

소형 개 정액의 단기보존과 동결보존후의 생존성에 관한 연구

김용섭 · 김상근 · 유상식 · 정진호

충남대학교 수의과대학

Studies on the Viability of Short-preserved Whole Semen and Frozen Semen in Small Species Dogs

Kim, Y. S., S. K. Kim, S. S. Yoo and J. H. Chung

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University

SUMMARY

This study was carried out to investigate the general characteristics such as volume, sperm concentration, sperm motility, sperm abnormality on whole semen, removed seminal plasma (RSP) semen and fractional semen of small dogs, and the effect of temperature and preservation time and cryopreservation on motility of whole and removed seminal plasma semen. Multiple ejaculates were collected from small dogs by the digital manipulation of penis.

1. Average sperm concentration, sperm motility and abnormal sperm rates of whole semen and RSP semen were $5.07 \pm 2.32 \times 10^6$ cells/ml, $95.42 \pm 2.65\%$, $4.42 \pm 0.157\%$ and $4.69 \pm 3.27 \sim 4.25 \pm 3.65 \times 10^6$ cells/ml, $91.17 \pm 3.85 \sim 88.52 \pm 3.85\%$, $6.57 \pm 0.43 \sim 5.54 \pm 0.52\%$, respectively.
2. Average semen volume per ejaculate, sperm concentration, sperm motility and abnormal sperm rate of 1st fractional semen were 0.92 ± 0.7 ml, $4.57 \pm 0.78 \times 10^6$ cells/ml, $10.72 \pm 3.21\%$ and $5.50 \pm 0.70\%$. Average semen volume per ejaculate, sperm concentration, sperm motility and abnormal sperm rate of 2nd fractional semen were 2.14 ± 0.19 ml, $2.01 \pm 0.12 \times 10^6$ cells/ml, $95.44 \pm 4.21\%$ and $4.31 \pm 0.53\%$. Average semen volume per ejaculate, sperm concentration, sperm motility and abnormal sperm rate of 3rd fractional semen were 2.66 ± 0.23 ml, $2.35 \pm 0.21 \times 10^6$ cells/ml, $90.71 \pm 2.63\%$, $6.33 \pm 0.91\%$, respectively.
3. Motility of whole semen and RSP semen were higher at 20°C than at 4°C or 37°C . When preservation temperature was 20°C , sperm motility were 98.32% at 1 hr, 92.15% at 5 hrs, 90.23% at 10 hrs, 82.08% at 15 hrs, 70.07% at 20 hrs, 60.02% at 20 hrs, 37.19% at 40 hrs, respectively.
4. Average sperm motility of frozen 2nd fraction semen and RSP semen were 33.3 ± 8.7 , $54.7 \pm 9.5\%$, respectively. Sperm motility was significantly higher in frozen 2nd fraction semen and RSP semen compared with control group.

(Key words : Semen freezing, RSP, Motility, Fraction semen)

I. 서 론

최근 경제성장과 더불어 애완동물의 사육수가 늘어 남과 동시에 번식을 위한 우수한 웅견이 필요하게 되어 외국으로부터 고가의 고급견 수입이 늘어나고 있다. 애완동물의 증식은 주로 몇 두의 고급견의 자연교미에 의해 이루어지고 있어서 단일품종만이 계속 증식되는 폐단은 물론 생식기 전염병의 감염 우려와 혈통검정이 안된 웅견을 교미견으로 사용했을 때 열성유전자의 출현 등 여러가지 폐단이 야기될 수 있다. 개에서는 동결정액의 사용이 아직도 실용화 단계에 이르지 못하고 있어 자연교미에 의한 수정목적으로 고가인 고급견의 수입이 증가하고 있으므로 이에 대체하기 위해서는 동결정액에 의한 인공수정이 절실히 요청되고 있는 실정이다. 개 정액의 동결은 가축정자와는 생리적으로 큰 차이가 있으며, 동결에 따른 손상으로 낮은 생존성과 수태율때문에 정액의 단기보존에 관하여 많은 연구가 이루어져 왔다. 그러나 단기보존은 보존기간이 짧아 이용자가 원하는 시기에 편리하게 이용할 수 없는 단점이 있어 생존성이 높은 동결보존법의 개발이 절실히 필요한 실정이다(Calson, 1954; Mann, 1964; Gunzel, 1986).

