

碩士學位論文

개 精子的 保存에 關한 研究

— 保存液, Caffeine 濃度, 冷却速度, 保存溫度 및
保存期間이 개 精子的 活力에 미치는 影響 —

濟州大學校 大學院

畜産學科



1992年 12月

개 精子的 保存에 關한 研究

保存液, Caffeine 濃度, 冷却速度, 保存溫度 및
保存期間이 개 精子的 活力에 미치는 影響

指導教授 康 珉 秀

朴 南 建

이 論文을 農學 碩士學位 論文으로 提出함.

1992年 12月 日

제주대학교 중앙도서관
제주대학교 농학도서관
朴南建의 農學 碩士學位 論文을 認准함.

審査委員長 _____

委 員 _____

委 員 _____

濟州大學校 大學院

1992年 12月

STUDIES ON THE STORAGE OF DOG SPERM
EFFECTS OF EXTENDER, CAFFEINE CONCENTRATION, COOLING RATE,
STORAGE TEMPERATURE AND STORAGE PERIOD ON
SPERMATOZOAL MOTILITY IN DOGS

Nam-Geon, Park

(Under the Supervision of Professor Min-Soo, Kang)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF AGRICULTURE

DEPARTMENT OF ANIMAL SCIENCE
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1992. 12.

目 次

Summary	1
I . 緒 論	3
II . 研 究 史	6
1. 개의 一般精液性狀	6
2. 精液의 液狀保存	8
III . 材 料 및 方 法	10
1. 實驗期間 및 場所	10
2. 供試動物	10
3. 保存液	10
4. 實驗方法	12
5. 統計分析	14
IV . 結 果 및 考 察	15
1. 精液의 一般性狀	15
2. 精液의 保存	21
V . 摘 要	33
參考文獻	35

SUMMARY

Studies were conducted to investigate the effect of extender, caffeine concentration in a extender, cooling rate, storage temperature and sotrage period on spermatozoal motility in dogs.

Semen was collected by digital manipulation from Miniature Poodle twice a week. Sperm-rich fractions of the ejaculate were stored in egg yolk sodium citrate extender(EYC) and extender containing mainly peptone, egg yolk, trisaminomethane, inositol and citric acid(PETIC) at 37 °C or 4 °C, each for 6, 12, 24, 48, 72, 96 and 120 hours. The diluted semen were either plunged into 4 °C water or cooled at a rate of - 0.5 °C / min.

The results are summarized as follows;

1. Volumes of 1st + 2nd and 3rd fractions of collected semen were 0.4 ± 0.01 ml and 1.3 ± 0.06 ml, respectively; sperm concentration in 1st + 2nd fraction of semen was $1.9 \pm 0.21 \times 10^8$ / ml with 13.3 ± 0.9 % of spermatozoa having morphological defects; and pH of semen was 6.3 ± 0.01 .
2. Among the abnormal sperm(13.3 % of the total), percentage of sperm with abnormal head, neck and tail was 9.2 ± 0.7 , 20.3 ± 1.3 and 70.5 ± 1.6 %, respectively.
3. When undiluted semen and semen diluted with EYC or PETIC extender were stored at 4 °C after slow cooling(- 0.5 / min), motility of

- spermatozoa in diluted semen were greater($P < 0.05$) than that of sperm in undiluted semen.
4. Motility index of spermatozoa in semen diluted with EYC or PETIC extender was not different($P > 0.05$) when the diluted semen was stored at 4 °C (after slow cooling) for 72 hours, but motility index in semen diluted with EYC extender was superior($P < 0.05$) to that found with PETIC extender when the diluted semen stored at 4 °C for 96 hours or 120 hours.
 5. When 3, 6, 9, 12 and 15 mM caffeine was added to PETIC extender, motility of spermatozoa in semen diluted with PETIC extender containing all levels of caffeine was almost zero after the semen was stored at 37 °C for 24 hours. When the diluted semen was stored at 4 °C (after slow cooling) for 24 hours, motility of spermatozoa was similar($P > 0.05$) at all concentrations of caffeine, but when the diluted semen was stored at 4 °C for 72 hours and 120 hours, motility of spermatozoa in semen diluted with PETIC extender containing 3 mM caffeine was superior($P < 0.05$) to that found with PETIC extender containing 12 mM or 15 mM caffeine.
 6. Motility of spermatozoa was not different($P > 0.05$) between semen diluted with PETIC extender with or without caffeine when the diluted semen was cooled fast (by plunging into 4 °C water) and stored at 4 °C.

