

듀록 종모돈의 정액성상, 동결·융해 후 정자의 생존성 및 테스토스테론의 농도에 미치는 봄과 여름의 영향

김흥기·한성욱¹·임재삼·권영안·양창범²·이영주¹·박창식[†]

충남축산위생연구소 축산시험장

Effect of Spring and Summer Influencing Semen Characteristics, Frozen-Thawed Sperm Viability and Testosterone Concentration in Duroc Boars

Kim, H. K., S. W. Han,¹ J. S. Lim, Y. A. Kewon, C. B. Yang,² Y. J. Yi¹ and C. S. Park[†]

Livestock Experiment Station, Chungnam Livestock Sanitation Research Institute

ABSTRACT

This study was carried out to investigate the effects of spring (March~May) and summer (June~August) influencing semen characteristics, frozen-thawed sperm viability and serum testosterone concentration in Duroc boars. Results of this study were as follows:

1. There were no significant differences in the semen volume, pH and sperm concentration of Duroc boars between spring and summer.
2. Sperm motility and normal acrosome of raw semen in Duroc boars did not differ significantly between spring and summer. However, motility and normal acrosome of frozen-thawed sperm were higher in spring season than in summer season($P<0.05$).
3. Serum testosterone concentrations in Duroc boars were 2.15 ng/ml in spring and 0.65 ng/ml in summer. Serum testosterone concentrations in spring were higher than those in summer ($P<0.05$).
4. In conclusion, when serum testosterone concentrations in Duroc boars were higher, frozen-thawed sperm viability were higher.

(Key words : Semen characteristics, Sperm viability, Testosterone, Duroc boars)

I. 서 론

액상정액 및 동결정액 제조에 관한 연구는 1970

년대부터 본격적으로 실시하기 시작하여, 1980년
대 초부터 유럽을 중심으로 액상정액을 이용한 인
공수정이 실용화되기 시작하였다. Netherlands (Fe-
itsma, 1995)의 경우 전체 번식 종빈돈의 75%가,

[†] Corresponding author : Division of Animal Science and Resources, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea, E-mail : Parkcs@cuvic.cnu.ac.kr

¹ 충남대학교 동물자원학부 (Division of Animal Science and Resources, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea)

² 농촌진흥청 연구운영과 (Division of Research Coordination, RDA, Suwon 441-707, Korea)

Norway (Hofmo, 1990)의 경우 전체 번식종빈돈의 71%가 인공수정을 실시하고 있다.

우리 나라에서의 돼지 인공수정은 1980년대 초 까지 단지 연구단계에 머물렀고 실용화되지 못하였으나, 1996년부터 액상정액을 이용한 인공수정이 빠른 속도로 보급되기 시작하여 1997년에는 전체 번식종빈돈의 58.0%가 인공수정을 실시하였다 (박, 1998).

돼지 동결정액을 이용하여 처음으로 성공적인 수정결과를 얻었다는 Polge 등 (1970)의 보고가 발표되자, 돼지 동결정액에 관한 연구가 많은 학자들에 의해서 수행되었다 (Graham 등, 1978; Larsson, 1978; Pursel, 1979; Johnson, 1980). Pursel과 Park (1987)은 lactose-egg yolk 희석액을 이용한 5 ml 스트로 동결정액 제조에 성공하였으며, 동결-융해 후 정자운동성은 37%, 정상침체 비율은 51%였다. Kim 등 (1989)은 국내에서 처음으로 lactose-egg yolk 희석액을 이용한 5 ml 스트로 동결정액 제조에 성공하였으며, 동결-융해 후 정자운동성은 49~57%, 정상침체 비율은 50~56%였다.

돼지의 인공수정에 있어서 정액의 질과 양은 상당히 중요한 요인들이다. 그러나 돼지의 정액성상 및 내동성에 미치는 요인들에 대해서는 지금까지 많은 연구가 이루어지지 않았다.