Province 등(1984), Davis 등(1963)과 Foote (1964)은 각각 개 정액을 20% egg yolk extender를 사용해서 2~4일, 4~8일간 냉각보존하여 50%의 운동성이 유지되었다고 보고하였으며, Seager와 Fletcher(1973)는 1~4일간 보존한 정액으로 수정시켰을 때 53%의 수태율을 보고하였다. Province 등(1984)은 개 정액을 5℃에 보존시 희석액내에 6% glycerol을 첨가하였을 때 정자의 운동성을 억제하나 3% glycerol을 첨가하였을 때는 정자의 운동성에 영향을 미치지 않으므로 첨가하지 않는 것이 좋다고 보고하였다. 개 정액은 제 1분획과 제 3분획에 존재하는 정장에 의해 희석된 신선정액의 인공수정시 수태율은 감소하지 않았으나 체외에서 정자를 보존할 때 정장에 의한 생존성 감소가 나타났다고 보고하였다(Maule, 1960; Arthur, 1975). 또한, Bahlau(1958), Harrop(1962) 등은 5.5~10%의 glycerine을 첨가한 난황구연산완충액, 구연산소다완충액, Ringer phosphate액 또는 이들의 완충액에 삼투압 유지의 목적으로 포도당을 첨

가한 완충액에 의해 정액의 급속동결 가능성을 보고하였으며, Harrop(1962)은 동결융해후에 45~50%의 정자 생존성을 보고하여 개 정액의 동결처리에 의한 장기보존의 가능성을 시사하였으며, Seager 등(1975)은 개 동결정액을 이용하여 임신 및 분만에 처음으로 성공하였다. 이러한 보고들을 종합해 볼 때 보고자간에 다소 차이가 있으나 주로 단기보존에 대한 연구들이 대부분을 이루고 있으며 동결보존한 경우는 생존율과 임신율이 낮아서 이의 개선이 필요한 실정이다.

개 정액의 정장성분은 정자에 유해한 효소를 가지고 있으며, 정장내에 유리되어 있는 원형질 소적(cytoplasmic droplets)은 많은 lysosomal enzyme를 포함하고 있어 이를 제거하지 않은 상태에서 정액을 보존할 경우 정자의 생존성에 유해한 것으로 알려져 있으나(Dott와 Dingle, 1968; Allison과 Hatree, 1970; Allen과 England, 1992; 김, 1993), 개 정액의 분획별 원정액의 보존과 정장을 제거한 정액에 희석액을 첨가한 후 동결 보존하려는 연구보고는 찾아 볼 수 없었다.

이에, 본 연구는 소형견 정액의 원정액과 정장제거 정액의 일반성상, 채취분획 정액의 단기보존시 정자의 생존성과 아울러 동결보존시의 정자의 생존성에 대해 조사하고자 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시동물

공시견은 건강하고 번식력이 있는 성숙한 수컷 소형종(요크샤테리어, 2~4세) 4두와 대조군으로 대형 잡종모견(진도견, 2~3세) 2두를 대상으로 구충과 예방접종을 실시하고 3주간 예비사육후 시험에 이용하였다.

2. 정액의 채취

정액은 수지 마사지법(Boucher 등, 1958)에 의해 정액을 분획별로 채취하거나 정자농도가 가장 높은 제 2 분획부분을 채취하여 시험에 이용하였다. 채취한 원정액은 정액의 일반적 검사와 원정액을 전처리후 단기 보존 및 동결시험에 이용하였다.

3. 정액의 단기보존

정액의 정장성분을 제거하기 위하여 생리식염수와

Tris-buffer (citric acid 0.006M, tris-hydroxymethyl aminomethane 0.02 M, glucose 0.005 M, egg-yolk 20 ml, streptomycin 2,000IU, D.W. 76 ml)로 각각 10배 희석한 후 실온에서 1,000 g로 10분간 원심분리하여 정장을 제거하였다. 정장을 제거한 정액은 난황구연산 + 4% glycerol액으로 30℃로 조정된 배양기내에서 희석하여 30분간 평형시킨 후 straw에 주입하였다. 냉각은 희석정액을 4℃로(0.3℃/min) 하강시켜 4℃에 보존하면서 1, 2 및 3일째에 각각 37℃ 배양기에서 5분간 용해후에 정자의 활력, 운동성, 형태적 검사를 실시하였다.