I. 緒 論

遺傳能力이 優秀한 牲畜이 人工授精體系를 통하여 廣範圍하게 利用하기 위해서는 採取된 精液(semen)의 精子(spermatozoa)가 最大限의 受精能力을 保有한 狀態에서 長時間 保存되어야 한다. 精자를 保存하는데 있어서, 각종의 緩衝液(buffer)이나 保存液(diluent, extender)이 開發되어 報告되고 있으나, 家畜의 種類에 따라 그 組成에 있어서 큰 差異가 있다(Sorensen, 1979; 李, 1988). 이러한 保存液의 差異는 精子의 生存에 必要한 要因들이 家畜에 따라 서로 다르고 家畜에 따라 精子의 代謝에 있어서 特異성을 갖고 있기 때문이다(Hafez, 1980; Ahmed 등, 1984; Salem 등, 1992).

低溫에서 保存되는 精子의 受精能力은 낮은 溫度에서 代謝의 抑制, 保存液에 의한 低溫衝擊(cold shock)으로 부터 精子의 保護, 低溫衝擊에 대한 精子의 內在的인 抵抗性 등에 의존된다(Bouchard 등, 1990).

닭과 칠면조 精子는 5 °C에 保存되었을 때, 精子의 代謝는 減少하였다. 이것은 에너지와 酸素 消費量이 制限됨에 따라 精子의 代謝가 抑制되었기 때문이다(Wishart, 1984). 低溫에서 保存할 경우 精子는 低溫衝擊으로 부터 精子를 保護할 物質을 필요로 하는데, 이에는 卵黃, 牛乳, 脫脂粉乳 등이 널리 이용되고 있다. 低溫衝擊을 받는 동안, phospholipid는 精子 原形質膜의 lipid 構造와 相互作用하여 低溫衝擊으로 부터 精子를 保護한다고 하였다. Lipoprotein은 精子의 保存 중에 精子細胞膜과 結合하고, 細胞의 構成 要素를 保護하는데 효과적이다(Parks 등, 1992). 개, 사람, 닭 및 토끼 精子들은 大家畜의 精子보다 低溫衝擊에 강하다고 報告하였다(Bouchard 등,

1990).

개(犬) 精자의 保存에 관한 報告는, 1780年 이탈리아의 生物學者 Spallanzani에 의하여 세계 최초로 人工授精이 成功하였는데(康, 1992), 이것은 哺乳動物에 있어서 人工授精을 應用한 최초의 記錄이다. 그 후 소, 말을 中心으로 하여 人工授精은 급속히 進步 發展 하였다.

개의 人工授精技術은 다른 家畜에 비하여 매우 不振하였으나, 保存液으로서 卵枸液(Brochart와 Coulomb, 1952; Foote, 1964), 牛乳保存液(Harrop, 1954, 1956) 및 tris-保存液(Gill 등, 1970) 등이 점차 開發되면서 활발히 연구되기 시작하였다(李, 1988).

개 精液의 凍結保存에 關한 研究는 1969年 Seager에 의하여 受胎 結果가 최초로 發表되었고, 黑田 등(1973), Seager 등(1973, 1975), 武石(1976) 등은 卵枸液을 主成分으로 한 稀釋液을 利用하여 仔犬이 分娩했다고 報告했다(康, 1992).

