

돼지정액의 동결에 관한 연구
I. 냉각속도와 희석액이 동결융해후 정자의 생존성과
정상첨체율에 미치는 영향

심금섭 · 김광식[†] · 서경덕 · 송해범¹
천안연암대학

Studies on the Freezing of Boar Semen
I. Effects of Cooling Rate and Extenders on Viability and
Normal Acrosome after Frozen-Thawed of Boar Semen

K. S. Shim, K. S. Kim[†], K. D. Seo and H. B. Song¹

Cheonan Yonam College

SUMMARY

This experiment was carried out to investigate the extender, cooling rate and concentration of glycerol for freezing of boar semen. The result obtained were summarized as follows:

1. Optimal cooling rate was 0.17~0.22°C/min from 25 to 5°C in LEY extender on the viability and normal acrosome after thawed.
2. The LEY extender was effective in protecting frozen boar semen from cold shock among the extenders($p<0.001$, respectively).
3. The sperm viability and normal acrosome rates after thawing was showed greater in the 3 or 4% of glycerol concentration than 2% in LEY extender.
4. Viability of sperm was higher when both 15mM of fructose and 3 or 4% glycerol were added to the LEY extender compared with other concentrations of fructose and glycerol were added it($p<0.001$).

(Key words : boar, freezing, extender, glycerol, viability)

서 론

동결보존한 정액을 이용한 돼지의 인공수정 비율은 소에 비하여 현저하게 낮다. 그 이유로는 동결융해후의 정자 성상이 액상 정액에 비하여 현저하게 떨어지기 때문인 것으로 되어 있다. 특히 돼지 정자는 가축의 정자 동결 보존을 위해 널리 사용되고 있는 glycerol에 대하여 독성을 나타내며,

저온에 대한 저항성이 낮고, 융해시 온도 및 희석액의 조건에 의해 동결 융해한 정자의 생존율과 정상 첨체율에 있어서 많은 영향을 받기 때문이다. 또한 동결하는 방법에 있어서도 희석액의 종류, 포장단위와 형태, 냉각속도 등에 의해서 차이가 생기며 이것이 결국 수태율과 산자수에 영향을 미치므로 동결한 돼지 정액이 인공수정에 활용되지 못하고 있는 것이 사실이다(Johnson 등, 1981; Johnson,

¹ 대구대학교(Daegu University)

[†] Correspondence : E-mail : etlab@yonam.ac.kr

1985).

동결한 돼지 정액이 실용적으로 활용되기 시작한 것은 Pursel과 Johnson(1975)이 pellet 형태의 동결 정액 제조법을 개발하면서부터이다. 이어서 straw(Westendorf, 1975)법, plastic bag(Rodriguez-Martinez 등, 1996)법 등이 개발되었고 이러한 동결방법을 활용하여 돼지 정액의 동결 보존성에 관련된 생존율, 정상 침체율 등의 개선을 위한 연구도 동시에 진행되어 왔다. 한편 정액의 동결과정에 있어서 상온의 정액을 5℃까지 여러 가지의 방법과 속도로서 냉각을 시키는데 그 속도가 동결 용해 후의 정자 생존율에 영향을 미치는 것이 Almlid와 Johnson(1988)이 돼지에서, Allen과 Almquist(1981)가 소에서 보고하고 있다. 또한 최근에는 돼지 정액을 동결보존함으로써 우수한 유전자원의 장기 보존과 정액에 의한 질병 전파의 차단 수단으로 점차적으로 각광을 받고 있다(Johnson 등, 2000).

따라서 본 연구에서는 현재 일반적으로 이용되고 있는 몇 종의 동결희석액과 냉각속도 및 glycerol의 첨가농도가 돼지 정자의 동결 용해후 생존율, 정상 침체율을 검토하여 현장에서 동결 정액을 액상 정액처럼 활용하고, 브랜드육 생산을 위해 필요한 정액의 동결 보존을 위한 동결 정액의 제조를 위한 표준 동결 용액, glycerol 농도 및 냉각속도를 결정하기 위해 실시하였다.