4. 정액의 동결보존

정액의 희석은 원정액과 생리식염수 또는 Tris-buffer액으로 10배 희석한 후 실온에서 1,000g로 10분간 원심분리하여 정장을 제거한 정장제거액을 각각 제 1차 희석액(20% 가열분유액, Seminan액 및 6% glucose액을 각각 3:1:1의 비율로 첨가하고 streptomycin 2,000IU/ml를 첨가)으로 정액을 25~30℃의 등온조건하에서 2배 희석 후 4℃까지 약 30분에 걸쳐 온도를 하강시켰다. 다시 제 2차 희석액(제 1차 희석액 + glycerin의 최종농도가 4%가 되도록 조제한 액)으로 10분 간격으로 희석후 30분간 평형시킨 다음 straw에 분주하여 동결하였다. 정액의 동결은 자동세 포동결기(Cell Freezer Forma Co., USA)를 이용하여 straw정액을 rack에 세워 예비동결하면서 autorecorder로 확인하였다. 동결방법은 실온에서 -4℃까지는 1℃/min., 4℃에서 -30℃까지는 0.2℃/min., -30℃에서 -38℃까지는 0.3℃/min.으로 동결후 곧바로 LN₂ container에 침지하였다. 생존성 검사는 동결 후 1개월간 보존된 straw를 실온에 30초간 방치후 37℃의 항온수조내 온수에서 용해 후 내용제를 제거하기 위하여 거꾸로 흔들어 10분간 방치한

후 sample을 slide glass에 옮겨 현미경하에서 활력, 생존정자수, 형태적 검사등을 실시하였다.

5. 결과의 통계분석

시험결과의 통계학적 분석은 SAS package를 이용하여 실시하였으며, GLM(General Linear Model) procedure를 적용하여 각 요인간의 유의차를 검정하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 정액의 일반성상 검사

정액은 원정액과 생리식염수와 Tris-buffer로 각각 정장을 제거한 정액을 37℃ incubator에서 배양했을 때 정자의 농도, 활력, 기형정자수 등의 일반 성상검사 결과는 Table 1과 같다.

처리하지 않은 원정액과 생리적 식염수와 Tris-buffer로 정장을 제거한 군으로 나누어 각각 일반 성상 검사를 실시했을 때 원정액의 경우 정자농도는 $5.07 \pm 2.32 \times 10^6$ cells/ml, 정자의 활력은 $95.42 \pm 2.65\%$, 기형정자수는 $4.42 \pm 0.15\%$ 로 나타났으며, RSP(saline)군은 정자농도는 $4.69 \pm 3.27 \times 10^6$ cells/ml, 정자의 활력은 $91.17 \pm 3.42\%$, 기형정자수는 $6.57 \pm 0.43\%$ 로 나타났으며, RSP(Tris-buffer)군은 정자농도는 $4.25 \pm 3.65 \times 10^6$ cells/ml, 정자의 활력은 $88.52 \pm 3.85\%$, 기형정자수는 $5.54 \pm 0.52\%$ 로 나타났다. 이러한 결과는 김(1993)이 냉각정액을 1~3일에 배양기에서 5분간 배양후 운동성을 검사했을 때 보존 1일에 정장제거군은 85.5%, glycerol-정장제거 복합처리군은 75.5%로서 대조군의 72.7%에 비해 유의한 운동성을 나타냈다는 보고와 유사한 결과였다.

2. 분획채취 정액의 보존성

Table 1. Characteristics of whole and RSP(saline and Tris-buffer) semen

Collection of semen	Sperm concent.* ($\times 10^6$ cells/ml)	Motile sperm(%)	Abnormal sperm(%)
Whole semen	5.07 ± 2.32	95.42 ± 2.65	4.42 ± 0.15
RSP(saline)	4.69 ± 3.27	91.17 ± 3.42	6.57 ± 0.43
RSP(Tris-buffer)	4.25 ± 3.65	88.52 ± 3.85	5.54 ± 0.52

* sperm concent.: sperm concentration,

소형 애완견의 정액채취에 있어서 분획별로 3기로 나뉘어 채취하였을 때 각 분획별 정액의 일반성상은 Table 2와 같다.