이처럼 개의 人工授精에 대한 研究가 不振한 理由로는 여러 가지가 있으나, 개의 精자가 稀釋液에 대단히 敏感하기 때문에 適當한 稀釋液의 開發이 곤란하였고, 개의 飼育은 經濟的 또는 產業的인 動物과 달리 集團飼育形態가 아니기 때문이다.

그러나, 近來에 들어와서 여러 가지 飼育目的에 알맞은 純粹優良犬의 繁殖이 盛行함과 동시에 國民所得의 增大에 따른 生活 與件의 變化로 家庭에서 愛玩犬이나 기타 純粹種의 飼育이 增加하고 있는 실정이다.

따라서 本 研究는 愛玩犬의 生産能力을 향상시키기 위한 일환으로 愛玩犬 精液의 一般性狀檢査 및 凍結保存의 基礎 資料 獲得을 위하여 이미 發表된 卵枸液(Foote, 1964)과 PETIC 保存液(黑田, 1988)을 이용한 低溫保存에

있어, 保存液 中の caffeine 濃度, 冷却速度, 保存溫度 및 保存期間이 精子의 活力에 미치는 影響 등을 究明하기 위하여 實施하였다.



II. 研究史

人工授精에 대한 研究는 1780年 Spallanzani에 의하여 雌犬 30頭에 人工授精을 實施하여 18頭를 妊娠시켜 정상적인 仔犬를 分娩시킨 이래, 대부분의 家畜에서 이 分野에 대하여 研究가 활발히 進行되어 많은 業績을 쌓아왔다. 특히 低溫 및 凍結保存技法이 開發되면서 人工授精의 技術은 持續的으로 研究發展하게 되었다. 現在에는 家畜의 種類에 따라 各 種의 保存液들이 開發되어 世界的으로 人工授精이 普遍化되어 實用的으로 活用되고 있다.

1. 개의 一般精液性狀

1回 射精量과 精子數는 品種, 年齡, 採取頻度 및 方法 등에 따라 다르며, 同一 品種內의 個體間에도 差異가 있다.

1) 精液量

河野 등(1988)의 報告에 의하면, 體重이 約 10 kg의 雜種犬(2~4歲)에 있어서 採取頻度別 精液量을 보면, 1 分割의 量은 72時間, 48時間, 24時間 間隔으로 精液을 採取한 結果 1.1 ml, 1.4 ml, 2.0 ml로 採取頻도가 많을 수록 서서히 增加하고, 2 分割의 量은 72時間에서 0.7 ml, 48時間에서 0.6 ml로 別差異는 없었으나, 24時間에서는 0.3 ml로 採取頻도가 많을 수록 顯著的한 減少가 있었다고 하였다($P < 0.01$). 그리고 3 分割의 量은 72時間, 48時間, 24時間 採取間隔에서 각각 8.6 ml, 9.5 ml, 6.5 ml로 採取頻도에 대한



影響은 없었다고 報告하였다.

한편, Harrop(1955), 黒田(1982) 등은 總精液量은 봄철과 겨울철에 많았고 여름철에는 減少하였으며, 個體間的 差異도 크다고 報告했는데, 이런 差異의 주요인으로는 3 分割量의 增減에 있다고 報告하였다.

그리고 精液의 外觀狀 色調는 1 分割은 透明하고 가끔 死滅된 精子 및 尿道의 剝離上皮細胞가 含有되며, 2 分割은 精子가 含有되는 分割으로서 乳白色을 띠며, 精子數의 增加에 따라 色調가 짙어진다고 하였다. 그리고 3 分割은 透明한 液으로서, 이 液은 前立腺으로부터 分泌되며 精子는 存在하지 않는다고 報告하였다(Bartlett, 1962; 黒田, 1982).