Hughes와 Varely (1980)에 의하면 돼지에서 정자는 생후 5~8개월부터 나타나며, 정액량은 18개월령까지 증가한다고 하였다. 이시기에 정액량은 200~400 ml 이며, 전체 정자수는 $20\sim 80 \times 10^9$ 이라고 보고하였다. Diehl 등 (1979)은 1회 사출된 정액량은 평균 150~200 ml, 정자수는 평균 $30\sim 60 \times 10^9$ 이라고 보고하였다. Von Rohloff (1973)의 보고에 의하면 1세부터 4세까지의 종모돈에서 정액량의 차이가 없다고 하였다. 정액량과 정자수는 5세 이후부터 감소하고 품종간에 차이가 많은 것으로 나타났으며, Large White와 같은 대형종이 정액량과 정자수가 많은 것으로 나타났다 (Hughes와 Varely, 1980).

환경조건이 종모돈의 수정능력에 미치는 영향에 관한 연구보고를 살펴보면 다음과 같다. 높은 주위 환경온도는 정자의 운동성과 농도를 감소시

킴으로 종모돈의 수정능력을 저하시킨다고 하였다 (Swiestra, 1970; Christenson, 1973). 고온충격을 받은 정자가 정상적인 수정능력을 회복하기 위해서는 정자가 정소상체에 머무는 기간이 10일, 정자형성주기가 34일이므로 60일이 소요되는 것으로 추정되고 있다. 심각한 정자형성의 손상은 정소의 온도가 40.5°C에 도달할 때 나타나며, 체온과 정소의 온도와는 밀접한 관계가 있으므로, 질병 등의 원인으로 체온이 상승하면 정소의 온도도 상승하여 수정능력을 상실하게 된다. 그러나 종모돈이 저온상태에서 사육될 때 정액의 질과 수정능력에 영향을 미치지 않는다 (Swiestra, 1970; Hughes와 Varely, 1980).

Colenbrander 등 (1978)은 돼지 태아의 혈청 중 테스토스테론의 농도가 교미 후 40~60일 사이에 0.47 ng/ml로 증가된 상태에 있다가 그후 감소했고, 출생시부터 2~3주령까지는 1.30 ng/ml로 높은 농도를 유지했다가 그후 감소하여 비교적 낮은 수준이 되었고, 18주령에서는 다시 1.77 ng/ml로 높은 농도를 나타낸다고 하였다. 박과 이 (1984)는 혈청 중 테스토스테론의 농도는 출생시 0.42 ng/ml의 수준을, 15 kg부터 30 kg까지는 0.11~0.09 ng/ml의 제일 낮은 수준을 유지하다가 50 kg부터는 1.15 ng/ml로 급격히 증가하였으며, 70 kg부터는 1.32 ng/ml로 증가하여 그 후부터는 비슷한 농도를 유지하였다고 보고하였다. Claus 등 (1971)은 100~140 kg (175~236일령)의 비거세 수퇘지와 거세 수퇘지에서 혈장 중 테스토스테론의 농도는 각각 9.6~16.1 ng/ml와 1.5~2.4 ng/ml이라고 보고하였다. Mariscal 등 (1996)은 완전히 성숙한 종모돈의 테스토스테론의 농도는 4.7~7.3 ng/ml이라고 하였다.

계절간에 정자생산에 차이가 있다는 것은 알려진 사실이다 (Hughes와 Varely, 1980). 그러나 지금까지 정확한 연구결과는 찾아보기 어렵다. 따라서 본 연구는 교잡종 생산시 부계통으로 많이 사용되는 듀록 종모돈의 정액성상, 동결-융해후 정자의 생존성 및 테스토스테론의 농도에 미치는 영향을 봄과 여름으로 나누어 구명하여 돼지의 산자능력을 향상시키는 기초자료를 얻고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시돈의 정액채취 및 검사

공시돈으로는 충남축산위생연구소 축산시험장에서 사육되고있는 12~15개월령의 Duroc 종모돈 5두가 사용되었다. 봄과 여름철의 정액성상 조사 및 동결정액 제조를 실시하기 위하여 종모돈의 정액채취는 7일 간격으로 오전 9~10시 사이에 실시하였다. 정액은 200 ml 보온병에 수압법으로 농후정자부분과 희박정자부분을 각각 분리하여 채취하였다. 동결정액제조에는 정자운동성과 정상침체의 비율이 80% 이상인 농후정자부분만 사용하였다.

