

# 액상 정액의 보존 기간이 정자 기능 및 정자염색질 구조 분석에 미치는 영향과 인공수정 분만율과의 상관관계

유재원\*, \*\*\*, 이주형\*\*\*, 김인철\*\*\*, 이일주\*\*\*\*, 강 권\*\*\*\*, 민동수\*\*\*\*, 윤희진\*\*\*\*, 윤중택\*\*\*\*, 방명걸\*, \*\*, 류범용\*, \*\*, 정영채\*, 김창근\*, \*\*, 중앙대학교 동물자원과학과\*, 중앙대학교 생명환경연구원\*\*, 농촌진흥청 축산연구소\*\*\*, 다비육종\*\*\*\*, 한경대학교\*\*\*\*\*

## Effect of Storage Times on Sperm Function, Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) and Correlations Between Fertility and SCSA in Boars

J. W. Ryu\*, \*\*\*, J. H. Lee\*\*\*, I. C. Kim\*\*\*, I. J. Lee\*\*\*\*, K. Kang\*\*\*\*, D. S. Min\*\*\*\*, H. J. Yun\*\*\*\*, J. T. Yoon\*\*\*\*, M. G. Pang\*, \*\*, B. Y. Ryu\*, \*\*, Y. C. Chung\* and C. K. Kim\*, \*\*

Department of Animal Science & Technology\* and BET Research Institute, Chung-Ang University\*\*, National Livestock Research Institute, R. D. A., Korea\*\*\*, Darby Genetics Inc.\*\*\*\*, Hankyong National University\*\*\*\*\*

### ABSTRACT

This study was designed to evaluate the changes in sperm motility, viability, HOST(hypo-osmotic swelling test), IVP(*in vitro* penetration), SCSA(sperm chromatin structure assay) during storage of liquid semen collected from boars with different farrowing rates using AI, and to find the relationship between boar fertility through AI and sperm diagnostic parameters during semen storage. The results of HOST were significantly decreased according to the increasing of in semen storage days and the results of IVP were significantly decreased at 3 days of semen storage (P<0.05). The %Red was significantly different among the > 80%, 70-80% and <70% farrowing rate group at semen storage day 6(P<0.05). The correlation coefficients between the %Red and farrowing rate were increased according to the semen storage. In conclusion, these results suggest that the sperm parameters evaluated in these studies may be useful indicators to predict the fertility of AI and evaluate the semen quality in boars.

(Key words : SCSA, Fertility)

### I. 서 론

인공수정에서 정액의 수정 능력은 생산성에 영향을 미치는 중요한 요인으로 알려져 있다. 수

정 능력을 평가하는데 주요한 연관성이 보고된 정자의 운동성을 보다 객관적으로 관찰하기 위한 방법으로서 컴퓨터 시스템(computer assisted sperm analysis ; 이하 CASA)을 이용한

Corresponding author : C. K. Kim, Dep. of Animal Science and Technology, College of Industrial Sciences, Chung-Ang University, Ansung-Si Kyunggi-Do 456-756 Korea.  
Tel : 031-670-3026, E-mail : cckim7503@cau.ac.kr

정자의 운동성 분석법이 개발되었고 다양한 가축을 대상으로 유용성이 검증되고 있다. CASA를 이용한 정자의 운동성 분석을 통하여 토끼(Kirk 등, 2005) 소(AI-Qarawi 등, 2002), 돼지(Gil 등, 2005) 등에서 curvilinear velocity나 lateral head displacement와 같은 질적으로 향상된 정자의 운동성이 수정 능력과 높은 상관관계가 있음이 보고되었다. 근래에는 정자의 기능적 측면의 분석에 주안점을 둔 여러 방법들이 연구되고 있으며, HOST(hypo-osmotic swelling test, Pérez-Llano 등, 2001), IVP(Gadea 등, 1998), SCSA 등과 같은 정자의 기능 및 구조 분석 방법들의 유용성이 보고되고 있다. HOST는 정자 원형질막의 기능적 활성도를 분석하는데 간편하고 특별한 재료가 필요 없는 유용한 방법으로 보고되고 있다(Jeyendran 등, 1984 ; Vazquez 등, 1997 ; Drevius 등, 1996 ; Harrison 등, 1997).

체내에서 이루어지는 수정 과정은 정자의 수정능획득, 난자의 투명대와의 결합(zona binding), 첨체반응(acrosome reaction), 투명대 통과와 난황막과의 융합 등과 같은 일련의 과정으로 이루어진다(Harrison 등, 1997). 돼지에서 투명대가 제거된 햄스터 난자의 침투 능력(Hammitt 등, 1989 ; Berger 등, 1989, 1996), 투명대와의 부착반응(Ivanova 등, 1993), IVP(*in vitro* penetration, Vázquez 등, 1998) 등과 같은 정자의 기능 검사 방법들이 돼지 정자의 수정 능력을 평가하는 유용한 방법으로 보고되었으며, 특히 돼지의 신선 정액과 액상정액을 이용한 IVP 결과가 인공수정 시 종모돈의 수태율과 높은 상관성이 있다고 보고된 바 있다(Martínez 등, 1998 ; Gadea 등, 1998). 정자의 DNA 수준에서의 손상은 수정이 완료된 이후 수정란의 생존과 발달에 악영향을 미치고, 이는 수태의 실패 혹은 수태가 된 경우에도 정상적인 산자의 분만이 불가능한 결과를 초래할 수 있다(Sotolongo 등, 2003). 따라서 정자 DNA의 온전성과 손상 정도를 분석하는 것이 수정 능력을 평가하는데 있어서 중요한 평가 항목으로서 관심의 대상이 되고 있다(Fraser 등, 2004). 정자 DNA의 손상은

