 방법으로 수정적기를 판단하였을 때 발정전기(Day 7: 외음부 혈액유출 발

견일을 Day 1으로 정함)에서는 noncornified cells 들이 대부분을 차지하고 있다. 그러나 Day 10-13에서는 cornified cells 들의 빈도가 50~60% 이상으로 변하여 있는 것을 확인할 수 있다. 이와 같이 질상피세포의 각질화의 정도에 따라 수정적기를 판단할 수 있다.

인공수정에 의한 산자생산

자궁내 동결정액의 주입법으로 5마리에 인공수정시켜 4마리가 임신되었고 그중에서 '99년 7월까지 3마리가 분만하여 11마리의 강아지를 생산하였다. 질내주입에 의한 인공수정에는 약 1~2×10⁸ cells/insemination의 농도로 2회 인공수정을 시켜 50% 이상의 비교적 높은 수태율을 얻었다는 보고가 있다^{2,3}. 또한 Farstad 등⁷은 150, 100, 75, 37.5×10⁶개의 동결정자를 자궁내 정액주입에 의한 인공수정으로 87, 85, 77 및 68%의 수태율을 보고하여 37.5×10⁶ cells/insemination 정자수로 임신은 가능하나 수태율이 약간 낮아지는 경향을 보였다. 이와 같이 주입 정자수를 적게 함으로써 정자의 이용효율의 향상은 물론 종견의 이용효율도 증가시킴으로서 동결정액을 이용한 인공수정이 시간적·공간적 개념을 초월하여 이용 가능하게 될 것이다. 이러한 자궁내 인공수정을 안정적인 방법으로 발전시키기 위하여 자궁내 인공수정기구인 Norwegian Catheter⁸, Foca⁷, 내시경과 catheter^{32,37}을 이용하였다. 그러나 Norwegian catheter와 Foca 인공수정기구는 자궁경관을 직접보지 않고 감각으로 catheter를 자궁내에 주입하기가 매우 힘들며, 내시경을 이용하는 방법도 자궁경관을 내시경으로 볼 수는 있으나 injection catheter의 조절이 어렵고 장비를 구입하는데 많은 비용(약 1천만원)이 소요된다는 단점이 있었다. 본 연구실에서 개발한 자궁내 정액주입 인공수정기구는 질경, balloon sheather 및 injection catheter로 구성되어 있어 사용하기에 매우 간단하면서 쉽고 효율적이다. 즉, 질내에 주입된 질경과 balloon sheather에 공기를 주입하여 질의 확장과 동시에 자궁경관을 시야에서 볼 수 있을 뿐만 아니라 질경입구쪽으로 경관을 잡아당기는 효과가 있다. 또한 balloon에 의하여 질이 확장됨으로써 경관입구의 공간확보가 가능해짐으로써 injection catheter의 조절이 용이하고 balloon이 수개의 구선과 같은 효과를 나타냄으로서 암캐가 인공수정시술동안 자연교미와 같은 느낌을 받을 수 있으므로 안정을 취할 수 있어 인공수정시술이 매우 용이하다. 이와 같이 자궁내 정액주입방법을 적용함으로써 궁극적으로는 1회/1두당 주입하는 정자수를 줄일수 있으므로 정액의 이용효율을 극대화시킬 수 있을 것으로 판단

Table 3. Survival rate of frozen canine semen cryopreserved by Tris-buffer supplemented with Equex STM Paste

Donors	No. of replicated	Survival rate of frozen semen (%)
Donor I	72.5	72.5
Donor II	62.5	62.5

된다. 현재 질내주입에 의한 인공수정은 1회 채취로 약 1~2두 정도 인공수정이 가능하여 효율적인 정액의 이용에는 한계가 있었다. 그러나 자궁내 정액주입 방법으로는 현재까지 1회사정으로 약 5~10마리의 인공수정이 가능하여 정액이용 효율의 향상뿐만 아니라 우수 종견의 이용효율의 극대화, 상업적 이용가능성, 시간적·공간적 제약극복 등 많은 긍정적인 효과를 기대할 수 있을 것이다.

