

고양이의 정액 채취 방법이 동결 정액의 생존성에 미치는 영향

하아나^{1,2} · 윤진호¹ · 김유곤¹ · 조아라^{1,2} · 이경림^{1,2} · 공일근^{1,2,3,*}

¹경상대학교 농업생명과학대학 축산학과, ²응용생명과학부, ³농업생명과학연구소

Effect of Semen Collection Methods on the Post-thaw Viability of Cat Semen

A-Na Ha^{1,2}, Jin-Ho Yoon¹, Yu-Gon Kim¹, A-Ra Jo^{1,2}, Kyeong-Rim Lee^{1,2} and Il-Keun Kong^{1,2,3,*}

¹Department of Animal Science, ²Division of Applied Life Science(BK21 Program),
Graduate School of Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

³Institute of Agriculture and Life Science, Jinju 660-701, Republic of Korea

ABSTRACT

The objective of this study was carried out to evaluate the efficiency of sperm collection methods on the post-thaw viability of cat semen. The cat semen was collected by artificial vaginal (AV) and electronic ejaculate (EE) methods. The composition of semen extender was consisted of Tris-buffer supplemented with 20% egg yolk and 1% P/S antibiotics in Ext I, and more added 8% glycerol, 1.0% Equex SIM paste of total volume in Ext II. The collected semen was adjusted the concentration and then diluted in Ext I for optimal concentration. The diluted semen was cooling to 5°C temperature in refrigerator for at least 2 hrs and then diluted stepwise with Ext II for at least 1 hrs. After an equilibration for 1 hrs, the cooled semen was packaged in 0.5 ml straw and then freezing on the LN₂ vapor over 5 cm above from LN₂ and then immersed directly in LN₂ for cryopreservation. The frozen semen was thawed in 38°C water for 15 sec and then evaluated the motility, viability, and morphology. Post-thaw semen were calculated the motility by SMI (sperm motility index). The live-dead sperm was evaluated by Eosin-B and morphological evaluation was by Diff-quick kit staining. The post-thaw concentration (89×10^6 /ml vs. 128×10^6 /ml), viability (22.6±10.6% vs. 37.1±26.1%), morphological normality (27.0±50.2% vs. 45.6±123.0%) of EE and AV groups were not significant different, but the post-thaw motility was significant lower in EE than that in AV group (53.1±3.6 vs. 73.6±5.7) ($p < 0.05$). In conclusion, semen collection methods did not significant different between EE and AV groups except of post-thaw motility and so both semen collection methods could be applied in feline semen collection methods.

(Key words : Cat, Semen, Cryopreservation, Electronic ejaculation, Artificial vagina)

서 론

현재 생식세포를 이용한 생명과학기술은 이미 국내·외적으로 급격히 발전하여 연구뿐만 아니라 산업화 측면에서도 보편화되어 크게 확산된 추세이다. 많은 연구자들에 의해서 포유동물의 정액 채취는 인공 수정과 치료·진단의 목적 및 연구·보존 등의 목적으로 주로 사용되어왔다. 그리하여 정액을 채취한 후 가장 안전하게 유지하기 위해 동결기술이 발달하게 되었고, 정액의 채취와 동결은 다양한 종에서 실시되어 왔으며, 채취 방법도 매우 다양하게 발전되었다. 채취 방법은 소나 돼지와 같은 대동물에서 주로 사용되는 의빈대를 이용한 인공질, 전기자극, 마사지 방법 및 중·소동물인 개나 고양이는 전기자극, 인

공질, 고환 절제술 등이 개발되었다.

