

## Computer-Assisted Sperm Analysis(CASA)를 이용한 제주마 정액의 운동성 평가

강 태 영 · 강 민 수<sup>1,†</sup>  
제주대학교 수의학과

### Assessment of Jeju Horse Semen using Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA)

T. Y. Kang and M. S. Kang<sup>1,†</sup>

*Department of Veterinary Medicine, Cheju National University*

#### SUMMARY

The objective of the study was to assess the general characteristics and motility characteristics with Computer Assisted Sperm Analyzer (CASA) system in Jeju horse semen. Semen was collected from 5 fertile Jeju horse by use of a Missouri type artificial vagina. Semen volume and pH were recorded, and sperm concentration was determined with a hematocytometer and motional characteristics of sperm were analysed by CASA. The viability and morphological abnormalities were assessed by a vital staining. The average volume of ejaculates was 42.5 ml and the average of sperm concentration was  $198.5 \times 10^6/\text{ml}$ . The motional characteristics in Jeju horse semen was showed  $70.4 \pm 28.7 \mu\text{m/s}$  for VAP,  $69.6 \pm 28.9 \mu\text{m/s}$  for VSL,  $94.1 \pm 30.0 \mu\text{m/s}$  for VCL,  $2.3 \pm 0.7 \mu\text{m/s}$  for ALH,  $7.6 \pm 1.1\text{Hz}$  for BCF,  $99.1 \pm 1.2\%$  for STR, and  $77.1 \pm 12.7\%$  for LIN. The percentage of sperm with abnormal head, midpiece and tail was 4.2%, 20.6%, 4.6% respectively.

(Key words: CASA, Jeju horse, motility, semen)

#### 서 론

인공수정에 대한 관심이 높아지면서 수태율의 성공을 높이기 위한 연구들이 많이 시도되어왔다. 특히 수태율에 영향을 미치는 요인으로 수컷의 정액에 대한 관심이 고조되었고 이미 오래 전부터 정자의 운동성을 객관적으로 측정하려는 많은 시도가 있었다(Thurston 등, 2001; Davis 등, 1995; Davis와 Siemers, 1995; Fernandes 등, 1990).

정자의 질은 정자 개별 운동성과 같은 매개변수

들의 주관적인 평가와 정액 농도와 형태학적 기형과 같은 객관적인 매개변수들에 의해 평가되어졌다. 사람과 동물에서 정액의 운동성 매개변수에 대한 평가에 있어서 주관적인 현미경적 평가에서 30~60%의 변이가 있다(Coetzee 등, 1999; Auger 등, 1993; Aman, 1989; Budworth 등, 1988). 이러한 변이를 극복하기 위해 laser-doppler spectroscopy와 flow cytometric sorting 등과 같은 방법들이 제안되었다(Auger 등, 1993; Purvis 등, 1989; Pusch 등, 1986). 그러나 이러한 방법들은 종합적이고 객관

\* 본 연구는 농진청 농업특정연구과제(과제번호 20050301033348)의 지원으로 수행되었음.

<sup>1</sup> 제주대학교 생명자원과학대학 생물산업학부(Major of Animal Science and Biotechnology, Cheju National University)