결 론

본 연구는 개 동결정액을 이용한 인공수정시 질내 정액주입방법대신 자궁내 정액주입방법을 위한 자궁내 인공수정기구의 개발과 이를 이용한 인공수정후 얻은 결과를 평가하기 위하여 수행하였다. 정액채취를 위하여 2~4년생 Japanese spitz를 이용하였으며, 채취는 음경마사지법으로 음경의 발기를 유도하여 구선부분을 압박하여 사정을 유도하여 2차 sperm-rich fraction의 정액만을 회수하였다. 운동성 정자 70% 이상, 정자농도 $2\sim4\times 10^8$ cells/ml 이상 및 비정상 및 사멸정자 15% 이하까지의 정액만을 이용하였다. 사출정액은 400 \times g 5분동안 원심분리하여 상층액은 버리고 2 ml Ext I로 희석하였다. 희석된 정액은 5°C로 유지되고 있는 저온실에서 2시간에 걸쳐 5°C까지 냉각하였다. 5°C의 Ext I에 8% glycerol과 Equex STM Paste가 첨가된 Ext II를 1시간에 걸쳐 천천히 첨가, 희석하여 평형을 유도하였다. 동결을 위한 최종농도는 50×10^6 cells/ml로 조정하였다. 준비된 정액은 0.5 ml straw에 장착하고 styrofoam box에 담긴 액체질소 위에서 간이동결을 실시하였다. 용해는 70°C 온수에 정확히 6초동안 실시하였다. 모든 암컷은 1 ml 용량의 25×10^6 cells/ml의 농도로 수정적으로 판단된 후 48 또는 96시간째에 2회에 걸쳐 인공수정을 실시하였다. 정액은 자궁내 인공수정기구에 의해 자궁내에 주입하였다. 자궁내 인공수정기구의 catheter는 자궁경관을 통과하여 질내대신에 자궁내에 정액을 주입할 수 있다. 각 동결정액straw는 용해후 50% 이상의 운동성을 보였다. 인공수정시킨 5마리중 4마리가 임신하였고 그중 3마리가 11마리의 산자를 지금까지 생산하였다.

본 연구에서 얻어진 결과는 Equex STM Paste를 첨가한 Tris-buffer희석액은 성공적으로 개 정액을 동결 보존할 수 있으며, 또한 자궁내 인공수정기구는 임신을 개선시키고 1회 인공수정당 주입정자수를 질내 주입방법보다 크게 줄일 수 있었다.

감사의 글

본 연구에 사용된 Japanese spitz의 사육을 위해 충분한 사료를 공급해준 우재운 우정사료 순천지소장에게 진심으로 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Aamdal J. Investigation in the reproduction of the male blue fox. In *Riproduzione Animalee Fecondazione Artificiale, Scritti in onore di Telesforo Bonadonna*, Edizione Agricole, Bologna 1972; 1-6.
2. Anderson K. Fertility of frozen dog semen. *Acta Vet Scand* 1972; 13: 128-130.
3. Anderson K. Insemination with frozen semen based on a new insemination technique. *Zuchthyg* 1975; 1-4.
4. Concannon PW and Battiata M. Canine semen freezing and artificial insemination. *Current Veterinary Therapy X.W.B. Saunders, Philadelphia* 1989; 1253.
5. Eckersall PD and Harvey MJA. The use of a bovine plasma-progesterone ELISA kit to measure progesterone in equine, bovine and canine plasmas. *Vet Rec* 1987; 120: 5-8.
6. Farstad W and Anderson Berg K. Factors influencing in success rate of artificial insemination with frozen semen in the dog. *J Reprod Fertil* 1989; 39(Suppl): 289-292.
7. Farstad W, Fougner JA and Torres CG. The effect of sperm number on fertility in blue fox vixens (*Alopex lagopus*) artificially inseminated with frozen silver fox (*Vulpes vulpes*) semen. *Theriogenology* 1992a; 37: 699-711.
8. Farstad W, Fougner JA and Torres CG. The optimum time for single artificial insemination of blue fox vixens (*Alopex lagopus*) with frozen-thawed semen from silver foxes (*Vulpes vulpes*). *Theriogenology* 1992b; 38: 853-865.
9. Farstad W. The correlation between a cyclus coefficient based on cytological indices in the vaginal smear and circulating progesterone in oestrous bitches. *Zuchthygiene* 1984; 19: 211-217.
10. Ferguson JM, Renton JP, Farstad W and Douglas TA. Insemination of beagle bitches with frozen semen. *J Reprod Fertil* 1989; 39(Suppl.): 293-298.
11. Foote RH. Extenders for freezing dog semen. *Am J Vet Res* 1964; 25: 37-39.
12. Fougner JA, Aamdal J and Anderson K. Intrauterine insemination with frozen semen in the blue fox. *Nord Vet-Med* 1973; 25: 144-149.
13. Fougner JA. Artificial insemination in fox breeding. *J Reprod Fertil* 1989; 39(Suppl.): 317-323.
14. Hay MA, King WA, Gartley CJ, Leibo SP and Goodrowe