고양이는 인간과 유전적으로 매우 유사하여 인간에 적용 가능한 유전자가 많은 동물이다 (Migaki 등, 1982). 그럼에도 불구하고 고양이과 동물에 대한 생식학적인 연구는 다른 동물에 비해 현재까지 매우 미흡한 실정이다. 현재 고양이를 이용한 정액 채취 방법으로는 흔히 전기자극법 (Haward 등, 1990), 인공질법 (Platz 등, 1978; 최 등, 2009)이 사용되고 있다. 또한, 정충의 채취는 고환절제술을 이용한 스퀴징 (squeezing) 또는 슬라이싱 (slicing) 방법 등이 있다 (Zambelli 등, 2006). 인공질을 이용한 고양이의 정액 채취 방법은 Sojka 등 (1970)에 의해 처음 보고되었다 (Platz 등, 1978; Dooley 등, 1986; Dooley 등, 1991). 인공질법은 비용이 저렴하고 시간의 소모가 적은 장점이 있다. 그러나, 암컷이 있어야지만 교미 활동을 유

* Corresponding author : Phone: +82-55-751-5512, E-mail: ikong@gnu.kr

도하여 정액을 채취할 수가 있어 수컷만 사육하는 환경에서는 채취가 곤란하다. 반면에 고양이의 전기자극 정액 채취법은 Scott 등 (1970)에 의해 처음 보고되었으며, 그 이후 다른 연구자들에 의해서도 계속 수행되었다 (Platz 등, 1978; Howard 등, 1990). 마취를 한 후 안전하게 채취할 수 있으나, 시중에서 쉽게 구할 수 없는 고가의 전기자극기와 마취제 등이 필요하여 비용적인 면에서 인공질법과 상반되는 단점이 있다. 고양이의 정액 채취에서 인공질법은 전기자극법보다 정액의 사출량은 적지만 정자 농도는 매우 높은 편이다. 그러나 정자의 성상은 정액 채취 방법에 크게는 영향을 받지 않는다 (Platz 등, 1978). 정자는 수정과도 크게 연관이 있어 정자의 비정상율은 수정란의 생산과 산자 생산에도 영향을 미친다. 사출된 정자가 비정상적인 양상을 보이는 원인으로는 개체 자체에 잠재하는 내재적인 요인도 있으나, 정액의 회석과 배양액, 원심분리, 정자의 플라즈마 제거 등의 물리적인 요인도 존재한다 (Howard 등, 1990). 그리고 처리하는 방법에 따른 정자의 성상이 감소되거나 증가할 수 있다. 그러므로 정자의 특성과 비정상적인 정자의 출현 원인에 대하여 정확하게 조사할 필요성이 있다.

채취된 정액의 동결보존 방법은 다양하게 변화되어 왔다. 정액이 외부 온도에 매우 민감하여 cold shock에 의한 손상이 크기 때문에 많은 연구자들에 의해서 정액동결법에 대한 연구가 활발히 이루어져 왔다. 정액동결은 정액의 장기보존, 정액의 대량생산 및 실험동물의 번영구적인 종 보존이 가능하므로 우수한 실험동물의 이용효율 증대와 계절번식에 따른 수태율 저하를 방지하고, 수송비 등을 절감할 수가 있어 여러 가지 측면에서 효과가 입증되어 왔다. 즉, 더욱 안전하고 손쉬운 방법으로 질 좋은 상태의 정액을 채취한 후 동결하여 장기보존을 해 둔다면 연구적인 목적뿐만 아니라 개량에도 큰 효과를 볼 수 있다고 판단된다.

따라서 본 연구의 목적은 인공질법과 전기자극법을 이용한 정액 채취 방법에 따른 동결 정액의 품질과 정자의 형태, 생존율 평가 등의 정액 성상을 비교함으로써 고양이 동결 정액의 질을 높이고 더욱 향상된 방안을 모색하고자 하였다. 또한, 고양이과 동물의 정액 채취에 활용하기 위해 전기자극법에 의한 정액채취법의 protocol을 정립하고자 하였다.