정자형성 과정 중 round spermatid가 elongated spermatid로 되는 DNA 응축 과정에서 발생하는 경우와 사출된 이후 여러 가지 환경 요인에 의하여 발생하는 것으로 알려져 있다. 정자의 DNA는 응축 과정을 완료함에 따라 외부 환경의 물리·화학적인 요인에 대하여 저항성을 갖는 구조로 바뀌게 되는데, DNA의 응축 정도가 미흡하거나 산화물과 같은 유해 요소에 과다하게 노출될 경우 정자 DNA의 변성이 초래되며, 변성된 DNA는 추후 복구될 수 없는 것으로 알려져 있다(Dadoune 등, 2003). DNA의 변성이 정자 기능 및 수정 능력에 미치는 영향을 알아보거나 gamma선을 조사하여 인위적으로 DNA의 변성을 야기 시켰던 연구에서 DNA의 변성이 야기되었던 정자에서 정상적인 운동성과 수정 및 수정란의 분할이 관찰되었다. 그러나 수정된 다수의 초기 수정란에서 세포 자연사(apoptosis)가 관찰되었고 수정란의 후기 발달에 심각한 악영향이 초래된 것으로 보고되었다(Bordignon 등, 1999 ; Ahmadi 등, 1999 ; Fatehi 등, 2006 ; Bebechaib 등, 2003). FCM(flow cytometer)을 이용한 SCSA는 다수의 정자를 보다 객관적으로 분석할 수 있는 방법으로 유용성이 검증되고 있다(Evenson 등, 1980, 1990). 최근에는 SCSA를 이용한 연구를 통하여 가축에서 정자 염색질의 안정성과 수태율과의 높은 상관성이 보고되고 있으며, 번식 저해 물질들의 동물 독성 시험 및 정액 보존법 개발 등의 분야에서 SCSA가 유용한 방법으로 활발히 이용되고 있다(Evenson 등, 1991, 1994, 2002 ; Spanò 등, 1998 ; Love 등, 2002 ; Angelopoulos, 1998). 본 연구는 인공수정에 사용되는 종모돈의 액상 정액을 대상으로 보존 일에 따라 정자의 운동성, 생존율, HOST, 미성숙 난자 침투 능력(IVP) 및 SCSA를 시행하여 인공수정에 이용된 정액의 분만율에 대한 예측도를 비교 분석하고 상관관계를 규명함으로써, 각 검사법간의 상호 보완성 여부와 인공수정 시 수태율 향상을 위한 기술 개발에 유용성을 알아보기 위하여 시행하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 공시 동물 및 정액

공시 종모돈은 돼지 인공수정 센터 2곳에서 보유하고 있는 15개월령 이상의 종모돈 중 인공수정 수태 성적이 존재하는 개체 38두(듀록 6두, 요크셔 2두, 랜드레이스 30두)를 공시하였고, AI센터로부터 채취 당일 BTS 희석액으로 제조된 시판용 액상정액을 공시하였다.

### 2. 정액의 처리

액상 정액은 17°C 보관고에 담아 실험실로 운반하였고 17°C에서 6일간 보존하면서 제조 당일, 3일 및 6일에 정액 성상 및 정자의 기능 검사를 실시하였다. SCSA를 위한 정액 sample은 각 보존일 별로 정액의 일부를 0.5 ml straw에 포장하여 -196°C에서 동결하여 SCSA를 분석하기 전까지 보관하였다(Evenson 등, 1994).

### 3. CASA에 의한 운동성 조사

정자 운동성 양상 분석(CASA ; computer-assisted sperm analysis)은 정액 1.5 ml를 취하여 37°C 수조에서 30분간 배양시키고 37°C로 예열된 Makler counting chamber(Sefi-Medical, Israel) 위에 정액 10 µl을 떨어뜨린 후 CCD 카메라(Toshiba, Japan)가 부착된 광학 현미경(Olympus, Japan)에 연결된 SAIS system(Medical Supply Co., Ltd., Korea)을 이용하여 분석하였다. 본 연구에서 사용된 CASA의 초기 설정은 Zeng 등(2001)의 방법에 준하여 실시하였다.

### 4. 정자의 생존율 측정

정자의 생존율은 Live/dead Sperm Viability Kit(Molecular Probes, USA)를 이용하여 Garner와 Johnson(1995)의 방법에 준하여 실시하였다.

SYBR-14의 stock solution은 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 1 mg/ml 되게 만들었으며 PI는 sodium bicarbonate가 첨가된 Tyrode's salt solution에 2 mg/ml로 만들었다. 각각 빛이 차단된 1.5 ml tube에 20 µl씩 분주하여 -20°C에 보관하여 사용하였다.

SYBR-14 Working solution은 stock solution을 1:100의 비율로 DMSO에 희석하여 최종 농도가 0.01 mg/ml 되게 만들었으며, 빛이 차단된 eppendorf tube에 20 µl씩 분주하여 -20°C 보관하고 사용 직전 암실에서 녹여 사용하였다.

생사 염색은 정액 500 µl를 취하여 1.5 ml tube에 넣은 다음 SYBR-14 working solution 2.7 µl와 PI 2 µl를 넣어 혼합하였다. 37°C의 heating block에 15분간 배양시킨 후 미리 36°C로 배양된 D-PBS(Gibco, BRL USA)로 2번 세척을 한 다음 10µl를 slide에 취하여 slide당 최소 200개 이상의 정자를 형광 현미경(H600 AFL 50/100 ; Hund Wetzlar, Germany)에서 관찰하였다.

살아있는 정자는 SYBR-14 염색에서 녹색으로 보이는 것, 죽은 정자는 PI 염색에서 붉은색으로 염색되는 것으로 구분하였다. 정자 생존율은 총 관찰된 정자 중 SYBR-14로 염색된 정자의 비율로 계산하였다.

### 5. 저장액 내 정자 팽창화 검사(HOST)

HOST는 17°C 정액 보관고에 저장된 액상정액을 대상으로 제조 당일, 3일, 6일에 Jeyendran(1984) 등의 방법에 준하여 실시하였다. 저 삼투압 용액은 BTS를 증류수와 1 : 3으로 희석하여 삼투압이 75 mOsm/kg 되게 용액을 제조하였다(Pérez-Llano 등, 2001).

정액을 1.5 ml eppendorp tube에 담아 500×g에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 버리고 삼투압 75 mOsm/kg으로 제조된 용액 1 ml과 정액 10 µl를 혼합하여 37°C의 항온수조 내에서 5분간 배양시켰다. 10 µl를 slide glass에 놓고 위상차 현미경하에서 200개 이상의 정자를 정자 미

부가 변화된 정자의 비율은 판독한 후 정자의 총수에서 미부가 swelling된 비율로 계산하였다 (Jeyendran 등, 1984).

### 6. 정자의 미성숙 난포란 침투 능력 검사(IVP)

도살 직후 회수한 난소를 8.5 g/l 의 sodium chloride, pencillin 또는 hostacillin을 첨가한 생리 식염수에 담아 실험실로 운반하였다. 미성숙 난포란은 18-gauge 주사기로 난소의 난포 직경이 2~6 mm인 포상 난포에서 난포액과 함께 채취하였고, 난소로부터 채취한 난포란은 modified PBS(4 mg/ml BSA, 0.34 mM pyruvate, 5.54 mM glucose)로 3~4회 세척하여 준비하였다. 보존 일령에 따른 액상 정액을 대상으로 modified M199(12% FCS, 0.91 mM sodium pyruvate, 3.05 mM glucose, 2.92 mM calcium lactate, 50 IU/ml penicillin G and 30 µg/ml streptomycin sulphate, pH 7.8)로 희석하여 50 × g에서 3분간 원심 분리하고 상층에 있는 운동성 정자를 분리한 후 200 × g에서 3분간 원심 분리하여 정자 괴를 2 × 10<sup>7</sup> cell/ml 농도로 재부유하였다. 체외수정은 2 × 10<sup>7</sup> cell/ml 농도의 정액에 well당 15개의 미성숙 난포란을 넣고 16-18시간 동안 39 °C, 100% 습도, 95% 공기, 5 % CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다(Martinez 등, 1996).