2. 동결정액의 제조 및 용해

- 1) 보온병에 채취한 농후정자부분은 실온 (20~23°C)에서 2시간 동안 서서히 냉각시켰다.
- 2) 15 ml 튜브에 농후정자부분의 정액을 취하고 1500 rpm으로 10분간 원심분리하여 정장을 제거하였다.
- 3) 정장을 제거한 정자는 최종 정자농도가 $1.0 \times 10^9/ml$ 되도록 Table 1의 lactose-egg yolk (LEY) 1차희석액으로 5 ml 되도록 하여 재부유시켰다.
- 4) 1차 희석정액은 5°C 냉장실에서 2시간 보존

후 LEY +6% 글리세롤 희석액 (2차 희석액) 5 ml로 2차희석하여 총 정액량이 10 ml 되도록 하였다.

- 5) 상기와 같이 희석된 정액은 즉시 스트로 (Minitub GmbH, Landshut, Germany)에 5 ml 씩 나누어 주입하여 봉인하였다.
- 6) 주입 및 봉인된 스트로는 공기층을 가운데로 오게 한 후 aluminium rack 위에 수평으로 놓은 후 액체질소 표면에서 5 cm 떨어진 곳에 수평으로 놓아 20분간 동결시킨 후 -196°C의 액체질소통에 보관하였다.
- 7) 액체질소통에 보관된 스트로는 Pursel과 Park (1987)의 방법에 따라 실온에 놓여진 52°C 수조에서 40초 동안 용해하였다.

3. 정자의 평가방법

용해된 5 ml 스트로와 75 ml BTS 희석액 (Pursel과 Johnson, 1975)을 실온에서 혼합한 직후 0.5 ml씩 두개의 표본을 취하여 한 표본은 37°C에서 30분간 방치한 후 정자의 운동성을 조사하였다. 다른 한 표본은 침체평가를 위하여 1% glutaraldehyde로 고정하였으며, Pursel과 Johnson (1974)의 방법에 의하여 정상침체 (NAR acrosome)를 위상차현미경하에서 1000×로 조사하였다.

4. 혈액의 채취 및 혈청 시료의 추출과 분석

혈액은 종모돈 5두를 보정시킨 후 21 gauge 주사바늘을 사용하여 이정맥에서 계절별로 채혈하였고, 채혈한 것은 5°C로 냉각시켜 24시간 보관 후 4°C에서 3000 rpm으로 15분간 원심분리하여 혈청을 분리시켰으며, 혈청은 분석할 때까지 -20°C에서 냉동보존 하였다. 혈청시료의 추출은 혈청 50 μ l를 0.5 ml의 diethyl ether에 넣고 vortex한 후 수층과 유기 용매층이 분리가 되면 유기 용매층을 조심스럽게 모아 증발시키며 건조시켰다. 유기 용매가 완전히 없어지면 EIA buffer 50 μ l를 넣었다. 분석시료는 Enzyme Immunoassay (EIA)법으로 다음과 같이 실시하였다. EIA kit (Cayman Chemical, USA)를 washing buffer로 3회 세척한 뒤, 각 well에 testosterone 표준액 또는 sample을 각각 50 μ l

Table 1. Composition of diluents for boar sperm freezing

| Ingredient | Amount |
|-----------------|----------|
| First diluent | |
| Lactose hydrate | 11.0 g |
| Egg yolk | 25.0 ml |
| Distilled water | 100.0 ml |
| Second diluent | |
| Lactose hydrate | 11.0 g |
| Egg yolk | 25.0 ml |
| Glycerol | 6.0 ml |
| Orvus ES Paste | 1.0 ml |
| Distilled water | 100.0 ml |

씩 가한 후 testosterone acetylcholinesterase tracer와 testosterone antiserum을 각 well에 50 μ l씩 넣고 37°C에서 1시간 동안 흔들면서 반응시킨 후 washing buffer로 5회 세척한 후 Ellman's reagent를 넣고 1시간 동안 발색시켜 Microplate Reader (Molecular Device, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 찍었다.