재료 및 방법

공시동물

본 연구의 공시동물로는 체세포핵 이식에 의해 생산된 복제고양이 (Turkish Angora)와 복제고양이의 F-1 중에서 정상적인 성숙에 의해 생식활동이 정상적인 수컷 개체 총 4두를 선발하였다. 대조구인 인공질법에는 암컷 (Domestic short hair cat)을 이용하여 정액 채취가 용이하게 하였다. 모든 고양이의 사육환경은 $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ 로 온도를 조절하고, 명암주기는 낮과 밤이 각각 14시간과 10시간 동안 자동적으로 통제되는 제어 시스템을 이용하였다. $1.8\times 0.7\times 0.65\text{ m}$ 의 stainless cage에 개별사육을 하였으며 24시간 사료와 물을 자유 급식하였다.

동결보존액의 제조

고양이 정액을 동결할 버퍼의 제조와 동결 방법은 최 등, (2009)의 방법에 준하여 사용하였다. 간단히 요약하면 Tris-buffer에 20% egg-yolk와 1% Antibiotics를 첨가한 Extender I (Ext 1)과 Ext 1에 1% Equax STM paste, 8% glycerol를 첨가한 Extender II (Ext II)를 제조하였다.

정액채취

대조구인 인공질법을 이용한 수컷 고양이의 정액 채취는 발정이 유기된 암컷 고양이를 수컷의 케이지에 합사시켜 행동을 주시한 후 수컷고양이가 교미 자세를 취하면 인공질 튜브를 수컷 고양이의 페니스에 위치시켜서 정액채취를 한다 (Fig. 1C, D). 전기자극법은 (Howard 등, 1990)의 방법에 준하여 (304 PTE 220 VAC, U.S.A)를 이용하였다 (Fig. 1A, B). 24시간 동안 절식시킨 고양이를 10~15 mg/ml당 Zoletil 50 (Virbac, Co)을 근육 주사하여 진신 마취시킨 후 고양이를 채취대에 옆으로 눕혀 페니스와 정소 부위를 알코올로 소독하고 털을 제거한다. 고양이가 완전히 마취되면 7.5 cm 길이의 prove에 sono gel을 묻히고 고양이의 항문 부분에도 적당량의 젤을 도포하여 부드럽게 삽입될 수 있도록 처리한 후 직장으로부터 조심스럽게 삽입시켜 prove가 직장 내에서 복강 가까스로 깊게 삽입되도록 위치시킨다. 전기의 통전은 Table 1과 같이 총 3 part로 나누게 되는데, 각 part의 volt당 10번씩 총 80번의 자극을 준다. 자극을 줄 때는 0~1초 사이에서 0 volt, 그리고 원하는 volt에서는 2~3초간 유지시켰다가 voltage를 내린 후 2~3초 동안 간격을 준다. 그리고 각 part가 끝나면 5분 동안 휴식기를 준 후 다음 단계로 자극을 준다 (Table 1, Fig. 1A, B).

정액동결

채취한 정액은 37.5°C 로 유지하여 실험실로 운반한다. 정액은 곧바로 D-PBS에 1,800 rpm에 5분간 washing하여 정액의 pellet을 Ext I에 회석시키고 정액과 같은 온도인 37°C 의 2차 증류수가 담긴 비커에 회석액을 튜브랙에 꽂아 냉장고에서 온도를 cooling시켜 최저 5°C 까지 적어도 2시간 이상 유지하면서 하강시킨다. 다음 Ext II 용액을 최종 농도의 10%, 20%, 30%, 40%를 각각 15분의 간격으로 Ext I에 첨가하면서 회석시킨다. 1:1로 회석된 정액은 0.25 ml 스트로우에 담아 sealing하고 액체질소의 표면에서 5.5 cm 위치에서 예비 동결한 후 액체질소에 입수시켜 동결을 완료·보관한다.