정액분획별 채취정액중 제 1분획에서는 정액량이 0.92±0.07ml, 정자농도는 4.57±0.78×10⁶cells/ml, 정자활력은 10.72±3.21%, 기형정자수는 5.50±0.70%로 나타났으며, 제 2분획에서는 정액량이 2.14±0.19ml, 정자농도는 2.01±0.12×10⁶cells/ml, 정자활력은 95.44±4.21%, 기형정자수는 4.31±0.53%로 나타났다. 또한, 제3분획에서는 정액량이 2.66±0.23ml, 정자농도는 2.35±0.21×10⁶cells/ml, 정자활력은 90.71±2.63%, 기형정자수는 6.33±0.91%로 나타났다.

이러한 결과는 개정액의 제2분획 정액의 활력이 가장 높고 기형정자수가 가장 적게 나타났다는 Allen과 England(1992)의 보고와 거의 일치하였다. 개정액의 정장성분은 유해효소와 lysosomal enzyme을 함유하고 있어 정장을 제거하지 않고 보존할 경우 정액의 생존성이 유해하여 보존성이 떨어지며, 또한 정액의 첫 번째와 세 번째 분획에 존재하는 정자에 의해 회색된

신선정액의 인공수정시 수태율은 감소하지 않았으나 체외에서 정자보존시 정장에 의한 생존성의 감소가 일어났다고 보고하였다(Mann, 1964; Dott와 Dingle, 1968; Allison과 Hatree, 1970; Allen과 England, 1992).

3. 정장제거 정액의 보존성

원정액과 정장을 제거한 정액의 단기보존성을 구명하기 위하여 정액을 4℃, 20℃ 및 37℃에서 보존했을 때 보존온도와 보존시간, glycerol 첨가 등에 따른 정자의 활력은 Table 3과 같다.

4℃와 20℃ 및 37℃에서 원정액과 정장제거 정액을 각각 보존했을 때 보존시간별 정자의 활력은 20℃의 경우 1, 6, 13, 24, 30 및 40시간에서 각각 98.51%와 98.32%, 86.32%와 92.15%, 83.71%와 89.20%, 74.29%와 82.08%, 52.98%와 72.07%, 15.45%와 60.02%, 2.41%와 37.19%의 정자활력을 나타내어 4℃와 37℃에 비해 높은 정자운동성을 나타냈다. 정장제거 정액은 4℃에서 약 20~24시간, 37℃에서 12~18시간 보존했을 때 90% 이상의 정자 운동성을 나타내어 정

Table 2. Semen characteristics of small type dogs by fractional collections

Collection methods	Volume(ml)	Sperm concent. (× 10 ⁶ cells/ml)	Motility (%)	Abnormal sperm(%)
The 1st fraction	0.92±0.07	4.57±0.78	10.72±3.21	5.50±0.70
The 2nd fraction	2.14±0.19	2.01±0.12	95.44±4.21	4.31±0.53
The 3rd fraction	2.66±0.23	2.35±0.21	90.71±2.63	6.33±0.91

Table 3. Survival rates according to preservation time and temperature on whole semen and RSP semen

Treatment (℃)		Survival rates(%) of preservation time(hrs)							
		1	10	15	20	30	40	50	72
Control ^A	4	95.34	83.71	74.29	52.98	15.45	2.41	0	0
	20	98.51	88.34	74.07	60.52	32.98	26.17	0	0
	37	92.07	34.15	19.42	9.79	0	0	0	0
RSP ^B	4	97.15	89.20	84.38	62.01	46.01	25.21	10.63	0
	20	98.32	90.23	82.08	70.07	60.02	37.19	0	0
	37	92.15	52.82	30.11	16.41	8.12	0	0	0
G + RSP ^B	4	97.53	90.27	85.02	69.23	54.37	40.12	28.53	20.01

* Values with different superscripts within column were significantly different (P<0.05).

** Control : Whole semen, RSP : Removed seminal plasma semen

Table 4. Survival rates of sperm on frozen-thawed whole semen and RPS semen

Treatment	Ejaculated semen	Sperm motility of frozen-thawed semen	
		Motility(%)	Dead sperm rates(%)
Control	85 ~ 90 ⁺⁺⁺	15.4 ± 5.2	84.6 ± 6.4
Frozen 2nd fraction	90 ~ 95 ⁺⁺⁺	33.3 ± 8.7	56.7 ± 8.1
Frozen RSP	90 ~ 97 ⁺⁺⁺	54.7 ± 9.5	45.3 ± 8.7

장제거 정액이 원정액에 비해 높은 정자 운동성과 장시간 보존성이 인정되었다. 4% glycerol 첨가 정장제거 정액의 단기보존시 운동성은 72시간 이후까지 계속되어 2~3일 단기보존후 인공수정에 이용할 수 있는 것으로 나타났다.