<sup>†</sup> Correspondence : E-mail : mskang@cheju.ac.kr

적인 평가가 어렵고, 정액의 분석도 불완전하였다. 컴퓨터를 이용한 정액 분석(Computer-Assisted Sperm Analysis; CASA)은 세포의 움직임, 속도, 형태와 같은 서로 다른 특징들에 대한 객관적 평가를 가능케 한다는 이론적 개념을 수립하고 1970년대부터 몇몇 연구자들에 의해 시도되었으나 부정확성으로 인해 인정받지 못하였다(Budworth 등, 1988). 그 후 많은 방법들이 개발되어 실제 화면에서 다른 이물질과 정자를 구분하여 인식할 수 있게 됨으로써 객관적인 정자 운동성 분석과 형태를 비교하게 되었고, 정확성과 신뢰도가 높은 수준에서 정자 기능 평가가 이루어지게 되었다(Johnson 등, 1996; Armant와 Ellis, 1995; Imade 등, 1993). CASA는 정보를 양적으로 계산하고 기록하기 때문에 결과와 기본값의 비교는 쉽다. 이것은 정자의 분류와 더 나아가 수정능 예측의 합성 또는 비교를 위한 통계적 분석의 순차적 처리 혹은 몇 가지 약물들의 효과를 결정할 수 있게 해준다. CASA의 단점으로는 장비의 가격, 측정된 값들의 표준화, 질의 조절, 매우 엄격한 확인 등이 있다. CASA 분석은 지난 15년 동안 상당히 발달되어 사람(Agarwal 등, 2003; Hirano 등, 2001), 소(Lackey 등, 1998; Farrell 등, 1996), 개(Iguer-ouada와 Versteegen, 2001), 말(Quintero-Moreno 등, 2003) 그리고 실험 동물(Vetter 등, 1998)에서도 정자의 움직임 특성을 정확하고 정밀한 정보를 제공해 줄 수 있게 되었다. 하지만 사람을 제외한 모든 종의 동물에서 측정하기에는 표준화가 불충분하며 임상적 관점에서 볼 때, CASA로 생식력에 대해 좀 더 정밀한 예측을 할 수 있다든지 또는 치료에 영향을 미친다든지 하는 것에 대한 증명은 아직 미흡하다.

몇 년 전부터 우리나라에서도 말에 대한 연구의 필요성이 높아졌으며 특히 제주에서는 제주마 등록사업이 착수되어 유전자원의 보존 및 증식의 측면에서 수컷 제주마의 불임 원인 분석 및 인공수정에 대한 필요성이 차츰 증가하게 되었다. 오 등(1994)과 양 등(2001)은 제주마의 인공수정을 위한 기초적인 연구로 정액의 일반적인 특성을 조사하였고, 박 등(1995)의 제주마 정액의 동결 용해 후 정자 생존성에 관한 연구를 제외하곤 미비한 실정이다. 제주마와 같이 고부가 가치를 창출할 수 있

는 동물에서는 정액을 이용하여 수정 능력을 최적화함으로써 수익성이 개선될 수 있다. 이를 위해서는 CASA 분석을 통하여 보다 객관적인 정자의 운동성 평가가 필요하리라 사료되고, 차후 제주마 등록 및 증식 사업의 성공적인 수행을 위한 동결 정액 생산 기술 개발의 기초 자료를 제공하고자 본 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시동물 및 정액 채취

본 연구에 사용한 공시마는 제주도 축산진흥원과 농촌진흥청 난지농업연구소에서 사육되고 천연기념물 제 347호로 지정되어 있는 5~11세 된 제주마 종마 5두를 사용하였다. 발정이 확인된 제주암말을 의빈축으로 이용하여 Missouri style의 인공질을 이용하여 정액 채취를 하였다. 정액 채취시 인공질의 온도는 37℃로 그 범위는 보통 37~42℃였다. 인공질 내로 음경의 삽입이 용이하도록 정자에 무해한 윤활제(Lube®, USA)를 인공질의 비닐내피에 도포하고 종마가 암말에 승가하자마자 음경을 인공질로 유도하여 정액을 채취하였다. 채취된 정액은 알루미늄 은박으로 차광 처리된 50ml conical tube(Falcon, USA)에 나누어 넣은 후, 37℃로 맞춘 보온병에 저장하여 실험실로 수송하였으며 소요 시간은 30분 내외로 하였다. 정액은 실험실 도착 즉시 활력도와 형태학적 분석을 하였다.

### 2. 정액의 성상 검사 및 정자의 활력도 조사

실험실로 운반한 정액은 총 정액량과 gel을 제거한 양을 각각 측정하고 pH meter와 혈구 계산판을 이용하여 pH와 정자 농도를 계산하였다.

정자의 운동 특성은 Markler's counting chamber(Sefi medical, Israel)에 정액 5  $\mu$ l를 넣은 후 현미경(Axioskop, Zeiss)의 관찰 배율을  $\times 200$ 으로 설정하고 CCD(Toshiba, Japan)로 연결하여 CASA system(VideoTesT-Sperm2.1, Image analysis software, Russia)으로 분석하였다.