정자의 운동성과 농도

Table 1. Protocol of semen collection for electro ejaculation of male cat

Voltage (V) / stimulation (n)		
Part 1	Part 2	Part 3
2 volt / 10	3 volt / 10	4 volt / 10
3 volt / 10	4 volt / 10	5 volt / 10
4 volt / 10	5 volt / 10	

(Howard 등, 1990)

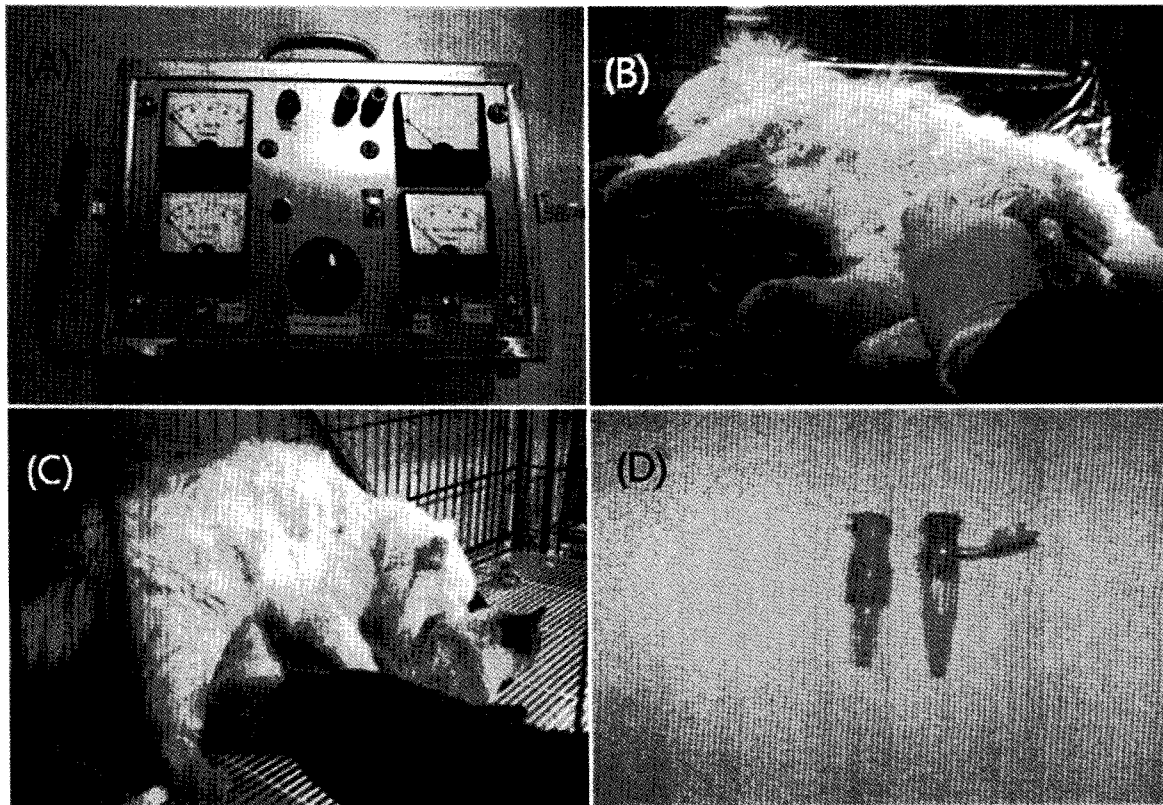


Fig. 1. Photograph of semen collection methods that are electronic ejaculation (A, B) and artificial vagina collection methods (C, D). (A); The electronic stimulate machine for semen collection of male cat. (B); The electronic stimulate for semen collection of male cat. (C); Semen collection with artificial vagina. (D); The tool for semen collection of male cat (Artificial vagina).