5. 통계처리

본 연구로부터 얻은 자료는 SAS package (1988)를 이용하여 분산분석을 하였으며, 처리간의 유의성은 Student's t-test를 이용하여 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. Duroc 종모돈의 정액성상에 미치는 계절의 영향

봄과 여름동안에 Duroc 종모돈의 정액성상에 미치는 영향을 비교한 결과는 Table 2에 나타난 바와 같다. 정액량, pH 그리고 정자농도에 있어서 봄과 여름간에 차이가 없었다. 정액량, pH 그리고 정자농도에서 각각 150~200 ml, 7.3~7.8 그리고 $2\sim3 \times 10^8$ 이라는 Hafez (1987)의 보고와 비슷한 성적을 나타내었다.

2. 봄과 여름철에 Duroc 종모돈의 원정액 정자 및 동결-융해 정자의 운동성 및 정상첨체의 비교

원정액 정자에서는 Table 3에서 나타난 바와 같이 운동성 및 정상첨체에서 봄과 여름철간에 차이가 없었다. 그러나 동결-융해정자의 운동성 및 정상첨체는 봄철의 종모돈에서 생산한 정자가 여름철의 종모돈에서 생산한 정자보다 우수하였다 ($P<0.05$). 이상의 결과는 정자의 내동성은 종모돈의 개체차이, 품종, 계절 등에 의해서 영향을 미친

Table 2. Comparison of semen characteristics of Duroc boars during spring (March~May) and summer (June~August)

| Season | No. of boars | Semen volume(ml) ¹ | | | pH ¹ | | Sperm concentration ¹ | |
|--------|--------------|-------------------------------|---------------------|----------------------|--------------------|--------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| | | Sperm rich | Sperm poor | Total | Sperm rich | Sperm poor | Sperm rich ($\times 10^8$ /ml) | Sperm poor ($\times 10^6$ /ml) |
| Spring | 5 | 98.1 ± 12.04 | 83.2 ± 11.27 | 181.3 ± 14.80 | 7.25 ± 0.05 | 7.37 ± 0.04 | 3.6 ± 0.44 | 36.6 ± 10.62 |
| Summer | 5 | 74.0 ± 7.78 | 69.4 ± 8.47 | 143.4 ± 25.51 | 7.35 ± 0.09 | 7.40 ± 0.05 | 3.2 ± 0.34 | 46.6 ± 12.19 |

¹ Mean \pm S.E. for 3 ejaculates from each of 5 Duroc boars.

Table 3. Comparison of motility and normal acrosome of fresh and frozen-thawed sperm during spring (March~May) and summer (June~August) in Duroc boars

| Season | No. of boars | Fresh sperm ¹ | | Frozen-thawed sperm ¹ | |
|--------|--------------|--------------------------|--------------------|----------------------------------|------------------------------|
| | | Motility(%) | Normal acrosome(%) | Motility(%) | Normal acrosome(%) |
| Spring | 5 | 86.2 \pm 1.67 | 89.9 \pm 1.82 | 38.1 \pm 2.00 ^a | 37.2 \pm 1.97 ^a |
| Summer | 5 | 88.0 \pm 1.07 | 93.0 \pm 1.20 | 15.4 \pm 0.87 ^b | 17.6 \pm 1.33 ^b |

¹ Mean \pm S.E. for 3 ejaculates from each of 5 Duroc boars.

^{ab} Means in the same column with different superscripts differ significantly ($P<0.05$).