4개의 시야를 선택하여 이물질이 정자로 오인되는 것을 방지하기 위하여 화면상에서 실제 정자의 영상과 이진영상의 밝기와 대비를 조절하여 영상

을 시스템에 입력한 후 1시야가 1초 노출되는 동안 25 frame을 분석하여 평균치를 측정하였다. 그의 본 실험에 사용된 CASA system의 초기 설정치는 Table 1과 같다. 정자 각각의 운동 특성은 정자의 실제 이동 경로에 따른 이동 속도인 곡선 경로 속도(VCL), 곡선 이동 경로에 대한 평균 이동을 나타내는 평균 경로 속도(VAP), 단위 시간 당 시점에서 종점까지의 속도를 나타내는 직선 경로 속도(VSL), 평균 이동 경로와 실제 이동 경로의 측방 거리차인 측두 거리(ALH), 실제 이동 경로가 평균 이동 경로와 만나는 횟수의 시간당 비율(BCF), 및 위의 측정된 운동 특성들을 바탕으로 곡선 경로 선형도(LIN), 평균 경로 선형도(STR)의 값을 분석하였다.

### 3. 정자의 생사 염색 및 형태학 조사

정자의 생사 판정을 위한 생사 염색은 LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit(Molecular Probes Inc., Eugene, OR) 염색액을 이용하였다. 정액을 HEPES-buffered saline으로 1:10으로 희석시킨 다음 1ml의 희석 정액에 10nM의 SYBR 14를 5µl 첨가시켜 37°C에서 10분간 평형을 시켰다. 그리고 12µM의 propidium iodide(Sigma, PI)를 5µl 혼합한 다음 다시 37°C에서 10분간 평형시키고 slide 위에 sample을 얹어 Zeiss 형광현미경(excitation filter, 365 nm; barrier filter, 397nm)하에서 관찰하였다. 정자의 형태학적 기형 조사는 두부, 경부 및 미부 기형으로 구분하였다.

Table 1. Parameters settings used with CASA system

System parameter	Value
Image sampling frequency (frame/s)	25
Duration of image capture (s)	1
Minimum motile speed (µm/s)	VSL* 10
Maximum motile speed (µm/s)	VSL 250
Maximum countable number (sperm)	400
Maximum countable frame	10

\* VSL :Straight-line velocity.

## 결과 및 고찰

제주마 정액의 성상은 Table 2에서 나타난 바와 같이 gel을 제거한 정액량은 평균 42.5ml 이었으며, 평균 pH는 7.3, 평균 정자농도는  $198 \times 10^6/ml$ 이었다. 본 연구에서 얻어진 평균 정액 채취량 42.5 ml 은 오 등(1994)과 양 등(2001)의 보고와 거의 비슷한 수준으로 채취되었다. 제주마와 크기가 비슷한 pony 종의 총 채취 정액량은 평균 34ml 정도이며 gel을 제거한 정액량은 평균 29ml 정도로 보아 다소 제주마가 정액 채취량이 많은 것으로 보인다 (McDonnell과 Hize, 2005). Dowsett와 Pattie(1982)의 보고에서는 정액 채취량이 평균 64ml 정도였고, Squires 등(1972)의 보고에서는 정액의 채취량이 연령별로 다르며 연령이 증가할수록 그 양이 증가함을 보였다. 이는 종마의 연령과 종의 차이에 기인한 것으로 사료된다. 정자의 농도에서는 오 등(1994)과 양 등(2001)의 보고에 비해 다소 낮게 나타났으며, McDonnell과 Hize(2005)의 pony 종에 비해서는 현저히 낮게 나타났다. 그러나 Magistrini 등(1987)이 보고한 농도와는 거의 비슷한 수준의 결과를 보였다. 그러나 본 연구에서 개체 간에 또한 채취 간에 정자 농도는 변이가 심했으며, 계절적인 요인도 변수로 작용할 수 있으리라 사료되며 이를 위해서는 번식 계절과 비번식 계절로 나누고 보다 많은 공시 두수를 조사할 필요가 있다고 사료된다.