정자의 양은 100 μ l 피펫으로 측정하였으며, 농도는 Makler Counting Chamber (Sefi-Medical Instruments ltd)를 이용하여 카운트하여 계산하였다. 정자의 운동성은 SMI (Sperm Morphology Index)를 사용하여 전진 운동, 진자 운동, 선회운동으로 구분하여 계산하였다. 정자 운동지수 공식은 다음과 같다.

$$\text{SMI} = (\text{Spermatozoa progressive motility} \times 20) + (\text{Spermatozoa motility}) / 2$$

정자의 생사 염색

정자의 생사 여부를 확인하기 위하여 Eosin-B staining을 이용하였다 (최 등, 2009). 먼저 슬라이드 글라스에 10 μ l의 정액과 5% Eosin-B를 1:1 비율로 잘 섞어서 도말한다. 건조한 샘플을 현미경으로 200배율 이상의 광학현미경으로 관찰하여 염색된 것과 염색되지 않은 총 200마리의 정자를 카운트하여 평가한다. 정자 두부가 핑크색으로 염색된 것은 사멸 정자이고, 염색되지 않은 것은 생존해 있는 것으로 판단한다 (Fig. 2A).

형태학적 분석

정자의 형태는 Diff-quick kit (SYSMEX Co., Kobe, Japan)를 이용하여 실시하였다 (Mota 등, 2006). 먼저 slide glass에 용해된 정액 10 μ l를 얇게 펴서 말린 후 Diff-quick fixative로 5초간 고정시킨 후 Diff-quick solution

1에서 5초, Diff-quick solution 2에서 5초간 각각 노출시키고 D.W로 washing 후 air drying한다. 완전히 말린 slide glass를 200배율 이상의 광학현미경으로 관찰하여 총 200개의 정자를 카운팅하는데 총 3회를 실시하여 오차 범위를 줄인다 (Fig. 2B).

통계처리

모든 정액 샘플의 데이터의 통계학적 분석은 SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, USA)의 T-test을 이용하여 통계처리하여 $p < 0.05$ 범위 내에서 유의적인 차이를 검정하였고, Mean \pm SD로 표시하였다.

결 과

동결용해 정액의 성상과 활력 및 생존율에 대한 평가

Table 2에서는 동결 정액의 활력과 생존율에 대하여 조사하였다. 전기자극 채취시 외부 온도에서 받는 정자의 손상을 최소화하기 위하여 소량의 Tris-buffer를 먼저 튜브 내에 주입하여 전기자극법에 의한 정액의 정확한 양은 측정할 수가 없었다. 정액 농도는 전기자극법 (89×10^6 sperm/ml)과 인공질법 (128×10^6 sperm/ml)으로 채취하였다. 정자의 운동성은 인공질법 (73.6 ± 5.7)에 의한 채취 방

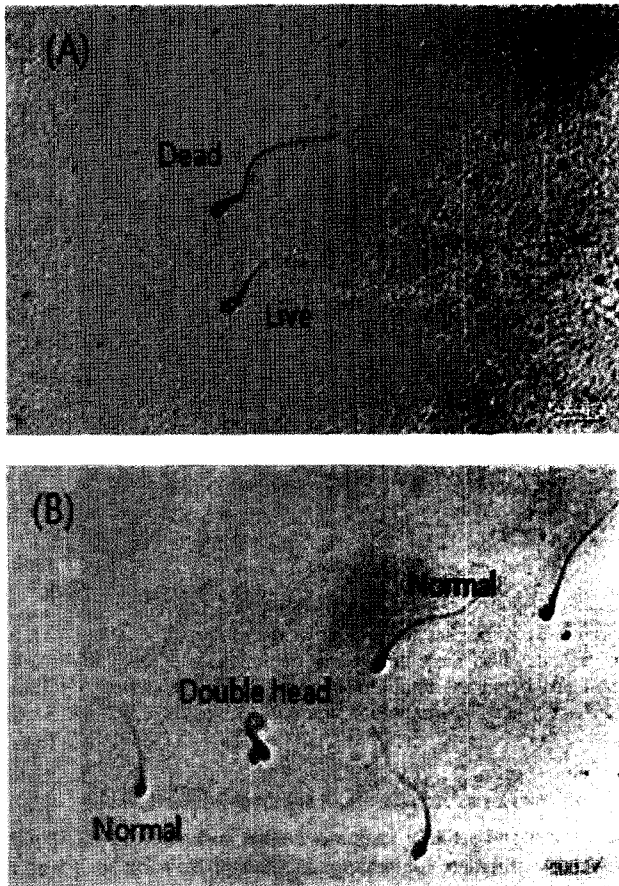


Fig. 2. Photograph of post-thaw spermatozoa. (A) Staining for live-dead sperm evaluation. (B) Diff-quick for normal and abnormal of sperm evaluation.