Table 4. Comparison of serum testosterone concentrations(ng/ml) between spring and summer in boars

| Breed | No. of boars | Spring (March~May) ¹ | Summer (June~August) ¹ |
|-------|--------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| Duroc | 5 | 2.15±0.32 | 0.65±0.05 |

¹ Mean±S.E. for 6 collections from each of 5 Duroc boars.

다는 Johnson (1985)의 보고와 잘 일치하고 있다.

3. 종모돈의 품종 및 계절간에 혈청 중 테스토스테론의 농도 변화

종모돈의 품종간 혈청 중 테스토스테론의 농도 변화를 살펴보면 Table 4에 나타난 바와 같이 Duroc종은 봄과 여름에 각각 2.15 ng/ml과 0.65 ng/ml으로 봄철 테스토스테론의 농도가 여름철의 농도 보다 높았다 (P<0.05). 본시험에서 테스토스테론 농도의 수준은 봄과 여름철에 동일한 종모돈을 이용해서는 처음으로 분석된 시험결과로 다른 성격과 비교 검토가 어려운 실정이다. 본시험의 테스토스테론 농도의 수준을 Colenbrander 등 (1978)이나 박과 이 (1984)의 테스토스테론 농도 수준과 비교해 볼 때 여름철을 제외하고는 모두 높았다. 그러나 Claus 등 (1971)이나 Mariscal 등 (1996)의 분석 수준보다는 낮았다. 이와 같은 차이와 기전을 밝히기 위해서는 앞으로 좀더 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합해 보면 듀록 품종에 있어서 봄, 여름의 두 계절간 정액량, pH 그리고 정자농도에서는 차이가 없었으나 정자의 내동성과 혈청 중 테스토스테론의 농도에서는 차이가 인정되었다.

IV. 요약

본 연구는 Duroc 종모돈의 정액성상, 동결-융해 후의 정자생존성 및 혈청 중 테스토스테론의 농도에 미치는 영향을 봄 (3~5월)과 여름 (6~8월)으로 나누어 실시한 바, 그 얻어진 결과는 다음과 같았다.

1. Duroc 종모돈의 정액량, pH, 정자농도는 봄과 여름철에 큰 차이가 없었다.
2. 봄철 및 여름철의 전체 정액량, 정자농도후부분

그리고 정자희박부분에서 봄과 여름간의 차이는 나타나지 않았다.

3. 원정액 정자에서는 운동성 및 정상침체에서 봄과 여름철간에 차이가 없었다. 그러나 동결-융해정자의 운동성 및 정상침체는 봄철의 종모돈에서 생산한 정자가 여름철의 종모돈에서 생산한 정자보다 우수하였다.
4. 듀록 종모돈의 혈청 중 테스토스테론의 농도 변화는 봄과 여름에 각각 2.15 ng/ml과 0.65 ng/ml으로, 봄철 테스토스테론의 농도가 여름철의 농도 보다 높았다(P<0.05).
5. 이상의 결과를 종합해 보면, 듀록 종모돈에 있어 정자의 내동성은 혈청 중 테스토스테론의 농도가 높을수록 우수한 것으로 나타났다.

V. 인용문헌

1. Christenson, R. K. 1973. Proceedings of the George A. Young Conference on Advances in Swine Reproduction, Lincoln, Nebraska. p.3.
2. Claus, R., Hoffmann, B. and Karg, H. 1971. Determination of 5 α -androst-16-en-3-one, a boar taint steroid in pigs, with reference to relationships to testosterone. J. Anim. Sci., 33:1293-1297.
3. Colenbrander, B., de Jong, F. H. and Wensing, C. J. G. 1978. Changes in serum testosterone concentrations in the male pig during development. J. Reprod. Fert., 53:377-380.
4. Diehl, J. R., Day, B. N. and Stevermer, E. J. 1979. Artificial insemination in swine. Pork Industry Handbook No. 64.
5. Feitsma, H. 1995. AI center management. Third International Conference on Boar Semen Pre-