재료 및 방법

1. 동결정액의 제조

천안연암대학 유전자원센터에서 액상 정액 공급을 목적으로 사용하고 있는 종모돈을 이용하여 수압법으로 농후 정액을 분리 채취하여 30℃로 유지시켰다. 채취한 정액을 전처리 용액(증류수 리터 당 glucose 60g, sodium citrate 3.75g, NaHCO₃ 1.2g, EDTA-2Na 3.7g, streptomycin 1.0g, penicillin G 100만 단위를 첨가한 것)으로 동량 희석하여 25℃로 조절된 원심분리기에서 3,000rpm, 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 Table 1의 1차 희석액으로 최종 희석액(2차 희석액 포함)의 1/2량이 첨가되도록 희석하고 25℃로 설정한 program 동결기(FHK, ET1N, Japan)에 넣어 냉각준비를 하였다.

실험 1: 희석액과 냉각속도에 따른 용해후의 생존율과 정상침체율

각각 1차 희석액으로 희석이 완료된 정액을 동결기에 넣고 25℃에서 5℃까지 냉각을 개시하고, 5℃까지의 냉각시간을 20, 45, 90, 120, 180분으로 하였으며, 이 사이에 온도가 18, 13, 10, 8℃로 냉각되었을 때, 동일온도의 2차 희석액으로 1차 희석된 정액 비율의 10, 20, 30, 40%씩을 나누어서 첨가하여 1차, 2차 희석액의 비율이 동량이 되도록 하여 정자의 최종농도가 12×10⁸/ml이 되도록 하고, 5ml의 macrotube straw(Minitube, Germany)에 분주한 다음, plastic과 steel ball로 straw의 양쪽을 봉인하고 스티로폼 상자에 준비한 액체 질소 상면 5cm에서 20분간 방치하여 예비동결을 하였다. 이어서 액체 질소 중에 침지시켜 동결을 완료하였고 용해 후의 생존율, 정상 침체율을 검사하기 위해 1주일 이상 액체 질소 통에 보존하였다.

실험 2: Glycerol 농도에 따른 생존율과 침체 변화

LEY 희석액을 이용하여 glycerol의 첨가농도에 따른 생존율과 침체 변화를 검토하기 위해서, LEY

Table 1. Composition of extenders for semen dilution

Ingredients	Extenders for freezing semen(g/ml)		
	M-Soejima	LEY	BF5
1st extender			
Tes-N-Tris	1.20		1.2
Tris	0.4		0.2
Glucose	3.0		3.2
Lactose		11	
Sodium lauryl sulfate	0.16		
Catalase(1,659IU/ml)	0.0009		
Streptomycin	0.1		0.1
Gentamycin	0.0025		
Egg yolk	20 ml	20 ml	20 ml
2nd extender			
<i>1st extender + below</i>			
Glycerol	4.0 ml	6.0 ml	4.0 ml
Orvus ES paste	1.0 ml	1.5 ml	1.0 ml
Bovine albumin	0.1		
Caffeine	0.039		

희석액에 4, 6, 8%의 glycerol를 첨가하고 25℃에서 5℃까지의 냉각속도를 90분간으로 하여 실험 1과 동일한 방법으로 정액을 동결하였다.

2. 융해후의 생존율과 침체 변화 검사

각각의 희석액으로 동결한 정액을 47℃의 온수에서 10초가 녹인 다음, 35℃로 가온하여 준비한 95 ml의 NTS-1 융해액으로 희석하였다. 생존을 검사는 Maxwell과 Johnson(1997)의 방법에 준하여, 융해액으로 희석한 정액 500 μ l를 채취하여 1.5 ml의 tube에 담고 여기에 SYBR-14(Molecular Probe, USA, L-7011) 5 μ l(0.1mM)와 Propidium Iodide(PI) 3 μ l(2.4mM)를 각각 첨가하고 암실의 상온에서 20분간 방치하여 염색을 실시한 다음, 암실에서 염색된 정자를 10 μ l 채취하여 무형광 slide glass에 올리고 cover glass를 덮고 형광현미경하에서 400배로 200개의 정자를 관찰하여 녹색과 적색으로 염색된 정자를 계산하고 녹색으로 염색된 정자는 생존한 것으로, 적색으로 염색된 것은 사멸정자로 하여 생존율을 계산하였다.