법이 전기자극법 (53.1±3.6)보다 정액의 활력이 유의적으로 높았다 ($p<0.05$). 그리고 생존율은 전기자극법 (22.6±10.6)과 인공질법 (37.1±26.1) 간의 유의적인 차이는 없었다.

정자의 형태학적 검사

정자의 형태학적인 측면에서는 정상적인 형태의 정자는 전기자극 (EE)과 인공질 (AV)에서 각각 27.0%와 45.7%로 매우 낮았다 (Table 3). 고양이의 정액에서 검출되는 비정상적 부분의 대부분 정자의 꼬리에서 가장 많이 나타났으며, 그 중 Coiled tail이 가장 많았다. 그리고 두 처리구 간에 유의적인 차이는 인정되지 않았다.

고찰

본 실험에서는 고양이의 정액 채취 방법으로 인공질법과 전기자극법을 이용하여 보다 더 안정적으로 정액 채취 방법을 개량하기 위하여 본 연구를 수행하였다. 고양이과의 많은 종의 사출된 정액에서는 높은 비율의 이상정자가 발생하고 그 종의 범위는 한정되어 있지만, 이는 고려해볼 필요가 있다 (Wildt 등, 1986; Haward 등, 1993, Jayaprakash 등, 2001). 일반적인 고양이과와 고양이과의 사출정액은 그 농도가 매우 적다. 보통 수컷고양이에서 정액을 채취한 후 관찰한 정액의 성상은 정상적인 교미 활동에 문제가 없는 고양이에서도 60% 이상의 비정상적인 정자가 검출되고, 나머지 40% 이하가 정상적인 정자인 것으로 보고되어졌다 (Harward 등, 1990; Mota 등, 2006). 이것은 고양이과의 동물인 치타, 표범, 퓨마에서도 마찬가지이다 (Wildt 등, 1988). 뿐만 아니라 정상적인 성욕이 없는 개체에서는 매우 낮은 기저의 testosterone의 수준으로 인하여 91%가 이상정자 형태를 나타내어 번식장애를 가져오기도 한다 (Bader 등, 1988). 고양이는 매우 예민한 동물로써 계절, 나이, 품종, 스트레스, 채취빈도 등에 의해서 정액의 성상에 큰 영향을 받으며, 기형정자율이 높다. 인공질법을 이용한 정액채취법은 발정이 유지된 암컷 없이 수컷의 정자를 채취할 수 없으며, 훈련되지 않은 미숙한 고양이에서도 정액을 얻을 수 없다는 단점이 있다. 그리고 교미 훈련이 되지 않은 어린 연령에 수컷 고양이나 번식 장애 증상을 보이는 수컷에서는 기형정자율이 더 높아진다는 보고도 있다. 그와 반대로 전기

Table 2. Evaluation of post-thaw semen that were collected EE and AV methods (Mean±SD)

Collection methods	Volume (μl)	Conc.×10 ⁶ /ml	Motility (%)	Viability (%)
EE	-	89±2.2	53.1±3.6	22.6±10.6
AV	42.5±3.5	128±7.8	73.6±5.7*	37.1±26.1

* Values with different superscripts within columns are significantly different ($p<0.01$).