- ervation. Mariensee. Germany. pp.187-191.
6. Graham, E. F., Crabo, B. G. and Pace, M. M. 1978. Current status of semen preservation in the ram, boar and stallion. Biennial Symp. Anim. Reprod. J. Anim. Sci., 47 (Suppl. II):80-119.
 7. Hafez, E. S. E. 1987. Reproduction in Farm Animals. Philadelphia, Lea and Febiger. p.190.
 8. Hofmo, P. O. 1990. Commercial swine AI with liquid semen in Norway. Second International Conference on Boar Semen Preservation. Beltsville., USA. pp.317-320.
 9. Hughes, P. and Varley, K. 1980. Reproduction in the pig : Fertility in the male. pp.187-195.
 10. Johnson, L. A. 1980. Artificial insemination of swine: Fertility with frozen boar semen. Int. Pig Vet. Congr. (Copenhagen) p.37.
 11. Johnson, L. A. 1985. Fertility results using frozen boar spermatozoa, 1970 to 1985. First International Conference on Deep Freezing of Boar Semen, Uppsala, Sweden. pp.199-222.
 12. Kim, H. K., Ko, M. S., Kim, I. C., Chung, H. K., Lee, K. W., Son, D. S., Kim, H., Chee, S. H. and Park, C. S. 1989. Deep freezing of boar semen in liquid nitrogen container. Korean J. Anim. Sci., 31(3):155-157.
 13. Larsson, K. 1978, Current research on the deep freezing of boar semen. World Rev. Anim. Prod., X IV:59-64.
 14. Mariscal, D. V., Wolfe, P. L., Bergfeld, E. G., Cupp, A. S., Kojima, F. N., Fike, K. E., Sanchez, T., Wehrman, M. E., Johnson, R. K., Kittok, R. J., Ford, J. J. and Kinder, J. E. 1996. Comparison of circulating concentrations of reproductive hormones in boars of lines selected for size of testes or number of ovulations and embryonal survival to concentrations in respective control lines. J. Anim. Sci., 74: 1905-1914.
 15. Polge, C., Salamon, S. and Wilmut, I. 1970. Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. Vet. Rec., 87: 424-428.
 16. Pursel, V. G. and Johnson, L. A. 1974. Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. Theriogenology, 1:63.
 17. Pursel, V. G. and Johnson, L. A. 1975. Freezing of boar spermatozoa : Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. J. Animal Sci., 40:99-102.
 18. Pursel, V. G. 1979. Advances in preservation of swine spermatozoa. In: H. W. Hawk(ed.) Beltsville Symposia III. Animal Reproduction, Allanheld, Osmun and Co., Montclair, NJ. pp.145-157.
 19. Pursel, V. G. and Park, C. S. 1987. Duration of thawing on post thaw acrosome morphology and motility of boar spermatozoa frozen in 5ml maxi-straws. Theriogenology, 28(5):683-690.
 20. SAS Institute Inc. 1988. SAS User's Guide : Statistics(version 6.03), SAS Inst. Inc., Cary, NC., USA.
 21. Swiestra, E. E. 1970. In Effect of disease and stress on reproductive efficiency in swine(Ed. by M. Lucas and J. F. Wanger), University of Nebraska Coop. Ext. Service, p.8.
 22. Von Rohloff, D. 1973. Ein Beitrag zur Beurteilung der taeglichen Spermienproduktion beim Ebern der Deutschen Landrasse. Zuchthygiene, 8:72-75.
 23. 박창식. 1998. 한국의 돼지 인공수정 현황과 문제점. 한국가축번식학회지, 22(3):17-31.
 24. 박창식, 이규승. 1984. 성장중인 수퇘지에 있어서 혈청중 LH, FSH, Prolactin, Testosterone, GOT 및 GPT의 농도변화. 충남대학교 농업기술연구보고, 11(1):103-107.
(접수일자: 2001. 2. 14. / 채택일자: 2001. 3. 9.)