체외수정이 종료된 난포란은 난구세포와 투명대 표면에 부착된 정자를 제거하고 slide glass 위에서 ethanol : acetic acid (3 : 1 v/v)용액에서 24시간 이상 고정한 후 1% lacmoid 용액으로 염색하여 phase contrast microscope 위에서 400 배율로 검경하여 난자 내에 침투한 정자의 수를 조사하였다.

### 7. 정자 염색질 구조 분석(SCSA)

#### (1) 정자 처리

액체 질소에 동결하여 보관된 정액을 37 °C 온수에 15초간 용해하고 PBS액으로 희석하여

원심 분리 후 상층액을 제거하고 정자 농도가 1 × 10<sup>6</sup> 정자/ml 되게 재 부유하였다. SCSA를 위한 정자 처리와 염색은 Evenson (1990)의 방법에 준하여 실시하였다.

#### (2) Flow cytometer 측정

488 nm, 35 mW laser beam과 sorter sensor unit 이 장치된 FACS-Calibur Flow cytometer (Becton Dickinson, USA)를 사용하였다.

Parameter는 Forward Scatter, Side Scatter를 이용하여 초기 설정을 조절 하였고 Fluorescence 는 525 BP filter(green) 및 675 BP filter(red)와 550 DL을 이용하여 측정하였고, 분석 자료는 List mode file로 저장하였다.

#### (3) 자료 분석

자료 분석 전에 정자를 제외한 기타 세포들은 Red-green fluorescence cytogram에서 Fig. 1과 같이 제거하였고 구조적 이상을 갖는 Chromatin의 비율은 분석된 각각의 정자들로부터 얻어진 at 값[red(denatured DNA)/[green (native DNA) + red fluorescence]에 기초하여 계산하였다. 각각의 시료로부터 얻은 List mode file은 WinList 5.0 Software(Verity Software house, Inc. USA)

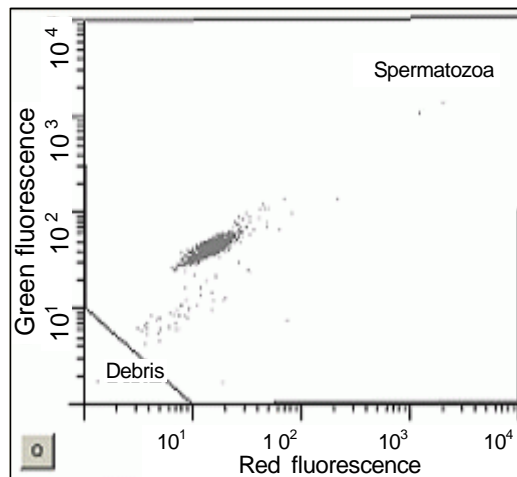


Fig. 1. Green vs. red fluorescence cytogram. Spermatozoa with abnormal chromatin show shifted red fluorescence.

를 이용하여 Fig. 2와 같이 COMP at, SD at, % R, % PeakR 값을 구하였다.

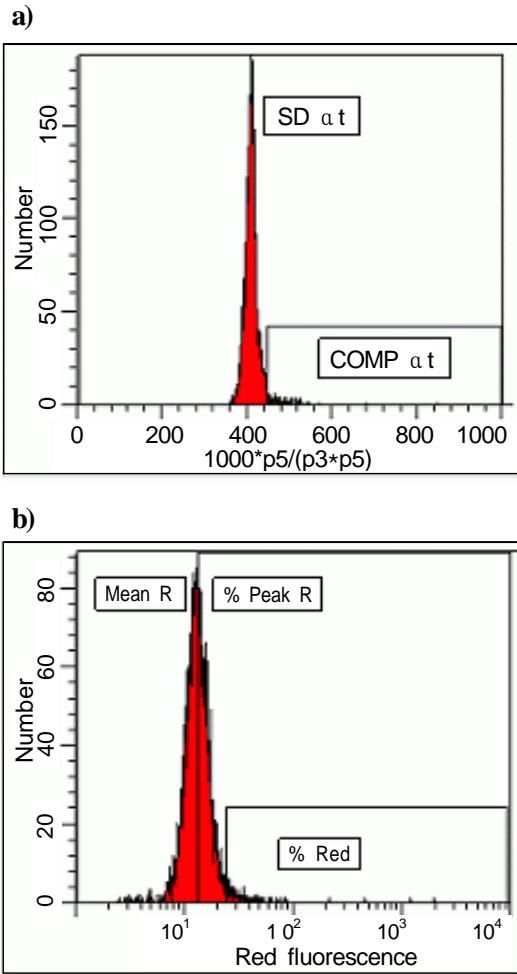


Fig. 2. Parameter calculate for each sample  
Parameters calculated for each sample :  
The at histogram : a) COMP at = % of spermatozoa with high red fluorescence and SD at = standard deviation calculated on the basis of the whole at histogram. The red fluorescence histogram : b) %Red = % of spermatozoa with high red fluorescence ; %PeakR = % of spermatozoa with high red fluorescence, counting started from peak channel ; MeanR = value calculated on the basis of entire histogram where  $MeanR = \frac{\sum (channel\ n \times number\ of\ spermatozoa\ in\ channel\ n)}{total\ number\ of\ spermatozoa}$  (Bochenek et. al., 2001).

at histogram(Fig. 2a)에서는 COMP at(at기준치 값의 주 집단으로부터 벗어난 high red fluorescence를 갖는 정자 비율)와 SD at(전체 at 기준치로 계산된 at 기준치의 표준 편차)를 계산하였고, red fluorescence histogram (Fig. 2b)에서는 % Red (red fluorescence 상에서 주 집단으로부터 벗어난 정자의 비율)와 % PeakR(peak channel로 부터 high red fluorescence를 갖는 정자의 비율)을 계산하였다(Bochenek 등, 2001).