정액의 질(質)검사와 생식력의 상관성 확립에 있어서 정자 세포의 활동성과 형태학적 평가는 필수적인 매개변수이다. 종종 수의사와 번식가가 정액의 질을 가지고 숫말의 수태 능력을 평가하는 경우가 있다. 이는 어느 정도 예측을 하지만 평가의 주관적인 평가로 오류를 범할 수 있는 경우가

Table 2. Characteristics in Jeju horse semen

Characteristics	Value
Volume of the ejaculates (ml)	42.5± 10.1
pH	7.3± 0.3
Sperm concentration ( $\times 10^6/ml$ )	198.5±160.1

\* Mean±S.D.

생기게 된다. 수컷의 수태 능력을 평가하는 데는 정자의 수보다는 질이 더 중요하며 정액의 양, 정자의 농도, 운동성, 전진 운동성 및 형태학적 특성 등의 5가지 특성이 큰 영향을 미친다. 기존의 연구들에서는 현미경을 통한 육안적인 검사에 의해 활력 및 전진 운동성을 평가하였는데 이러한 검사에 있어서는 동일한 시료를 가지고 동일한 실험자일 지라도 drop간의 평균 변이 계수가 8%에 이를 정도로 분석 자료의 신뢰성이 떨어졌다(Dunphy 등, 1989; Jequier와 Ukome, 1983). 따라서 컴퓨터를 이용한 정액 분석(Computer-Assisted Sperm Analysis; CASA)은 세포의 움직임, 속도, 형태와 같은 서로 다른 특징들에 대한 객관적인 평가를 가능하게 한다. 본 연구에서는 제주 종모마의 정자 운동성을 CASA를 이용하여 보다 객관적인 운동성을 평가하여 향후 수태율을 향상시키는데 기초 자료를 얻고자 하였다.

컴퓨터 정액 분석기를 이용하여 제주마 정자의 활력도와 운동성을 측정할 때, 정자의 운동성은 Table 3에 나타난 바와 같았다. 전체 운동성은 64%였으며, VAP는 70.4  $\mu\text{m/s}$ , VSL은 69.6  $\mu\text{m/s}$ , VCL은 94.1  $\mu\text{m/s}$ , ALH는 2.3  $\mu\text{m/s}$ , BCF는 7.6 Hz, STR은 99.1%, LIN은 77.1%로 나타났다.

Table 3에 나타나 있는 parameter 중에 VCL과 VAP는 수정을 예견할 수 있는 요소로서 수정능을 획득하게 되면 이 수치는 더욱 증가한다고 한다(Donnely 등, 1998; Rashid 등, 1998; Holt 등, 1994; Marshburn 등, 1992; Kruger 등, 1988). Jeulin 등(1996)은 swim-up 기술에 의해 선별된 운동성 있는 정자의 ALH는 수정 비율에 긍정적인 상호 관련성이 있는 것으로 보고했으며, Chan 등(1989)은 swim-up 기술로 분리한 정자의 VCL을 CASA로 측정할 결과 IVF에서 아주 중요한 요소로 작용하였다고 한다. LIN은 VSL과 VCL의 비율은 체외 수정에서 부정적인 효과를 가지며, 무정자증 정액의 정자에서는 VSL과 VCL이 높은 비율을 차지하는 경향이 인정되었다. Quintero-Monen 등(2003)이 연구한 종마 정액의 운동 성상을 보면 VAP 40.3  $\mu\text{m/s}$ , ALH 1.96  $\mu\text{m/s}$ , BCF 5.4 Hz, LIN 56.13을 나타내었다. 이 결과와 비교해 보면 VAP는 외국의 종마보다 움직임이 월등히 뛰어난 것으로 보