침체 검사는 Maxwell과 Johnson(1997)의 방법에 준하여, 융해하여 희석한 정액 30 μ l를 무형광 slide glass에 올리고 cover glass를 이용하여 도말하고 상온에서 건조시킨 후, 0℃의 methyl alcohol에 침지시켜 2분간 고정하고, 다시 상온에 건조하였다. 건조시킨 slide glass에 150 μ l의 FITC-PSA(Sigma, L-0770)와 2.4mM의 PI 75 μ l를 떨어뜨리고 그 위에 투명 필름을 덮어 slide glass 전체에 염색액이

퍼지도록 하고 암실에서 20분간 염색을 하였다. 염색이 종료된 후, 투명 필름을 제거하고 slide glass를 증류수에 10분간 침지시켜 탈염색하고 풍건시킨 다음, 다시 antifading solution을 50 μ l 떨어뜨리고 slide glass와 같은 크기의 cover glass를 덮어 압착시킨 다음, 형광현미경하에서 1,000배로 200개의 정자를 관찰하여, 노란색으로 염색된 침체가 적색으로 염색된 두부에 밀착한 정자만을 정상적인 침체로 하고, 나머지는 손상된 침체로 판단하였다.

3. 통계처리

통계처리는 결과를 종합하여 분산분석(ANOVA)과 Fisher의 protected least significant difference (PLSD) test로 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 희석액과 냉각속도에 따른 융해후의 생존율과 정상 침체를

돼지 정액의 동결보존을 위한 용액으로 보고된 BF₅(Pursel 등, 1978b), LEY(Larsson 과 Einarsson, 1976a)과 M-Soejima(Soejima 등, 1983)를 이용하여 냉각속도를 다르게 하였을 때 돼지 정자의 동결융해후 생존율과 정상 침체율에 미치는 영향을 검토한 결과는 Table 2와 같다.

25℃에 5℃까지의 냉각속도를 20분으로 하였을 때, 다른 냉각속도에 비하여 생존율이 유의하게 낮았으며, 희석액중, M-Soejima의 경우는 생존율이

Table 2. Effects of extenders on the sperm viability and normal acrosome of post thawed frozen boar semen (mean \pm SE)

Extenders	Items	Cooling time(min) from 25 to 5℃				
		20	45	90	120	180
BF5	Viability**	18.5 \pm 6.6 ^c	34.4 \pm 4.0 ^{ab}	47.2 \pm 4.0 ^a	41.8 \pm 1.1 ^a	23.8 \pm 1.0 ^{bc}
	Acrosome*	31.7 \pm 1.3 ^{bc}	23.9 \pm 6.7 ^c	33.1 \pm 1.6 ^{bc}	46.3 \pm 2.7 ^a	38.3 \pm 2.1 ^{ab}
LEY	Viability**	31.3 \pm 5.8 ^b	54.7 \pm 3.7 ^a	56.3 \pm 5.2 ^a	55.9 \pm 0.9 ^a	50.2 \pm 1.6 ^a
	Acrosome*	40.9 \pm 1.1 ^b	30.7 \pm 3.9 ^c	41.6 \pm 0.6 ^b	50.2 \pm 1.6 ^a	51.7 \pm 1.9 ^a
M-Soejima	Viability**	10.0 \pm 0.9 ^b	47.0 \pm 3.9 ^a	45.3 \pm 2.1 ^a	51.7 \pm 1.2 ^a	46.0 \pm 8.5 ^a
	Acrosome*	20.9 \pm 1.5 ^b	28.5 \pm 8.4 ^b	45.0 \pm 0.1 ^a	46.5 \pm 1.5 ^a	41.2 \pm 1.2 ^a

Different superscripts within the same column indicate significant difference at $P<0.05$ (*) or $P<0.01$ (**).

10%에 지나지 않아서 유위하게 낮았다($p<0.01$). 반면에 냉각속도를 120분으로 서서히 냉각한 경우는 생존율이 증가되었으나 180분으로 분당 0.17°C로 냉각을 하면 오히려 생존율에 있어서 저하가 인정되었다. 정상 첨체율에 있어서는 생존율과 비슷한 경향을 나타냈지만 그 차이는 생존율에 비하여 낮았으며, LEY 희석액으로 분당 0.17°C를 냉각한 구에서 정상 첨체율이 51.7±1.9%로 가장 높게 나타났다. 따라서 생존율과 정상 첨체율을 고려해 볼 때, 90분에서 120분간으로 5°C까지 냉각하는 것(0.1~0.22°C/분)이 가장 좋은 결과를 나타냈다.