### 8. 통계 분석

언어진 결과에 대한 통계적 분석은 SAS의 GLM(General Linear Model)을 이용하여 분석하였고, 각 항목간의 상관은 Pearson's Correlation Test를 실시하였고, 각 처리 구간의 유의성 검정은 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

## III. 결 과

종모돈을 인공수정 후 분만율에 따라 3개의 종모돈 군(80% 이상, 80-70% 및 70% 미만)으로 나누어 정액의 운동성 양상 분석(CASA), 정자 기능 검사 및 염색질 구조 분석(SCSA) 결과는 Table 1 과 2와 같다. 분만율에 따른 종모돈 군에서 운동성은 각각 83.5%, 81.9% 및 79%로 분만율이 낮아짐에 따라 정액의 운동성도 낮아졌으나 처리군 간에 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

HOST 결과 swelling된 정자는 각각 74.5%, 67.8% 및 55.0%로 분만율이 낮아짐에 따라 swelling된 정자의 비율도 낮아졌고, 분만율이 가장 낮은 종모돈 군(70% 미만)과 높은 종모돈 군(80% 이상)간에는 유의적 차이가 있었으나 (P<0.05) 70-80%인 종모돈 군은 다른 종모돈 군과의 유의성은 없었다(P<0.05). 미성숙 난포란 침투 검사(IVP)를 실시한 결과 난자당 침투 정자 수는 16.3, 11.8 및 5.9로 분만율이 70% 미만인 종모돈이 다른 종모돈 군들에 비해 유의적으로 낮았다(P<0.05). %Red 값은 종모돈 군별로 각각 0.9, 2.5 및 5.3으로 분만율이 낮아

Table 1. Comparison of semen characteristics among 3 boar groups with different farrowing rates

| Farrowing rate <sup>1)</sup><br>(n = boar, sow) | Motility (%)   | VCL( $\mu\text{m/s}$ ) <sup>2)</sup> | VSL( $\mu\text{m/s}$ ) <sup>3)</sup> | VAP( $\mu\text{m/s}$ ) <sup>4)</sup> | LIN <sup>5)</sup> | Viability(%)    |
|-------------------------------------------------|----------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------|-----------------|
| > 80 % (4,290)                                  | 83.5 $\pm$ 5.6 | 108.3 $\pm$ 16.7                     | 105.4 $\pm$ 49.6                     | 97.2 $\pm$ 39.9                      | 72.6 $\pm$ 6.8    | 91.5 $\pm$ 2.3  |
| 80 - 70 % (5,722)                               | 81.9 $\pm$ 4.6 | 121.5 $\pm$ 23.6                     | 76.4 $\pm$ 8.9                       | 78.7 $\pm$ 11.6                      | 61.5 $\pm$ 6.9    | 87.2 $\pm$ 5.6  |
| < 70 % (3,332)                                  | 79.0 $\pm$ 4.8 | 120.1 $\pm$ 35.8                     | 80.2 $\pm$ 16.3                      | 80.8 $\pm$ 17.6                      | 67.9 $\pm$ 7.0    | 84.0 $\pm$ 11.5 |

Values are means  $\pm$  SD. No significant differences for all parameters.

<sup>1)</sup> Sows were artificially inseminated with  $3 \times 10^9$  sperm at 12h and 24h after detection of estrus. Semen was used within 24h for analysis and 72h for insemination after collection ; <sup>2)</sup> Curvilinear Velocity ; <sup>3)</sup> Straight Line Velocity ; <sup>4)</sup> Velocity of Average Path ; <sup>5)</sup> Linearity.

Table 2. Comparison of HOST, IVP and SCSA among 3 boar groups with different farrowing rates

| Farrowing rate <sup>1)</sup><br>(n= boar, sow) | HOST<br>(%)                  | IVP<br>(sperm/oocyte)       | %Red                        | %Peak red                    |
|------------------------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| > 80 % (4,290)                                 | 74.5 $\pm$ 9.2 <sup>a</sup>  | 16.3 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup> | 0.9 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>  | 64.6 $\pm$ 12.2 <sup>a</sup> |
| 80 - 70 % (5,722)                              | 67.8 $\pm$ 2.1 <sup>ab</sup> | 11.8 $\pm$ 3.5 <sup>a</sup> | 2.5 $\pm$ 1.4 <sup>ab</sup> | 71.7 $\pm$ 7.3 <sup>a</sup>  |
| < 70 % (3,332)                                 | 55.0 $\pm$ 12.8 <sup>b</sup> | 5.9 $\pm$ 2.8 <sup>b</sup>  | 5.3 $\pm$ 3.8 <sup>b</sup>  | 65.2 $\pm$ 6.9 <sup>a</sup>  |

Values are means  $\pm$  SD.

<sup>1)</sup> Sows were artificially inseminated with  $3 \times 10^9$  sperm 12h and 24h after detection of estrus. Semen was used within 24h for analysis and 72h for insemination after collection.

<sup>a, b</sup> Means with different superscript in the column were significantly differ(p<0.05).

Table 3. Sperm movement characteristics according to days of semen storage

| Storage<br>(day)         | Motility(%)                  | VCL( $\mu\text{m/s}$ ) <sup>1)</sup> | VSL( $\mu\text{m/s}$ ) <sup>2)</sup> | VAP( $\mu\text{m/s}$ ) <sup>3)</sup> | LIN <sup>4)</sup> | Viability(%)                 |
|--------------------------|------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------|------------------------------|
| 0 (n = 12) <sup>5)</sup> | 81.7 $\pm$ 4.7 <sup>a</sup>  | 116.8 $\pm$ 23.5                     | 87.1 $\pm$ 30.6                      | 85.4 $\pm$ 24.8                      | 71.1 $\pm$ 8.1    | 87.7 $\pm$ 6.7 <sup>a</sup>  |
| 3 (n = 12)               | 73.0 $\pm$ 6.7 <sup>b</sup>  | 106.3 $\pm$ 24.7                     | 75.4 $\pm$ 17.4                      | 72.8 $\pm$ 15.7                      | 66.8 $\pm$ 6.8    | 79.3 $\pm$ 8.7 <sup>b</sup>  |
| 6 (n = 12)               | 58.9 $\pm$ 15.6 <sup>c</sup> | 100.3 $\pm$ 26.8                     | 71.2 $\pm$ 24.7                      | 69.5 $\pm$ 20.7                      | 69.8 $\pm$ 8.7    | 69.3 $\pm$ 12.6 <sup>c</sup> |

Values are means  $\pm$  SD.

<sup>1)</sup> Curvilinear Velocity ; <sup>2)</sup> Straight Line Velocity ; <sup>3)</sup> Velocity of Average Path ; <sup>4)</sup> Linearity ; <sup>5)</sup> Number of semen samples

<sup>a, b, c</sup> Means with different superscript in the column were significantly differ(P<0.05).

짐에 따라 변성된 DNA의 비율이 증가하였고, 분만율이 가장 낮은 종모돈 군과 높은 군간에는 유의적 차이가 있었으나(P<0.05), 분만율이 70- 80%인 종모돈 군은 다른 군과 유의적 차이가 없었다. %Peak red 값은 각각 64.6, 71.7 및 65.2로 처리군 간에 유의적 차이는 인정되지 않았다.