이러한 결과는 개정액의 보존시 35~37℃에 보존했을 때 약 20시간까지 정자생존이 가능하다고 보고한 Arthur(1975)의 결과와 유사한 성적이었다. Province 등(1984)은 개정액을 5℃에 보존시 회석액내에 6% glycerol을 첨가하였을 때 정자의 운동성을 억제하고, 3% glycerol을 첨가시에는 정자의 운동성에 영향을 미치지 않는다고 보고하였는데 본 시험성적과 일치되는 결과였다.

4. 소형견 정액의 동결보존후의 생존성

원정액과 제 2분획정액 및 생리식염수와 Trisbuffer로 회석후 원심분리에 의해 정장을 제거한 정액을 각각 제 1차 회석액과 제 2차 회석액으로 회석 후 30분간 평형시킨 다음 straw에 정액을 주입하여 자동세포 동결기로 동결 3개월 후 융해했을 때 정자의 생존율은 Table 4와 같다.

제 2분획 정액과 정장제거 정액을 각각 제 1차 및 제 2차 회석액으로 회석 평형시킨 후 동결 융해했을 때 정자의 생존율은 각각 33.3±8.7, 54.7±9.5%로서 대조군의 15.4±5.2%에 비해 높게 나타났다.

이러한 결과는 개정액의 동결 후 생존율이 40~65%이었다는 武石 등(1975), Harrop과 Foote(1965)의 결과와 유사한 결과이었다. 주로 소형견 보다는 대형견 정액의 동결후 생존성에 대한 연구보고가 주를 이루었으며 산업동물인 소 정액과는 상당한 차이가 인정되었다. 동결정액의 경우는 낮은 운동성과 수태율때문에 정액의 단기보존에 관한 연구가 주류를 이루고 있으나 정액의 동결보존이 유리하며 앞으로 생존성이 높은 동결기법의 확립을 위해 이에 대한 많은 연구가

이루어져야 할 것으로 판단된다.

IV. 적 요

본 연구는 소형견 정액의 원정액과 정장제거 정액의 일반성상, 채취분획별 및 단기보존시 정자의 생존성과 아울러 동결보존시의 정자의 생존성에 대해 조사하고 자 수행하였다.

1. 원정액과 정장제거 정액에 saline 및 Tris-buffer를 회석 후 각각 일반성상 검사를 실시했을 때 원정액의 경우 정자농도는 $5.07 \pm 2.32 \times 10^6$ cells/ml, 정자의 운동성은 $95.42 \pm 2.65\%$, 기형정자수는 $4.42 \pm 0.15\%$ 로 나타났으며, RSP(saline 및 Tris-buffer)군의 경우 정자농도는 $4.69 \pm 3.27 \sim 4.25 \pm 3.65 \times 10^6$ cells/ml, 정자의 운동성은 $91.17 \pm 3.85 \sim 88.52 \pm 3.85\%$, 기형정자수는 $6.57 \pm 0.43 \sim 5.54 \pm 0.52\%$ 로 나타났다.
2. 분획별 채취 전정액중 제 1분획에서는 정액량이 0.92 ± 0.7 ml, 정자농도는 $4.57 \pm 0.78 \times 10^6$ cells/ml, 정자활력은 $10.72 \pm 3.21\%$, 기형정자수는 $5.50 \pm 0.70\%$ 로 나타났으며, 제 2분획에서는 정액량이 2.14 ± 0.19 ml, 정자농도는 $2.01 \pm 0.12 \times 10^6$ cells/ml, 정자활력은 $95.44 \pm 4.21\%$, 기형정자수는 $4.31 \pm 0.53\%$ 로 나타났다. 또한, 제 3분획에서는 정액량이 2.66 ± 0.23 ml, 정자농도는 $2.35 \pm 0.21 \times 10^6$ cells/ml, 정자활력은 $90.71 \pm 2.63\%$, 기형정자수는 $6.33 \pm 0.91\%$ 로 나타났다.
3. 원정액과 정장제거 정액을 4℃와 20℃ 및 37℃에서 각각 보존했을 때 보존시간별 정자의 활력은 20℃의 경우 1, 6, 13, 24, 30 및 40시간에서 각각 98.51%와 98.32%, 86.32%와 92.15%, 83.71%와 89.20%, 74.29%와 82.08%, 52.98%와 72.07%, 15.45%와 60.02%, 2.41%와 37.19%의 정자활력을 나타내어 4℃와 37℃에 비해 높은 정

자운동성을 나타냈다.