동물의 정액을 동결보존할 때 용해후의 생존율과 정상 첨체율에 미치는 요인을 구분하면, 내적인 요인으로는 정자의 종류, 정자세포의 특징, 정자세포막의 투과성 및 온도 영역에 따른 정자의 동결보존성 등이 있으며, 외적인 요인으로는 동결과정과 연관된 희석액의 조성, 동해방지제의 형태와 농도 및 첨가방법과 냉각속도, 용해 및 용해속도에 의해 영향을 받는 것으로 보고하고 있다(Westendorf 등, 1975; Farrant, 1980; Polge, 1980; Almlid와 Johnson, 1988; 정 등, 1999). Foote(1988)는 돼지 정자를 급속하게 냉각하면 정자의 생존율 저하, 정자 세포막내 지질의 유실, 세포막 투과성의 증진, 대사 활동성의 감소 등을 초래하여 용해후의 첨체 및 정자세포내의 미세구조가 손상을 받아 수정능력이 저하된다고 하였으며, Courtens 등(1988)은 급속하게 냉각을 하면 정자세포내의 전해질 농도를 변화시켜 생존율을 저하시킨다고 하고 있고, 또한 본 실험의 결과에서도 분당 1°C로 냉각한 경우가 그 외의 냉각속도로 냉각한 경우보다 월등하게 생존율이 저하되는 것을 보면, 정자 내부로의 동해방지제인 glycerol이 세포내로의 평형이 이루어질 수 있는 시간이 필요한 것으로 판단된다. 지금까지 보고된 정액 동결시험에서 얻어진 결과를 종합해 보면, 일반적으로 정액의 동결방법은 급속냉각(rapid cooling)과 완만냉각(slow cooling)으로 구분할 수 있으며, 가장 이상적인 냉각속도는 극단적으로 정자내의 용질농도의 증가를 최소로 억제시키면서 동결시 정자 내부의 유리화(crystallization) 형성을 방지하여 탈수현상을 적당하게 이루어지도록 하는 것이 바람직 한 것으로 되어 있어,

본 실험에서도 정자 내부로의 동해방지제 평형이 이루어지기 위해 필요한 시간이 반드시 요구되며 이것을 만족하지 못하면 용해후의 생존율 저하를 초래하는 것을 알 수 있다. 반대로 너무 늦은 냉각은 오히려 생존율에 불리한 것으로 나타나, Farrant(1980)이, 완만한 냉각은 정자 내부의 탈수현상이 가속화되어 정자 내부의 용질의 높아져 정자 세포막에 나쁜 영향을 주게 된다고 하는 결과로 설명할 수 있다. 또한 희석액의 조건이 동해방지제로 첨가한 glycerol의 평형에 영향을 미치기 때문에 희석액간의 생존율과 첨체의 변화에 영향을 미친 것으로 생각되어진다.

2. Glycerol 농도에 따른 생존율과 첨체 변화

LEY 희석액을 이용하여 glycerol의 농도 또는 glycerol 농도와 당(fructose)의 농도와의 관계를 검토한 결과는 Table 3과 4이다. Glycerol의 농도에 있어서는 3%의 첨가구가 가장 높은 생존율을 보였고(62.1±1.5%, $p<0.001$), 정상첨체율은 4%의 glycerol를 첨가한 구에서 75.0±2.4%로 가장 높았다($p<0.001$). 반면에 2%의 glycerol 첨가구는 다른 첨가구에 비하여 생존율과 정상 첨체율에서 가장 낮게 나타났다. 이것은, Almlid와 Johnson(1988)의 연구에서, glycerol 농도를 0~6% 첨가한 결과, 생존율에서는 3% 또는 4%의 첨가구가 높았으며, 정상 첨체율에 있어서는 3% 이하의 농도에서는 불리하다고 한 것과 일치하는 결과이다. 따라서 돼지 정자의 생존율과 정상 첨체율을 높이기 위해서는 3% 이상의 glycerol 첨가가 요구된다고 할 수 있

Table 3. Effects of glycerol concentrations in LEY extender on viability and normal acrosome of post thawed frozen boar semen

Glycerol(%)	% of mean±SE*	
	Viability	Normal acrosome
2	41.6±2.4 ^b	50.2±1.6 ^c
3	62.1±1.5 ^a	59.7±2.8 ^b
4	58.1±2.2 ^a	70.5±2.4 ^a

Different superscripts within the same column indicate significant difference at $P<0.001$ (*).