정액의 보존 일에 따른 운동성과 생존율을

측정한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같이 운동성은 보존 일이 0, 3, 6일일 때에 81.7%, 73.0% 및 58.9%로서 유의적으로 감소하였다(P<0.05). VCL, VSL, VAP, LIN, ALH는 보존 일이 경과함에 따라 감소하였으나 통계적 유의성은 인정되지 않았다. 정액의 생존율은 제조 당일 87.7%에서 3일 79.3% 및 6일 69.3%로 정액의 보존 일이 증가함에 따라 유의적으로 감

소하였다( $P<0.05$ ). 정액의 보존에 따른 정자 기능 검사와 SCSA 변화는 Table 4와 같다. HOST 결과는 액상 정액 제조 후 0, 3 및 6일에 65.3%, 49.7% 및 31.9%로 보존 일이 증가함에 따라 유의적으로 감소하였다( $P<0.05$ ). IVP 결과에서 난자당 침투 정자 수는 제조 당일에 11.3, 3일 6.5 및 6일 3.8로 보존 후 3일째에 유의적으로 감소하였고( $P<0.05$ ), 제조 후 3일과 6일의 정액에서는 유의적인 차이는 인정되지 않았다. SCSA 결과는 보존 일이 증가함에 따라 % Red 값(3.6, 3.7 및 4.7)은 증가하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 인정되지 않았다. %Peak red 값도 제조 당일, 3일 및 6일에 65.1, 62.3 및

84.3으로 보존 일에 따라 증가하는 경향을 보였다. 분만율에 따른 종모돈 군에서 정액의 보존에 따른 운동성, 생존율, 정자 기능 검사 및 SCSA의 변화는 Table 5에서 보는 바와 같다. 정자의 운동성은 보존 일에 따른 종모돈 군간의 유의적 차이는 없었다. 정자의 생존율은 보존 0일 및 3일에서 분만율에 따른 종모돈 군간에 유의적인 차이는 없었으나, 보존 후 6일에서 분만율이 80% 이상, 80-70% 및 70% 미만인 종모돈 군에서 각각 79.3%, 67.6% 및 59.0%로 분만율이 80% 이상인 종모돈 군과 70% 미만인 종모돈 군간에 유의적 차이를 보였다( $P<0.05$ ).

Table 4. HOST and SCSA according to days of semen storage

| Storage (day) | HOST (%)                 | IVP (sperm/oocyte)      | %Red                    | %Peak red                |
|---------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| 0 (n = 12)    | 65.3 ± 10.8 <sup>a</sup> | 11.3 ± 4.9 <sup>a</sup> | 3.6 ± 3.4 <sup>a</sup>  | 65.1 ± 1.7 <sup>a</sup>  |
| 3 (n = 12)    | 49.7 ± 9.3 <sup>b</sup>  | 6.5 ± 2.5 <sup>b</sup>  | 3.7 ± 3.2 <sup>a</sup>  | 62.3 ± 3.9 <sup>a</sup>  |
| 6 (n = 12)    | 31.9 ± 11.3 <sup>c</sup> | 3.8 ± 11.7 <sup>b</sup> | 4.7 ± 10.8 <sup>a</sup> | 84.3 ± 11.4 <sup>a</sup> |

Values are means ± SD.

<sup>a, b, c</sup> Means with different superscript in the column were significantly differ( $P<0.05$ ).

Table 5. Sperm parameters and SCSA among 3 boar groups with different farrowing rates according to days of semen storage

| Storage (day) | Farrowing rate <sup>1)</sup> | Motility (%)             | Viability (%)             | HOST (%)                 | IVP <sup>2)</sup>       | %Red                    | %Peak red                 |
|---------------|------------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|
| 0 (n=12)      | > 80%                        | 83.5 ± 5.7 <sup>a</sup>  | 91.5 ± 2.4 <sup>a</sup>   | 74.5 ± 9.1 <sup>a</sup>  | 16.3 ± 3.1 <sup>a</sup> | 1.0 ± 0.3 <sup>a</sup>  | 64.6 ± 12.2 <sup>a</sup>  |
|               | 80-70%                       | 81.9 ± 4.0 <sup>a</sup>  | 86.8 ± 5.0 <sup>a</sup>   | 66.4 ± 3.5 <sup>ab</sup> | 11.2 ± 3.2 <sup>a</sup> | 3.3 ± 1.5 <sup>ab</sup> | 65.4 ± 15.5 <sup>a</sup>  |
|               | < 70%                        | 79.0 ± 4.9 <sup>a</sup>  | 84.0 ± 11.5 <sup>a</sup>  | 55.0 ± 12.8 <sup>b</sup> | 5.9 ± 2.8 <sup>b</sup>  | 6.8 ± 4.8 <sup>b</sup>  | 65.2 ± 6.9 <sup>a</sup>   |
| 3 (n=12)      | > 80%                        | 76.9 ± 6.1 <sup>a</sup>  | 85.0 ± 7.0 <sup>a</sup>   | 60.5 ± 7.0 <sup>a</sup>  | 8.5 ± 3.2 <sup>a</sup>  | 1.1 ± 0.4 <sup>a</sup>  | 61.6 ± 9.0 <sup>a</sup>   |
|               | 80-70%                       | 69.4 ± 5.9 <sup>a</sup>  | 75.4 ± 9.8 <sup>a</sup>   | 47.4 ± 3.0 <sup>b</sup>  | 6.6 ± 3.2 <sup>a</sup>  | 2.6 ± 1.2 <sup>ab</sup> | 64.8 ± 15.9 <sup>a</sup>  |
|               | < 70%                        | 73.9 ± 7.4 <sup>a</sup>  | 78.3 ± 6.8 <sup>a</sup>   | 41.3 ± 5.5 <sup>b</sup>  | 4.3 ± 3.7 <sup>a</sup>  | 7.4 ± 6.2 <sup>b</sup>  | 62.3 ± 1.0 <sup>a</sup>   |
| 6 (n=12)      | > 80%                        | 67.5 ± 5.1 <sup>a</sup>  | 79.3 ± 6.2 <sup>a</sup>   | 42.8 ± 3.4 <sup>a</sup>  | 4.2 ± 1.7 <sup>a</sup>  | 1.8 ± 0.6 <sup>a</sup>  | 67.4 ± 10.5 <sup>a</sup>  |
|               | 80-70%                       | 54.3 ± 20.2 <sup>a</sup> | 67.6 ± 11.2 <sup>ab</sup> | 30.8 ± 7.9 <sup>ab</sup> | 4.1 ± 1.7 <sup>a</sup>  | 4.0 ± 1.5 <sup>b</sup>  | 118.7 ± 60.4 <sup>a</sup> |
|               | < 70%                        | 54.9 ± 16.2 <sup>a</sup> | 59.0 ± 14.2 <sup>b</sup>  | 22.0 ± 13.5 <sup>b</sup> | 2.8 ± 2.1 <sup>a</sup>  | 8.3 ± 2.5 <sup>c</sup>  | 66.9 ± 7.0 <sup>a</sup>   |

Values are means ± SD.