2) 精子數

河野 등(1988)은 72時間 間隔 採取時의 精子濃度는 7.6×10^8 / ml이었으나, 48時間에서는 3.8×10^8 / ml, 24時間에서는 1.6×10^8 / ml로 採取間隔이 짧을수록 減少하였다고 報告하였다($P < 0.01$).

그리고 黒田(1982)은 雄犬의 性成熟度, 營養狀態, 品種 및 體軀 크기에 따라 差異가 있다고 하였다. 性成熟은 個體差가 있으나 生後 約 12個月이 되면 安定되고, 2~4歲가 되면 최고 良好한 時期로 高齡化 될 수록 精子數, 精子運動性이 低下된다고 하였다. 正常犬의 總精子數는 $5 \times 10^7 \sim 10^9$ 의 範圍라고 報告하였다.

3) pH

精液의 pH는 採取方法과 射精되는 分割에 따라 다소 差異가 있다. Harrop(1955)는 1 分割의 pH 6.37, 2 分割의 pH 6.10, 3 分割은 pH 7.20으

로 平均 pH 6.75(5.8~6.9)라고 報告하였는데 반해, 河野 등(1988)과 黒田 (1982)은 弱酸性으로서 pH 5.8~6.7 範圍, 대체로 pH 6.0~6.2를 나타냈다고 報告하였다.

4) 精子畸形率

精子畸形率は 대체로 10~20 %로 여름철에는 他 季節에 비해 畸形率이다 소 높아진다고 하였다. 그리고 採取間隔에 따라 精子畸形率도 달라지는데, 採取頻度가 많을 수록 精子畸形率は 顯著히 增加한다고 報告하였다 (Bartlett, 1961; 黒田, 1982; 河野 등, 1988).

2. 精液의 液狀保存

개 精子는 採取 후 原精液을 35~37 °C에 保存할 경우 約 12時間 生存이 가능하다고 報告하였다(Bouchard, 1990). Kuroda 등(1973)은 37 °C에서 洗精精子의 代謝能力을 調査한 結果, 3 % glycine 液, 0.1 M 第2磷酸나트륨 液 또는 牛乳의 添加에 의해 代謝能力이 良好하였으며, inositol, glycine, peptone, trisaminomethane, citric acid, 卵黃 등과 설파제 및 抗生制로 調製된 PETIC 液에서 代謝能力이 優秀하였다고 報告하였다.

李(1988)에 의하면, Harrop(1960)는 滅菌된 均質牛乳를 主成分으로 한 稀釋液에서 精液을 稀釋한 후 4~5 °C에서 保存하여 4~5일간 保存이 가능하였다고 報告하였다. Bouchard 등(1990)은 NFDMS-G(nonfat dried milk solid - glucose)稀釋液에서 精液을 稀釋한 후 4 °C에서 保存한 結果, 精子의 活力은 優秀했으며, 특히 4 °C까지 冷却速度를 - 1 °C / min 또는 - 0.3

℃ / min으로 下降하였을 때 精子的 活力이 보다 優秀하였다고 報告하였다.

그리고 稀釋液에 caffeine 添加가 精子的 活力에 미치는 影響에 대한 研究로는, Miyamoto 등(1979)이 소 精子를 碳酸구연산소다액에 稀釋하여 37 ℃에서 6時間 培養 또는 4 ℃에서 7日間 保存하였을 때, 각각 5.4~13.5 mM의 caffeine 添加에 의해 비교적 높은 精子 生存性を 維持하였다고 報告하였다. 그러나, Rees 등(1990)은 사람의 精子에 3 mM 이상의 caffeine 添加는 오히려 精子的 活力이 減少했다고 報告하였다.



Ⅲ . 材 料 및 方 法

1. 實 驗 期 間 및 場 所

本 實 驗 은 1992年 4月 부터 同 年 10月 까지 濟 州 大 學 校 農 科 大 學 畜 產 學 科 家 畜 人 工 授 精 學 實 驗 室 과 附 設 動 物 飼 育 場 에 서 實 施 되 었 다 .