Table 3. Motility parameters characteristics of Jeju horse sperm

Motility parameters	Mean $\pm$ S.D.
MOT (%)	64.3 $\pm$ 23.2
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	70.4 $\pm$ 28.7
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	69.6 $\pm$ 28.9
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	94.1 $\pm$ 30.0
ALH ( $\mu\text{m/s}$ )	2.3 $\pm$ 0.7
BCF (Hz)	7.6 $\pm$ 1.1
STR (%)	99.1 $\pm$ 1.2
LIN (%)	77.1 $\pm$ 12.7

\* percentage motile sperm (MOT); velocity on average path (VAP ( $\mu\text{m/s}$ )); straight line velocity (VSL ( $\mu\text{m/s}$ )); curvilinear velocity (VCL ( $\mu\text{m/s}$ )); amplitude of lateral head displacement (ALH ( $\mu\text{m}$ )); beat cross frequency (BCF (Hz)); straightness (STR (VSL/VAP)); linearity (LIN (VSL/VCL)).

이지만 LIN의 경우는 오히려 제주마가 수정 효율이 떨어질 것으로 예상된다. 하지만 이러한 결과는 직접적으로 비교하기는 힘들며, 그 해석이 어렵고 종과의 차이가 충분히 날 수가 있으며, 그 외 온도, 측정 챔버의 영향, 특히 영상의 주파수 획득으로 정자의 궤도를 재구성하는 프레임률에 의한 차이가 있을 수 있는 것으로 사료된다.

제주마의 정자 생존율과 기형률을 조사하고자 LIVE/DEAD<sup>®</sup> Sperm Viability Kit로 채취한 정액을 희석하여 염색한 다음 형광현미경으로 관찰하였다. 제주마의 정자 생존율은 81%였다. 정자의 부위별 기형률은 Table 4에 나타난 바와 같았다. 정자 부위별 기형률은 두부가 평균 4.2%, 경부가 평균 20.6%, 미부가 평균 4.6%였다.

본 연구에서 얻어진 정자의 기형률은 다른 연구자들과 비슷한 수준이거나, 낮은 것으로 나타났으나, 정자의 중간 부위의 기형률이 다소 높게 나타났다(Quintero-Monen 등, 2003; Bielanski 등, 1982; Dowsett와 Pattie, 1982). 이와 같은 결과는 고환실질의 결함보다는 정소상체 미부의 결함이 있는 것으로 사료된다. 불임 수컷은 형태학적으로 비정상

Table 4. Morphological parameters characteristics of Jeju horse sperm

Morphological parameters	Percentage
Normal sperm (%)	70.6±11.2
Abnormal head (%)	4.2± 1.3
Abnormal midpiece (%)	20.6± 8.7
Abnormal tail (%)	4.6± 1.5

적인 정자의 비율이 높은 것으로 나타나며 몇몇 불임 개체에서는 정자 세포의 운동성이 약하고 경부점막을 잘 침투 못하는 것으로 나타난다. 정자의 형태학은 물리적이고 화학적인 인자에 의해 정자의 생산이 저하되며 번식력 저하를 가져오는 정자를 생산하게 된다.

본 연구를 통하여 제주마의 정액의 특성과 운동성을 CASA를 통하여 객관적으로 평가를 시도하였고, 차후 더 정확하고 표준화된 평가로 수태율과의 관계를 종합적으로 검토할 필요가 있을 것으로 사료된다.

## 적 요

본 연구는 제주도 축산진흥원과 농촌진흥청 남지농업연구소에서 사육되고 있는 제주마 5두를 사용하여 인공질을 이용, 정액을 채취하여 정액의 일반성상 및 CASA를 이용하여 정자의 운동성과 생사 염색으로 기형률을 조사하였다.

제주마 정액의 일반 특성으로 총 정액량은 평균 42.5ml이었으며 평균 pH는 7.3, 평균 정자농도는 평균  $198 \times 10^6/ml$  이었다. 정자의 운동성은  $64.3 \pm 23.2\%$ 이며, motility parameters 별로 VAP  $70.4 \pm 28.7 \mu m/s$ , VSL  $69.6 \pm 28.9 \mu m/s$ , VCL  $94.1 \pm 30.0 \mu m/s$ , ALH  $2.3 \pm 0.7 \mu m/s$ , BCF  $7.6 \pm 1.1 Hz$ , STR  $99.1 \pm 1.2\%$ , LIN  $77.1 \pm 12.7\%$ 로 나타났다. 정자 부위별 기형률은 두부가 평균 4%, 경부가 평균 20%, 미부가 평균 4%로 나타났다.