<sup>1)</sup> Sows were artificially inseminated with  $3 \times 10^9$  sperm 12h and 24h after detection of estrus and semen was used within 24h for analysis and 72h for insemination after collection ; <sup>2)</sup> sperm/oocyte

<sup>a, b, c</sup> Means with different superscript in the column were significantly differ( $P<0.05$ ).

HOST 결과는 정액 보존 0일과 6일에는 분만율이 80% 이상인 종모돈 군과 70% 미만인 군간에 유의적 차이를 보였고, 보존 후 3일에서는 80% 이상인 종모돈 군이 다른 군에 비해 유의적으로 높았다(P<0.05).

IVP 결과는 종모돈 군에서 각각 보존 0일에는 16.3, 11.2 및 5.9로 분만율이 80% 이상인 군과 70-80%인 군이 70% 미만인 군과 비교해 유의적으로 높았다(P<0.05). 그러나 보존 후 3일과 6일에는 처리군 간에 유의적인 차이는 없었다. % Red는 보존 0일과 3일에는 분만율이 80% 이상인 종모돈 군과 70% 미만인 군에서만 유의적인 차이를 보였다(P<0.05). 그러나 보존 후 6일에는 3개 종모돈 군에서 각각 1.8, 4.0, 8.3으로 분만율이 낮아짐에 따라 %Red 값은 높아졌고, 모든 종모돈 군간에 유의적인 차이를 나타냈다(P<0.05). 정액의 보존에 따른 정자 기능 검사 및 SCSA 결과와 분만율 간의 상관을 살펴본 결과는 Table 6과 같다. 인공수정을 통한 분만율과 운동성과의 상관은 보존 후 0일, 3일, 6일에서 각각 0.36, 0.04, 0.22로 나타났다. 인공수정 분만율과 HOST 결과 ( $r=0.69$ ,  $P<0.05$  ;  $r=0.80$ ,  $P<0.01$  ;  $r=0.55$ ,  $P<0.05$ )와의 상관 계수는 보존 3일에서 가장 높게 나타났고, IVP ( $r=0.79$ ,  $P<0.01$  ;  $r=0.51$ ,  $P<0.05$  ;  $r=0.38$ ,  $P<0.05$ )와의 상관은 보존 일이 경과함에 따라 상관 계수가 감소하였다. 그러나 인공수정 분만율과 % Red( $r=0.79$ ,  $P<0.01$  ;  $r=0.86$ ,  $P<0.01$  ;  $r=0.88$ ,  $P<0.01$ )와의 상관은 보존 일이 증가함에 따라 상관 계수가 증가하였다.

Table 6. Correlation coefficients between semen characteristics and farrowing rate according to semen storage period in pig

| Storage (day) | Motility (%) | HOST (%) | IVP (sperm/oocyte) | %Red    |
|---------------|--------------|----------|--------------------|---------|
| 0             | 0.36         | 0.69*    | 0.79**             | -0.79** |
| 3             | 0.04         | 0.80**   | 0.51*              | -0.86** |
| 6             | 0.22         | 0.55*    | 0.38               | -0.88** |

\* P < 0.05 ; \*\* P < 0.01

#### IV. 고 찰

돼지의 인공수정에서 정액의 품질을 관리하고 평가하는 것은 번식 효율과 경제성의 측면에서 매우 중요하다. 본 연구에서 분만율에 따른 정자의 운동성을 분석한 결과 분만율에 따른 종모돈 군간에는 유의적인 차이는 없었다. 그러나 HOST 결과 팽창된 정자의 비율은 분만율이 높았던 종모돈 군에서 분만율이 낮았던 군과 비교하여 유의적으로 높았으며, 정액의 보존 일이 증가함에 따라 팽창된 정자의 비율이 유의적으로 감소되는 결과를 나타냈다. 이와 같은 결과는 Gadea(1998) 등이 수태율을 상, 중, 하로 나누어 실시한 결과 종모돈 간의 차이가 있었다는 연구 결과와 Pérez-Llano 등(2001)이 288마리의 암퇘지에 인공수정을 실시하여 얻은 종모돈의 수태율을 HOST 결과와 비교한 연구에서 팽창된 정자의 비율이 수태율과 높은 상관관계가 있었다는 보고와 유사한 결과였다. 또한 신선 정액과 15℃에서 보존하였을 때에 HOST는 보존 일이 증가하면 유의적으로 떨어진다는 보고와도 일치하는 결과 이었다(Van 등, 1986). 그러나 본 연구에서 HOST 결과를 통하여 분만율에 근거한 상, 중, 하 종모돈 군 중 분만율이 가장 높았던 군과 가장 낮았던 군에서 차이가 관찰되었으며 분만율이 중간이었던 종모돈 군과의 차이는 관찰되지 않았다. 따라서 HOST 단일 분석법만을 사용할 경우 종모돈의 수정 능력을 정밀하게 분석하는 데는 정확도가 다소 저하되는 것으로 사료되었으며, 정자의 기능적인 측면을 좀 더 보완할 수 있는 방법의 추가가 필요함을 알 수 있었다. 체외수정은 수정 과정의 여러 단계를 검사할 수 있는 방법이며 정자의 수정 능력과 관련된 많은 정보를 얻는데 유용한 방법으로 알려져 있다(Ivanova 등, 1993). Xu 등(1995, 1998)은 체외 성숙한 난자와의 체외수정에서 정자의 난자 침투율, 응성 전핵 형성, 다정자 침입, 난자당 침입 정자 수 모두에서 종모돈 개체 간 유의적인 차이가 있다고 보고 하였다. 그러나 돼지에서는 체외 수정란의 생산에 많은 어려움을 가지고 있기 때문에 체외수정 결과를 이용한 정