Table 4. The effects of concentrations of glycerol and fructose in LEY extender on viability and normal acrosome of post thawed frozen boar semen

Glycerol (%)	Fructose concentration (mM)	% of mean±SE*	
		Sperm viability	Normal acrosome
2	15.0	50.1±2.7 ^{cd}	43.3±1.1 ^e
	31.0	43.3±1.3 ^d	56.2±1.0 ^d
	62.5	43.6±0.6 ^d	53.6±1.2 ^d
	125.0	29.6±1.5 ^e	47.8±0.9 ^e
3	15.0	66.1±2.6 ^a	67.2±1.1 ^c
	31.0	60.0±4.6 ^{abc}	67.8±3.6 ^c
	62.5	61.0±2.5 ^{ab}	57.5±1.0 ^d
	125.0	61.2±2.3 ^{ab}	46.5±2.1 ^e
4	15.0	65.3±5.0 ^a	74.6±1.4 ^b
	31.0	58.1±2.1 ^{abc}	77.0±2.0 ^b
	62.5	57.4±5.5 ^{abc}	84.6±1.2 ^a
	125.0	51.6±1.6 ^{bcd}	63.6±3.1 ^c

Different superscripts within the same column indicate significant difference at $P<0.001$ (*).

다. 그러나 5% 이상의 glycerol은 오히려 생존율과 정상첨체율을 떨어뜨린다고 하고 있어(Graham과 Carbo, 1972), 4% 이상을 첨가하지 않는 것이 좋다고 판단된다.

Glycerol과 fructose의 농도를 다르게 하여 냉각을 하였을 때, glycerol 2%구에서는 fructose 농도 증가에 따라 유의하게 생존율이 저하되고, 125mM 구에서는 29.6±1.5($p<0.001$)로 다른 농도에 비하여 현저하게 낮았다. 그러나 정상 첨체율에 있어서는, 30~62.5mM구가 15mM 구에 비하여 높게 나타났으며, 반대로 125mM 구에서는 유의하게 저하되었다($p<0.001$). Glycerol 3 또는 4% 첨가구에서는 fructose 농도간에 생존율이 다소 차이를 보여 15mM 구가 가장 높고, 그 외의 농도에서는 비슷하였다. 정상 첨체율에 있어서는 3% glycerol 구는 31.0mM 구가, 4% glycerol 구는 62.5mM 구에서 가장 높았다. 따라서 정자의 생존율을 향상시키기 위해서는 3 또는 4%의 glycerol 첨가와 함께 15.0 mM의 fructose의 첨가(66.1±2.6%, 65.3±5.0%)가

좋으며, 용해후의 정상 첨체율을 위해서는 glycerol을 4%에 62.5mM의 fructose 첨가(84.6±1.2%)가 가장 좋은 것으로 판단되었다. 이러한 결과는 Salamon 등(1973a)이, 돼지 정액의 동결에 이용될 수 있는 당류로는 glucose, fructose 및 lactose가 있으며, 이러한 당류는 삼투압 조절 효과에 의해 정자 외부를 보호하고 glycerol과 상호작용에 의해 정자를 동해로부터 보호한다고 하는 보고를 재확인하는 결과라고 생각되며, 앞으로 그 외의 당류와 glycerol의 조합을 검토하여 돼지정자의 동결용해시 생존율과 정상 첨체율을 향상시킬 수 있는 당의 종류와 농도 및 이에 따른 glycerol의 농도를 결정할 필요가 있다고 판단되며 또한 이렇게 동결한 정자의 수정능력을 검토해야 할 것이다.

적 요

본 실험은 돼지정액의 동결보존을 위한 희석액과 냉각속도 및 동해방지제의 적정농도를 결정하기 위해 실시하였으며, 얻어진 결과는 다음과 같다.

1. 25℃에서 5℃까지의 냉각속도에서는 LEY 희석액에서 분당 0.17~0.22℃로 냉각하는 것이 생존율과 정상 첨체율에서 가장 높은 결과를 얻었다.
2. LEY 희석액이 BF5와 M-Soejima 희석액보다 정자를 동해로부터 보호하는 능력이 우수하였다.
3. LEY 희석액에 첨가하는 glycerol의 농도는 3 또는 4%가 2%의 glycerol을 첨가한 것보다
4. LEY 희석액에 15mM의 fructose와 3% 또는 4%의 glycerol 첨가구가 가장 높은 생존율과 정상첨체율을 나타냈다($p<0.001$).