4. 제 2분획 정액과 정장제거 정액을 각각 제 1차 및 제 2차 희석액으로 희석 평형시킨 후 동결 용해했을 때 정자의 생존율은 각각 33.3 ± 8.7 , $54.7 \pm 9.5\%$ 로서 대조군의 $15.4 \pm 5.2\%$ 에 비해 높게 나타났다.

V. 인용문헌

1. Allen, A. C. and G. C. W. England. 1992. Factors affecting the viability of canine spermatozoa. II. Effects of seminal plasma and blood. *Theriogenology*, 37(2):373-381.
2. Allison, A. C. and E. F. Hartree. 1970. Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilization. *J. Reprod. Fert.* 21:501.
3. Arthur, G. H. 1975. *Veterinary Reproduction and Obstetrics*, 4th ed. The English Language Book Society and Bailliere Tindall. England.
4. Bahlau, E. 1958. Untersuchungen über die Konservierung von Hundesperma. V. D. D. Dissertation University of Munich.
5. Boucher, J. H., R. H. Foote and R. W. Kirk. 1958. The evaluation of semen quality in the dog and the effects of frequency of ejaculation upon semen quality, libido and depletion of semen reserves. *Cornell Vet.*, 48:67-86.
6. Calson, W. D. 1954. The successful shipment of dog semen. *North Am. Vet.*, 35:448-449.
7. Davis, I. S., R. W. Brattion and R. H. Foote. 1963. The livability of spermatozoa at 5, 25 and 85°C in tris-buffered and citrate-buffered yolk-glycerol extenders. *J. Dairy Sci.*, 46:333-336.
8. Dott, H. M. and J. T. Dingle. 1968. Distribution of lysosomal enzymes in the spermatozoa and cytoplasmic droplets of bull and ram. *Exp. Cell Res.*, 52:523.
9. Foote, R. H. 1964. The effects of electrolytes, sugars, glycerol and catalase on survival of dog sperm stored buffered-yolk mediums. *Am. J. Vet. Res.*, 25:32-36.
10. Foote, R. H., L. C. Gray and D. C. Young. 1960. Fertility of bull semen stored up to four days at 5°C in 20% egg yolk extenders. *J. Dairy Sci.*, 43:1330-1334.
11. Gunzel, A. R. 1986. Semen collection, evaluation, preservation and artificial insemination in the dog. *Tierarzti Prax.*, 14(2):275-282.
12. Harrop, A. E. 1962. Artificial insemination in the dog. In the semen of animals and artificial insemination. J.P. Maule, ed. Commonwealth Agri. Bureaux, Farnham Royal, England.
13. Mann, T. 1964. The biochemistry of semen of the male reproduction. Tract Methuen, London, England.
14. Maule, J. P. 1960. *The Semen of Animals and Artificial Insemination*, Commonwealth Agri. Bur., Farnham. Royal, England.
15. Province, C. A., R. P. Ammann, B. W. Pickett and E.L. Squires. 1984. Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5°C. *Theriogenology*, 22:409-415.
16. Seager, S. W. J. and W. S. Fletcher. 1973. Progress on the use of frozen semen in the dog. *Vet. Rec.*, 92:6-10.
17. Seager, S. W. J., C. C. Platz and W. S. Fletcher. 1975. Conception rates and related data using frozen dog semen. *J. Reprod. Fert.*, 45:189-192.
18. 武石昌敬, 見上 孝, 兒玉幸夫. 1975. イヌの繁殖に関する研究 VIII. 凍結精液 授精 による受胎率について *日本家畜繁殖誌*, 22(1):28-33.
19. 김계성. 1993. 개 정액의 보존시 glycerol첨가 및 정장제거가 정자의 성상에 미치는 영향. *대한수의학회지*, 33(2):345-350.
(접수일자 : 1999. 4. 14. / 채택일자 : 1999. 6. 4.)