자의 정자의 수정 능력 평가는 많은 어려움이 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 단점을 보완할 수 있는 방법으로 돼지에서 미성숙 난자 내 침투 시험(IVP)이 개발되었으며, IVP는 정액의 수정 능력을 평가하는데 유용한 방법으로 보고되었다(Martínez 등, 1998 ; Gadea 등, 1998 ; Vázquez 등, 1998). IVP를 이용한 정자의 수정 능력 평가시 난자 내 정자의 침투율과 난자당 평균 침투 정자 수를 검사할 수 있으며, 이와 같은 분석 결과들과 수정 능력 간에 높은 상관관계가 있음이 보고되었다(Gadea 등, 1998, 2000). 본 연구에서 IVP 결과는 인공수정 후 분만율이 높은 종모돈 군과 낮은 종모돈 군에서 유의적인 차이를 보였고, 분만율과 유의한 상관관계를 나타냄에 따라 IVP 결과와 종모돈의 수정 능력 간에 밀접한 상관성이 있음을 알 수 있었다. 본 연구의 결과는 소와 돼지에서 IVP 결과와 비재발정율(non-return rates) 간에 높은 상관성( $r=0.83$ )이 있었다는 보고와 난자당 침투 정자 수(Hammitt 등, 1989)가 수정 능력과 높은 상관성( $r=0.72$ )이 있었다는 보고들과 유사하였다. 분만율이 다른 종모돈 군의 정액 보존 일별 SCSA 결과는 보존 일이 증가함에 따라 % Red 값이 증가하는 경향을 나타냈고, 분만율과의 상관관계는 보존 일이 길어짐에 따라 부의 상관관계가 높아졌다. 또한 보존 6일에는 % Red 값이 분만율이 높았던 군에서 낮았던 군 순으로 유의적으로 증가되는 결과를 보였다. 이와 같은 결과를 토대로 정자의 DNA가 외부 환경의 영향에 의해 손상을 입고, 보존 일이 증가함에 따라 DNA 손상 정도가 증가되며, 분만율이 낮았던 종모돈의 정액이 분만율이 높았던 종모돈의 정액과 비교하여 외부 환경 요인에 더 큰 영향을 받을 수 있음을 알 수 있었다. 이것은 Ellington 등(1998, 1999)이 염색질의 변성은 온도에 의존적으로 일어나지 않으며 난관 세포와 38.5°C에서 72시간 동안 배양하였을 때에 염색질의 변성이 일어나지 않는다는 보고와는 차이를 보였으나, Gry 등(2005)이 돼지에서 72시간 동안 배양함에 따라 DFI(DNA fragmentation index)가 유의적으로 증가하였다는 보고와는 유사한 결과이었다.

또한, Love 등(2005)이 말의 정액을 5°C에서 보존하는 동안 수정 능력이 높은 개체와 낮은 개체의 COMP at 값은 서로 상이하게 변하며, 정액을 보존하는 동안 수정 능력이 높은 개체들은 COMP at 값이 완만하게 변화하고 낮은 개체들은 급격하게 변화한다는 결과와 유사한 경향이였다.

이상의 결과를 종합해 보면 HOST, IVP 및 SCSA의 분석 결과들은 종모돈의 수정 능력과 밀접한 상관성이 있었으며 각각의 방법을 이용한 정액 분석 시 정액의 보존 일에 따라 결과의 민감도에 있어서 차이가 나타남을 확인할 수 있었다. 본 연구에서 적용된 기법들은 추후 종모돈의 수정 능력을 평가하고 정액 보존을 위한 방법 개발에 유용한 평가 방법으로 사용될 수 있을 것으로 사료되었다.

## V. 요 약

본 연구는 인공수정 센터에서 이용되고 있는 종모돈의 인공수정 분만율의 차이를 기준으로 하여 정액의 보존 일에 따른 정자의 생존율, CASA, HOST, IVP 및 SCSA를 조사하여 이들 정자의 분석법들과 인공수정 분만율과의 상관관계를 조사하여 종모돈의 수정 능력을 예측할 수 있는 정액 평가법을 개발하고자 실시하였다. 종모돈의 액상정액을 대상으로 CASA, HOST, IVP 및 SCSA 기법을 적용한 정액의 평가 결과는 다음과 같았다.

정액의 보존 일별 HOST 결과는 보존 일이 경과함에 따라 유의적으로 감소하였고( $P<0.05$ ), IVP 결과 난자 당 침투 정자 수는 보존 3일째에 유의적으로 감소하였다( $P<0.05$ ). 보존 0일과 6일에 HOST는 분만율이 80% 이상인 종모돈 군이 70% 미만인 종모돈 군 보다 유의적으로 높았고, 3일에서는 80% 이상인 종모돈 군이 다른 종모돈 군에 비하여 높았다( $P<0.05$ ). IVP는 보존 0일에 분만율이 80% 이상인 종모돈 군이 70% 미만인 종모돈 군보다 난자당 침투 정자 수가 유의적으로 많았다( $P<0.05$ ). %Red는 보존 0일과 3일에는 분만율이 80% 이상과 70% 미만인 종모돈 군 간에 유의적인 차이를 보였으

나 보존 6 일에서는 모든 종모돈 군간에 유의적인 차이가 있었다( $P < 0.05$ ). %Red( $r = -0.79$ ,  $P < 0.01$  ;  $r = -0.86$ ,  $P < 0.01$  ;  $r = -0.88$ ,  $P < 0.01$ )는 정액의 보존 일이 증가함에 따라 분만율과의 부의 상관 계수가 증가하였다.

이상의 결과를 종합해 보면 SCSA는 정액의 수정 능력을 평가하는데 있어서 매우 유용한 방법이며, 정액의 보존 일은 여러 가지 정자 기능과 SCSA 결과에 크게 영향을 주는 것으로 나타났다. 정액의 수정 능력을 평가함에 있어서 정액의 보존 일령을 고려하고 정자 기능 검사와 SCSA를 병행하여 실시할 경우 종모돈의 수정 능력 평가 시 정확성을 더욱 높일 수 있는 유용한 방법이 될 수 있을 것으로 사료된다.

## VI. 사 사

본 연구는 농림부 농림기술개발사업의 지원에 의해 이루어진 것임.

## VII. 인용 문헌

- Ahmadi, A. and Ng, S. C. 1999. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J. Exp. Zool.*, 284:696-704.
- Al-Qarawi, A., Abdel-Rahman, H. A., El-Mougy, S. A. and El-Belely, M. S. 2002. Use of a new computerized system for evaluation of spermatozoal motility and velocity characteristics in relation to fertility levels in dromedary bulls. *Anim. Reprod. Sci.*, 74:1-9.
- Angelopoulos, T., Moshel, Y. A., Macanas, Lu L., Grifo, J. A. and Krey, L. C. 1998. Simultaneous assessment of sperm chromatin condensation and morphology before and after separation procedures : effect on the clinical outcome after *in vitro* fertilization. *Fertil. Steril.*, 69:740-747.
- Benchaib, M., Braun, V., Lornage, J., Hadj, S., Salle, B. and Lejeune, H. 2003. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum. Reprod.*, 18: 1023-1028.
- Berger, T. and Parker, K. 1989. Modification of the zona free hamster ova bioassay of boar sperm fertility and correlation with *in vivo* fertility. *Gamete Res.*, 22:385-397.
- Berger, T., Anderson, D. L. and Penedo, M. C. T. 1996. Porcine sperm fertilizing potential in relationship to sperm functional capacities. *Anim. Reprod. Sci.*, 44:231-239.
- Bochenek, M., Smorg, Z. and Pilch, J. 2001. Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination. *Theriogenology*, 56:557-567.
- Bordignon, V. and Smith, L. C. 1999. Ultraviolet-irradiated spermatozoa activate oocytes but arrest preimplantation development after fertilization and nuclear transplantation in cattle. *Biol. Reprod.*, 61: 1513-1520.
- Dadoune, J. P. 2003. Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microsc. Res. Tech.*, 61:56-75.
- Drevius, L. O. and Erikson, H. 1996. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Exp. Cell Res.*, 42:136-156.
- Ellington, J. E., Evenson, D. P., Fleming, J. E., Brisbois, R. S., Hiss, G. A. and Broder, S. J. 1998. Coculture of human sperm with bovine oviduct epithelial cells decreases sperm chromatin structural changes seen during culture in media alone. *Fertil. Steril.*, 69:643-649.
- Ellington, J. E., Evenson, D. P., Wright, R. W., Jones, A. E., Schneider, C. S. and Fleming, J. E. 1999. Higher quality human sperm in a sample selectively attach to oviduct (fallopian tube) epithelial cell *in vitro*. *Fertil. Steril.*, 71:924-929.
- Evenson, D. P., Darzynkiewicz, Z. and Melamed, M. R. 1980. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*, 210:1131-1133.
- Evenson, D. and Zbigniew Darzynkiewicz. 1990. Acridine orange induced precipitation of mouse testicular sperm cell DNA reveals new patterns of chromatin structure. *Exp. Cell Res.*, 187:328-334.
- Evenson, D. P., Jost, L. K., Baer, R. K., Turner,