이 연구를 통해 천연기념물로 지정되어 있는 제주마의 유전자원 보존과 증식을 위한 인공수정기술의 실용화를 위한 기초 자료를 제공하고자 한다.

## 사 사

본 연구를 위해 제주마의 이용과 더불어 많은 협조해 주신 제주도 축산진흥원 및 농촌진흥청 남지농업연구소의 배려에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Agarwal A, Sharma RK and Nelson DR. 2003. New semen quality scores developed by principal component analysis of semen characteristics. *J. Androl.*, 24:343-352.
- Armann RP. 1989. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J. Androl.*, 10:89-98.
- Armant DR and Ellis MA. 1995. Improved accuracy of sperm motility assessment using a modified Micro-Cell sperm counting chamber. *Fertil. Steril.*, 63:1128-1130.
- Auger J, Leonce S, Jouannet P and Ronot X. 1993. Flow cytometric sorting of living, highly motile human spermatozoa based on evaluation of their mitochondrial activity. *J. Histochem. Cytochem.*, 41:1247-1251.
- Bielanski W, Dudek E, Bittmar A and Kosiniak K. 1982. Some characteristics of common abnormal forms of spermatozoa in highly fertile stallions. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 32:21-26.
- Budworth PR, Amann RP and Chapman PL. 1988. Relationships between computerized measurements of motion of frozen-thawed bull spermatozoa and fertility. *J. Androl.*, 9:41-54.
- Chan SY, Wang C, Song BL, Lo T, Leung A, Tsoi WL and Leung J. 1989. Computer-assisted image analysis of sperm concentration in human semen before and after swim-up separation : Comparison with assessment by haemocytometer. *Int. J. Androl.*, 12:339-345.
- Coetzee K, Kruger TF and Lombard CJ. 1999. Repeatability and variance analysis on multiple computer-assisted (IVOS) sperm morphology

- readings. *Andrologia*, 31:163-168.
- Davis RO and Siemers RJ. 1995. Derivation and reliability of kinematic measures of sperm motion. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7:857-869.
- Davis RO, Drobnis EZ and Overstreet JW. 1995. Application of multivariate cluster, discriminate function, and stepwise regression analyses to variable selection and predictive modeling of sperm cryosurvival. *Fertil. Steril.*, 63:1051-1057.
- Donnelly ET, Lewis SE, McNally JA and Thompson W. 1998. *In vitro* fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. *Fertil. Steril.*, 70:305-314.
- Dowsett KF and Pattie WA. 1982. Characteristics and fertility of stallion semen. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 44:77-86.
- Dunphy BC, Kay R, Barratt CL and Cooke ID. 1989. Quality control during the conventional analysis of semen, an essential exercise. *J. Androl.*, 10:378-385.
- Farrell PB, Foote RH, McArdle MM, Trouern-Trend VL and Tardif AL. 1996. Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit, and bull sperm for computer-assisted sperm analysis (CASA). *J. Androl.*, 17:293-300.
- Fernandes PA, McCoshen JA, Cheang M, Kredentser JV and Wodzicki AM. 1990. Quantitative analysis of the effect of freezing on donor sperm motion kinetics. *Fertil. Steril.*, 54:322-327.
- Hirano Y, Shibahara H, Obara H, Suzuki T, Takamizawa S, Yamaguchi C, Tsunoda H and Sato I. 2001. Relationships between sperm motility characteristics assessed by the computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilization rates *in vitro*. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 18:213-218.
- Holt W, Watson P, Curry M and Holt C. 1994. Reproducibility of computer-aided semen analysis: comparison of five different systems used in a practical workshop. *Fertil. Steril.*, 62:1277-1282.
- Iguer-Ouada M and Verstegen JP. 2001. Evaluation of the "Hamilton Thorn computer-based automated system" for dog semen analysis. *Theriogenology*, 55:733-749.
- Imade GE, Towobola OA, Sagay AS and Otubu JA. 1993. Discrepancies in sperm count using improved Neubauer, Makler, and Horwells counting chambers. *Arch. Androl.*, 31:17-22.
- Jequier AM and Ukombe EB. 1983. Errors inherent in the performance of a routine semen analysis. *Br. J. Urol.*, 55:434-436.
- Jeulin C, Lewin LM, Chevrier C and Schoevaert Brossault TD. 1996. Changes in flagella movement of rat spermatozoa along the length of the epididymis : Manual and computer-aided image analysis. *Cell. Motil. Cytoskeleton*, 35:147-161.
- Johnson JE, Boone WR and Blackhurst DW. 1996. Manual versus computer-automated semen analyses. Part II. Determination of the working range of a computer-automated semen analyzer. *Fertil. Steril.*, 65:156-159.
- Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF and Oehninger S. 1988. Predictive value of abnormal sperm morphology in *in vitro* fertilization. *Fertil. Steril.*, 49:112-117.
- Lackey BR, Boone WR, Gray SL and Henricks DM. 1998. Computer-assisted sperm motion analysis of bovine sperm treated with insulin-like growth factor I and II : implications as motility regulators and chemokinetic factors. *Arch. Androl.*, 41:115-125.
- Magistrini M, Chanteloube P and Palmer E. 1987. Influence of season and frequency of ejaculation on production of stallion semen for freezing. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 35:127-133.
- Marshburn PB, McIntire D, Carr BR and Byrd W. 1992. Spermatozoal characteristics from fresh and frozen donor semen and their correlation with fertility outcome after intrauterine insemination. *Fertil. Steril.*, 58:179-188.