Table 3. Proportion of morphologically abnormal or normal thawed spermatozoa of male cats by Diff-quick (Mean±SD)

Collection methods	Morphological abnormal sperms (%)			Morphological normal sperms (%)
	Head defects	Midpiece defects	Flagella defects	
EE	9.0±21.9	19.2±24.0	42.8±46.6	27.0±50.2
AV	11.9±17.6	11.4±17.6	31.9±45.9	45.61±123.0

자극법은 마취를 통해 고양이를 안정적으로 고정하여 혼란이 되지 않거나 극도로 예민한 고양이의 정액 사출을 용이하게 하였다. 전기자극으로 정액을 채취할 때 마취에 대한 내분비적 변화와 그에 따르는 정액의 성상의 변성에도 영향을 미친다는 다양한 견해도 있다 (Carter 등, 1984; Axner 등, 1997; Zambelli 등, 2007). 따라서 본 실험에서는 정액채취법에 대한 차이를 다양한 염색방법을 통하여 형태학적인 측면에서 조사해 보았다.

Eosin-B를 이용한 생사염색에서는 두 처리구 간에는 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 생존한 정자의 비율이 대체적으로 낮았다. Diff-quick morphology 검사에서도 두 처리구 간에서 비슷한 양상을 나타내었다. Table 2는 정자 morphology에서 정자의 꼬리 부분에서 전기자극법과 인공질법에서 각각 61.0%, 57.6%로 비정상적인 정자가 많이 발견되었다 (Table 3). 정자의 형태학적 이상에는 Double head, Misshapen head, Elongated head, Proximal droplet, Distal droplet과 Coiled tail 등이 대부분 관찰되는데, 본 연구에서 채취한 고양이의 정액에서는 Proximal droplet과 Coiled tail이 가장 많이 관찰되었다 (Fig. 2B). 이러한 결과는 생식능력이 좋지 않은 고양이에서 비정상적인 정자 발생율이 높게 나타나며, 간혹 생식력이 있는 고양이에서도 관찰된다고 보고하였다 (Axner 등, 2007). 비록 abnormal tail은 수정이 일어날 때 부정적인 양상을 보이지만 abnormal head의 이상보다는 심각한 수준은 아니다 (Barth와 Oko, 1989; Axner 등, 2007). 고양이에서 abnormal tail의 이상은 정액 샘플을 채취할 때 채취빈도에 따라 흔히 감소되며, 이것은 정소상체미부에서 채취한 것보다 사정에 의해 채취된 것에서 발생율이 높다 (Axner 등, 1997; 1998). 한편, 정자의 활력면에서는 전기자극법과 인공질법에서 각각 53.1%, 73.6%로 유의적인 차이가 인정되었다 ($p < 0.01$). 이것은 전기자극을 줄 때에 스트레스 요인과 시술자의 기술 미흡, 채취빈도, 채취 후 처리시간 지연 등이 복합적으로 작용한 것이라고 볼 수 있다.

본 연구의 결과를 요약하면 실험 간에 채취 방법에 따른 정액의 성상과 형태학적 평가기준에서는 유의적인 차이는 없었으나, 활력도에서 다소 전기자극법의 정자 활동성이 떨어지는 결과를 볼 수 있었다. 전기자극법을 이용한 채취는 누구나 쉽게 접할 수 없는 한계가 있다. 전기자극법에 의한 정액채취 시 과도한 자극은 부생식선을 자극하여 정액의 플라즈마 구성에 영향을 준다는 보고도 있다 (Axner 등, 2007). 따라서 전기자극을 이용한 정액채취 시에는 정액을 채취하는 시술자의 기술이 어느 정도 숙달이 되어야 하고, 채취 후의 처리도 능숙해야 하며, 가장 중요하게 고려해야 할 부분은 실험동물의 스트레스와 환경 조성이 가장 우선이라고 사려된다.