2. 供 試 動 物

供 試 動 物 은 體 重 이 3.0~4.6 kg의 愛 玩 犬 인 Miniature Poodle(2~4歲) 7頭 를 實 驗 에 供 試 하 였 다 . 飼 育 方 法 은 舍 內 에 서 케 이 지 飼 育 을 하 였 고 , 오 전 과 오 후 2回 에 걸 쳐 約 30分 間 運 動 시 켜 다 . 飼 料 의 給 與 는 Purina proplan(株 . Purina) 과 Purina bonus junior(株 . Purina) 를 1:1로 混 合 하 여 1日 2回 (아 침 · 저 녁 , 約 70 g) 約 140 g을 給 與 하 고 , 添 加 劑 로 는 食 慾 및 消 化 促 進 , 泄 瀉 豫 防 을 위 하 여 CYC[生 酵 母 (株 . 中 央 케 미 칼)]와 綜 合 營 養 劑 Grosol (株 . 한 국 바 이 엘 화 학) 을 添 加 하 였 다 . 그 리 고 물 은 自 由 給 水 시 켜 다 .

3. 保 存 液

本 實 驗 에 사 용 된 保 存 液 은 Foote(1964)에 의 하 여 調 製 된 卵 朮 液 (egg yolk sodium citrate ; EYC) 과 黑 田 (1988)에 의 하 여 peptone, egg yolk, trisaminomethane, inositol, citric acid를 主 成 分 으 로 하 여 開 發 된 PETIC

保存液을 이용하였고, 일부 實驗에서는 caffeine을 添加한 稀釋液을 調製하여 採取한 精液을 稀釋하여 保存하였다.

Table 1. Composition of seminal extenders

Component	EYC extender	PETIC extender
Sodium phosphate, 12H ₂ O	-	20 mg
KCl	-	30 mg
Sodium citrate, 2H ₂ O	1.45 g	900 mg
Inositol	-	60 mg
Glycine	0.93 g	375 mg
Peptone	-	500 mg
Tris(hydroxymethyl)- aminomethane	-	1,211 mg
Citric acid	-	681 mg
Glucose	1.25 g	-
Homosulfamine	-	10 mg
Egg yolk	20 (V/V %)	20 (V/V %)
Penicillin G	1,000 IU / ml	900 IU / ml
Streptomycin sulfate	1 mg / ml	0.9 mg / ml

4. 試驗方法

本 研究를 遂行하기 위한 細部 項目別 實驗方法은 다음과 같다.

1) 精液採取

精液採取는 週 2回(火, 金) 午前(09:00-10:00) 혹은 午後(18:00-19:00)에 實施하였다.

採取方法은 手指法(digital manipulation)에 의해 實施하였다. 즉, 雄犬의 뒷다리 사이로 오른손을 넣어 包皮를 따라 가볍게 마사지하여 완전히 勃起하기 전에 包皮를 龜頭球의 後方으로 벗기고, 龜頭球의 後方을 오른손의 엄지와 검지손가락을 이용하여 가볍게 壓迫하면서 penis를 아래로 향하게 하여 완전히 勃起하도록 誘導하였다. 왼손은 10 ml 採取管에 칼때기를 插入하여 精液을 採取했으며, 1·2와 3 分割으로 나누어 分割採取하였다(黑田, 1988).

2) 精液의 性狀檢査

(1) 精液量

精液量은 10 ml 採取管을 이용하여 1·2 分割과 3 分割을 각각 分離採取하여 그 量을 測定하였다.

(2) 精子の 活力

精子の 活力檢査는 37 ℃로 미리 加溫된 slide glass에 精液을 소량 滴下하여 37 ℃로 미리 加溫된 cover glass로 덮은 후 顯微鏡下에서 400×로 檢査하였다. 精子の 活力은 生存指數(motility index ; MI)로 換算하였다.