참고문헌

- Allen CH and Almquist JO. 1981. Effect of bulk freezing straws of bovine spermatozoa in a programmed freezer on post-thaw survival. J. Anim. Sci., 53:1432-1436.
- Almlid T and Johnson LA. 1988. Effects of glycerol concentration, equilibration time and

- temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa in straws. *J. Anim. Sci.*, 66:2899-2905.
- Courtens JL, Ekwall H, Paquignon M, Nicolle JC and Plen L. 1988. Water some element contents in spermatozoa, before, during and after freezing. An electron microscopy study using analysis and X-rays microspectrophotometry. 11th Int. Cong. Anim. Reprod. Art. Insem. Dublin, 5:127-134.
- Farrant J. 1980. General observation on cell preservation. In: Ashwood-Smith MJ and Farrant J(eds.): Low Temperature Preservation in Medicine and Biology. Pitman Medical, Kent, pp:1-17.
- Foote RH. 1988. Preservation and fertility predictions. 11th Int. Cong. Anima. Reprod. Art. Insem. Dublin, 5:127-134.
- Graham EF and Carbo BG. 1972. Some factors influencing the freezing of boar spermatozoa. *Proc. 7th Int. Congr. Anim. Reprod. and A.I.* 2:1627-1632.
- Johnson LA. 1985. Fertility results using frozen boar spermatozoa: 1970 to 1985. 1st Int. Conf. on Deep Freezing of Boar Semen. Swedish Univ. Agric. Sciences, Uppsala. pp. 199-222.
- Johnson LA, Aalbers JG, Willems CMT and Sybesma W. 1981. Use of spermatozoa for artificial insemination. I. Fertility capacity of fresh and frozen spermatozoa in sows on 36 farms. *J. Anim. Sci.*, 52:1130-1136.
- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P and Maxwell WMC. 2000. Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 62:143-172.
- Larsson K and Einarsson A. 1976a. Fertility of deep-frozen boar spermatozoa. Influence of thawing diluents and of boars. *Acta. Vet. Scand.*, 17:43-62.
- Maxwell WMC and Johnson LA. 1997. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology*, 48:209-219.
- Polge C. 1980. Freezing of spermatozoa. In: Ashwood-Smith MJ and Farrant(Eds.): Low Temperature Preservation in Medicine and Biology. Pitman Medical, Kent, pp:45-64.
- Pursel VJ and Johnson LA. 1975. Freezing of boar spermatozoa: Fertility capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Anim. Sci.*, 40:99-102.
- Pursel VG and Johnson LA. 1978b. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Anim. Sci.*, 40:99-102.
- Rodriguez-Martinez H, Eriksson B and Lundeheim I. 1996. Freezing boar semen in flat plastic bags. Membrane integrity and fertility. In: Rath D, Johnson LA, Weitze KF, (Eds), Boar Semen Preservation III. *Proc. 3rd Int. Conf. Deep Freezing Boar Semen. Reprod. Dom. Anim.* 31 Blackwell, Berlin. pp.161-168(Suppl. 1).
- Salamon S, Wilmut I and Polge C. 1973a. Deep freezing of boar semen. I. Effects of diluent composition, protective agents and method of thawing on survival of spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.*, 26:219-230.
- Soejima A, Masuda H, Waide Y and Matsukawa Y. 1983. Effects of dilution rate, pellet volume, packed volume in aluminium-pack, straw volume and freezing methods on the survival of boar spermatozoa. *Jap. J. Anim. A. I. Res.*, 5:6-8.
- Westendorf P, Richter L and Treu H. 1975. Zur tiefgefrierung von ebersperma. Labor und Besamungsergebnisse dem Hulsnberger pailletten-Verfahren. *Dtsch. Tierarztl. Wschr.*, 82:261-267.
- 정영호, 서경덕, 김광식, 심금섭, 이장희. 1999. 동결보존한 돼지정액의 용해조건이 정자의 생존율과 침체변화에 미치는 효과. *한국수정란이식학회지*, 14:131-137.

(접수일: 2005. 1. 21 / 채택일: 2005. 3. 23)