인용문헌

1. Axner E, Strom B, Linde-Forsberg C (1997): Sperm morphology is better in the second ejaculate than in the first in domestic cats electroejaculated twice during the same period of anesthesia. *Theriogenology* 47(4):929-934.
2. Axner E, Holst BS, Linde-Forsberg C (1998): Morphology of spermatozoa in the cauda epididymidis before and after electroejaculation and a comparison with ejaculated spermatozoa in the domestic cat. *Theriogenology* 50(6):973-979.
3. Axner E, Linde Forsberg C (2007): Sperm morphology in the domestic cat, and its relation with fertility A retrospective study. *Reproduction in Domestic Animals* 42(3):282-291.
4. Bader H, Hoppen HO, Wokener A, Merkt H (1988): Case studies in stallions with fertility problems: Endocrine and spermatological aspects. *Proc 11th Int Cong Anim Reprod Artif Insem* (3):367.
5. Barth AD, Oko RJ (1989): *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. Iowa State University Press Inc., Ames IA, USA.
6. Carter KK, Chakraborty PK, Bush M, Wildt DE (1984): Effects of electroejaculation and ketamine-HCl on serum cortisol, progesterone, and testosterone in the male cat. *J Androl* 5(6):431-437.
7. Choi EG, Lee YS, Cho SJ, Jeon JT, Cho KW, Kong IK (2010): Semen characteristics of genetically identical male cats cloned via somatic cell nucleus transfer. *Theriogenology* 73(5):638-644.
8. Dooley MP, Pineda MH (1986): Effect of method of collection on seminal characteristics of the domestic cat. *Am J Vet Res* 47(2):286-292.
9. Dooley MP, Pineda MH, Hopper JG, Hsu WH (1991): Retrograde flow of spermatozoa into the urinary bladder of cats during electroejaculation, collection of semen with an artificial vagina, and mating. *Am J Vet Res* 52(5):687-691.
10. Howard JG, Brown JL, Bush M, Wildt DE (1990): Teratospermic and normospermic domestic cats: Ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones, and improvement of spermatozoal motility and morphology after swim-up processing. *J Androl* 11 (3):204-215.
11. Howard JG, Donoghue AM, Johnston LA, Wildt DE (1993): Zona pellucida filtration of structurally abnormal spermatozoa and reduced fertilization in teratospermic cats. *Biol Reprod* 49(1):131-139.
12. Jayaprakash D, Patil SB, Kumar MN, Majumdar KC, Shivaji S (2001): Semen characteristics of the captive Indian leopard, *Panthera pardus*. *J Androl* 22(1):25-33.
13. Migaki G (1982): Compendium of inherited metabolic diseases in animals. *Prog Clin Biol Res* 94:473-501.
14. Mota PC, Ramalho-Santos J (2006): Comparison between different markers for sperm quality in the cat: Diff-quick as a simple optical technique to assess changes in the DNA of feline epididymal sperm. *Theriogenology* 65(7):1360-1375.
15. Platz CC, Wildt DE, Seager SW (1978): Pregnancy in the domestic cat after artificial insemination with

- previously frozen spermatozoa. J Reprod Fertil 52 (2):279-282.
16. Scott P, Cats in Hafez ES, editors (1970): Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals. Philadelphia: Lea and Febiger 205.
 17. Sojka NJ, Jennings LL, Hamner CE (1970): Artificial insemination in the cat (*Felis catus* L.). Lab Anim Care 20(2):198-204.
 18. Wildt DE, Howard JG, Hall LL, Bush M (1986): Reproductive physiology of the clouded leopard: I. electroejaculates contain high proportions of pleiomorphic spermatozoa throughout the year. Biol Reprod 34(5):937-947.
 19. Wildt DE, Phillips LG, Simmons LG, Chakraborty PK, Brown JL, Howard JG, Teare A, Bush MA (1988): Comparative analysis of ejaculate and hormonal characteristics of the captive male cheetah, tiger, leopard, and puma. Biol Reprod 38(2):245-255.
 20. Zambelli D, Cunto M (2006): Semen collection in cats: Techniques and analysis. Theriogenology 66(2): 159-165.
 21. Zambelli D, Cunto M, Prati F, Merlo B (2007): Effects of ketamine or medetomidine administration on quality of electroejaculated sperm and on sperm flow in the domestic cat. Theriogenology 68(5):796-803.

(접수일자: 2011. 2. 25 / 채택일자: 2011. 3. 3)