- T. W. and Schrader, S. M. 1991. Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay. *Reprod. Toxicol.*, 5:115-125.
16. Evenson, D. and Jost, L. 1994. Sperm chromatin structure assay : DNA denaturability. *Methods Cell Biol.*, 42:159-176.
  17. Evenson, D. P., Larson, K. L. and Jost, L. K. 2002. Sperm chromatin structure assay : its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparison with other techniques. *J. Androl.*, 23:25-43.
  18. Fatehi, A. N., Bevers, M. M., Schoevers, E., Roelen, B. A., Colenbrander, J. and Gadella, B. 2006. DNA damage in bovine sperm cells does not block fertilization but induces apoptosis after the first cleavages. *J. Androl.*, 142:49-55.
  19. Fraser, L. and Strzezek, J. 2004. The use of comet assay to assess DNA integrity of boar spermatozoa following liquid preservation at 5 degrees C and 16 degrees C. *Folia. Histochem. Cytobio.*, 142:49-55.
  20. Gadea, J., Matas, C. and Lucas, X. 1998. Prediction of porcine semen fertility by homologous *in vitro* penetration(hIVP) assay. *Anim. Reprod. Sci.*, 54: 95-108.
  21. Gadea, J. and Matas, C. 2000. Sperm factors related to *in vitro* penetration of porcine oocytes. *Theriogenology*, 54:1343-1357.
  22. Garner, D. L. and Johnson, L. A. 1995. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol. Reprod.*, 53:276-284.
  23. Gil, M. A., Roca, J., Cremades, T., Hernández, M., Vázquez, J. M., Rodríguez-Martínez, H. and Martínez, E. A. 2005. Does multivariate analysis of post-thaw sperm characteristics accurately estimate *in vitro* fertility of boar individual ejaculates. *Theriogenology*, 64:305-316.
  24. Boe-Hansen, Gry B., Annette K. Ersboll, Torben Greve and Preben Christensen. 2005. Increasing storage time of extended boar semen reduces sperm DNA integrity. *Theriogenology*, 63:2006-2019.
  25. Hammitt, D. G., Martin, P. A. and Callanan, T. 1989. Correlations between heterospermic fertility and assays of porcine seminal quality before and after cryopreservation. *Theriogenology*, 32:385-399.
  26. Harrison, R. A. P. 1997. Sperm plasma membrane characteristics and Boar semen fertility. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 52:271-283.
  27. Ivanova, M. and Mollova, M. 1993. Zona-penetration *in vitro* test for evaluating boar sperm fertility. *Theriogenology*, 40:397-410.
  28. Jeyendran, R. S., Van der Venn, H. H., Pérez-Peláez, M., Crabo, B. G. and Zanevel, L. J. D. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.*, 70:219-228.
  29. Kirk, E. S., Squires, E. L. and Graham, J. K. 2005. Comparison of *in vitro* laboratory analyses with the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 64:1422-1439.
  30. Love, C. C., Thompson, J. A., Lowry, V. K. and Varner, D. D. 2002. Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility. *Theriogenology*, 57:1135-1142.
  31. Love, C. C., Brinsko, S. P., Rigby, S. L., Thompson, J. A., Blanchard, T. L. and Varner, D. D. 2005. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. *Theriogenology*, 63:1584-1591.
  32. Martinez, E. A., Vazquez, J. M., Matas, C., Gadea, J., Alonso, M. I. and Roca, J. 1996. Oocyte penetration by fresh or stored diluted boar spermatozoa before and after *in vitro* capacitation treatments. *Biol. Reprod.*, 55:134-140.
  33. Martinez, A. G., Matos, D. G., Furnus, C. C. and Brogliatti, G. M. 1998. *In vitro* evaluation and pregnancy rates after vitrification of *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology*, 50:757-767.
  34. Pérez-Llano, B., Lorenzo, J. L., Yenes, P., Trejo, A. and García-Casado, P. 2001. A short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. *Theriogenology*, 56:387-398.

35. Sotolongo, B., Lino, E. and Ward, W. S. 2003. Ability of hamster spermatozoa to digest their own DNA. *Biol. Reprod.*, 69:2029-2035.
36. Spano, M., Kolstad, H. A., Larsen, S. B., Cordelli, E., Leter, G. and Giwercman, A. 1998. The applicability of the flow cytometric sperm structure chromatin assay to epidemiological studies. *Hum. Reprod.*, 13:2495-2505.
37. Vazquez-Levin, M. H., Notrica, J. A. and Polak, de Fried E. 1997. Male immunologic infertility : sperm performance on *in vitro* fertilization. *Fertil. Steril.*, 68:675-681.
38. Vazquez, M. E., Verez, J. R., Stern, J. J., Gutierrez Najar, A. and Asch, R. H. 1998. Elevated basal estradiol levels have no negative prognosis in young women undergoing ART cycles. *Gynecol. Endocrinol.*, 12:155-159.
39. Van der Ven HH, Jeyendran, R. S., Al-Hasani, S., Perez-Pelaez, M., Diedrich, K. and Zaneveld, L. J. 1986. Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic medium (hypoosmotic swelling test) and *in vitro* fertilization. *J. Androl.*, 7:190-196.
40. Xu, Y. E., Wang, Y. I., Lin, N., Zhang, J. W. and Qian, S. Z. 1995. Subcapsular intratesticular assay : a preliminary screening method for putative male antifertility drugs. *Int. J. Androl.*, 1:53-57.
41. Xu, X., Pommier, S., Arbov, T., Hutchings, B., Sotto, W. and Foxcroft, G. R. 1998. *In vitro* maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. *J. Anim. Sci.*, 76:3079-3089.
- (접수일자 : 2006. 9. 14. / 채택일자 : 2006. 11. 10.)