- McDonnell SM and Hize AL. 2005. Aversive conditioning of periodic spontaneous erection adversely affects sexual behavior and semen in stallions. *Anim. Reprod. Sci.*, 89:77-92.
- Purvis K, Tollefsrud A and Rui H. 1989. Correlates of human sperm motility assessed by laser Doppler spectroscopy. *Int. J. Androl.*, 12:10-16.
- Pusch HH, Leitinger S, Winter R and Urdl W. 1986. Evaluation of sperm motility by laser-Doppler-spectroscopy in an *in-vitro* fertilization programme. *Hum. Reprod.*, 1:233-235.
- Quintero-Moreno A, Miro J, Teresa Rigau A and Rodriguez-Gil JE. 2003. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology*, 59: 1973-1990.
- Rashid MRZ, Fishel SB and Thornton S. 1998. The predictive value of the zona free hamster egg penetration test in relation to *in vitro* fertilization at various insemination concentrations. *Hum. Reprod.*, 13:624-629.
- Squires EL, Pickett BW, Graham JK, Vanderwall DK, McCue PM and Bruemmer JE. 1999. Cooled and frozen stallion semen. *Anim. Reprod. Biotech. Lab. Colorado State Univ. Bulletin No. 09.*
- Thurston LM, Watson PF, Mileham AJ and Holt WV. 2001. Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *J. Androl.*, 22:382-394.
- Vetter CM, Miller JE, Crawford LM, Armstrong MJ, Clair JH, Conner MW, Wise LD and Skopek TR. 1998. Comparison of motility and membrane integrity to assess rat sperm viability. *Reprod. Toxicol.*, 12:105-114.
- 박남건, 오운용, 이성수, 오창언, 강수원, 고서봉, 강민수, 김희석. 1995. 제주재래마 정액의 동결 보존에 관한 연구. *농업논문집*, 37:459-463.
- 양보석, 강승률, 이성수, 조인철, 김영훈, 전창익, 정진관, 2001. 제주마 정액의 일반성상에 관한 연구. *한국수정란이식학회지*, 16:127-131.
- 오운용, 박남건, 김영훈, 이성수, 김희석, 김중계, 신원집. 1994. 제주재래마 정액의 일반성상에 관한 조사연구. *농업논문집*, 36:552-557.

---

(접수일: 2006. 3. 1 / 채택일: 2006. 3. 9)