- KL. Canine spermatozoa-cryopreservation and evaluation of gamete interaction. *Theriogenology* 1997; 48: 1329-1342.
15. Ivanova-Kicheva MG, Subev MS, Bobadov ND, Dacheva DP and Rouseva LA. Effect of thawing regimens on the morphofunctional state of canine spermatozoa. *Theriogenology* 1995; 44: 563-569.
 16. Kong IK, Cho SG, Im YT and Lee SI. Production of pups following artificial insemination by intrauterine inseminator. *Korean J Emb Trans* 1999; 14(2: Suppl.): 43(P-3).
 17. Linde-Forsberg C and Forsberg M. Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *J Reprod Fertil* 1989; 39(Suppl.): 299-310.
 18. Moller O and Froyssedal K. Measurement of electrical resistance of the vaginal smear/mucous membrane in the blue fox (*Alopex lagopus*) and the silver fox (*Vulpes argenus*) as an aid in heat detection. *Scientifur* 1980; 4: 21-22.
 19. Morton DB and Bruce SG. Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. *J Reprod Fertil* 1989; 39 (Suppl.): 311-316.
 20. Oettle EE. Changes acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen. *Anim Reprod Sci* 1986; 12: 145-150.
 21. Olar TT. Using frozen semen: A guide for practitioners. *Veterinary Medicine* 1985; 22-30.
 22. Penfold LM and Moore HDM. A new method for cryopreservation of mouse spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1993; 99: 131-134.
 23. Province CA, Amann RP, Pickett BW and Squires EL. Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5°C. *Theriogenology* 1984; 22: 409-415.
 24. Pursel VG, Schulman LL and Johnson LA. Effect of Orvus ES Paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar sperm. *J Amin Sci* 1978; 47: 198-202.
 25. Renton JP, Munro CD, Heathcote RH and Carmichael S. Some aspects of the aetiology, diagnosis and treatment of infertility in the bitch. *J Reprod Fertil* 1981; 61: 289-294.
 26. Rota A, Strom B, Linde-Forsberg C and Rodriguez-Martinez H. Effects of equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. *Theriogenology* 1997; 47: 1093-1101.
 27. Silva LDM and Verstegen JP. Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology* 1995; 44: 571-579.
 28. Smith FO. Update on freezing canine semen. *Current Veterinary Therapy IX*, W.B. Saunders, Philadelphia 1986; 1243-1248.
 29. Starkow ID. Artificial insemination in the fox. *Anim Breed* 1935; 3: 287(Abstr.) [In Russian].
 30. Strom B, Rota A and Linde-Forsberg C. In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology* 1997; 48: 247-256.
 31. Thomas PGA, Surman V, Myers-Wallen VN and Concannon PW. Addition of sodium dodecyl sulphate to tris-citrate extender improves motility and longevity of frozen-thawed canine spermatozoa. *12th Int Cong Anim Reprod AI* 1992; 4: 1823-1825.
 32. Wilson MS. Non-surgical intrauterine insemination in bitches using frozen semen. *J Reprod Fertil* 1993; 47 (Suppl.): 307-311.
 33. Yubi AC, Ferguson JM, Renton JP, Harker S, Harvey MJA, Bagyenji B and Douglas TA. Some observations on the dilution, cooling and freezing of canine semen. *J Small Anim Pract* 1987; 28: 753-761.
 34. 김병진, 김용준. Methanol 이용 동결후 액체질소내 보존된 견 정액의 인공수정에 관한 연구. *한국임상수의학회지*. 1995; 12: 207-214.
 35. 김용섭, 김상근, 유상식, 정진호. 소형 개 정액의 단기보존과 동결보존후의 생존성에 관한 연구. *한국가축번식학회지*. 1999; 23: 127-132.
 36. 김용준, 박영재, 김병진, 유일정. 개에서 동결정액을 이용한 인공수정. -Methanol을 이용한 간이 동결방법-. *대한수의학회지*. 1994; 34: 851-855.
 37. 신남식, 문유식, 정동희, 김용준. 개에서 내시경을 이용한 동결정액의 인공수정. *한국임상수의학회지*. 1997; 14: 297-300.