(3) 精자의 生存率

精자의 生存率은 1 % eosin과 4 % aniline blue를 1/8 M 磷酸緩衝液에 溶解한 染色液을 slide glass에서 精液과 신속히 混合하여 塗抹한 후 風乾하여 顯微鏡下에서 1,000×로 染色狀態를 調査하여 生死를 判定하였다.

(4) 精子濃度

精子濃度は 採取한 1·2 分劃에 대하여, 3 % 生理食鹽水에 血球用 피펫을 이용하여 20倍 稀釋한 다음 血球計算板을 이용하여 射精當 總精子數와 ml 當 精子數를 計算하였다.

(5) pH

pH는 1·2 分劃에 대하여, BTB 試驗紙(株. 東洋濾紙)에 의한 比色法으로 測定하였다.

(6) 精자의 畸形率

精자의 畸形率은 1·2 分劃에 대해 塗抹標本을 作成하여 形態的 異常精자의 比率를 調査하였다. 또 畸形精자를 기준으로 하여 頭部, 頸部, 尾部 등 部位別로 나누어 形態的 畸形精子率을 算出하였다.

3) 精자의 保存

精자의 保存은 生存指數가 80 이상이 되는 精자를 이용하여 3가지 유형에 따라 실시되었는데 ;

① 1·2 分劃의 濃厚한 精液을 採取直後 37 °C와 4 °C에서 保存하였는데, 이 때 4 °C까지 緩慢冷却(- 0.5 °C / min)으로 下降시켰다. 保存時間을 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120時間으로 精자의 活力을 調査하였다.

② Foote(1964)에 의하여 開發된 卵枸液과 黒田(1988)에 의하여 開發된 PETIC 保存液에 採取直後 1:2 分割을 精子濃度の 水準에 따라 35 ℃ 前後에서 4~6倍의 比率로 稀釋한 후 37 ℃와 4 ℃에서 각각 保存하였는데, 이 때 4 ℃까지의 冷却速度는 - 0.5 ℃ / min로 下降하여 보존한 것과 稀釋直後 4 ℃로 冷却한 물에 곧바로 浸漬하여 保存 후 檢査하였다.

③ PETIC 保存液에 caffeine을 3, 6, 9, 12, 15 mM을 添加하여 前記 ②번의 保存方法과 동일한 稀釋液 調製 過程으로 稀釋 및 冷却處理하여 保存한 후 精子의 活力을 檢査하였다.

5. 統計分析

統計分析은 MINITAB(Minitab Inc., 1987)을 이용한 分散分析에 의하여 分析하였고, 有意性 檢定은 Student's t-test에 의하여 檢定하였다 (P<0.05).



Ⅳ . 結果 및 考察

1. 精液의 一般性狀

精液은 手指法(digital manipulation)에 의하여 採取하였으며, 精液의 一般性狀에 대하여 調査한 結果는 Table 2에 提示된 바와 같다

本 實驗에서 供試犬은 小型種으로 精液量이 적었고, 分割採取時 1과 2 分割의 区分이 困難하여 混合採取하였다. 1·2 分割 精液量은 0.4 ml로 나타났으며, 0.1~1.6 ml로 範圍가 컸다. 그리고 봄철에는 여름철보다 精液量이 많았다. 3 分割의 精液量은 1.3 ml였으며, 0.2~2.5 ml의 範圍를 나타냈다. 이러한 差異는 精液採取時 供試犬의 性慾 強弱에 따라 左右되는 것으로 여겨졌다.

精子의 活力은 個體 또는 同一 個體에 있어서도 射精回數에 따라 差異가 심했다. 本 實驗에서 精子의 生存指數(MI)는 89.0를 나타냈다. 그리고 slide grass를 이용한 染色法으로 精子의 生死를 判定한 結果 87.6 %의 生存率을 보였다.

精子濃度는 1.9×10^8 / ml였으나 $0.04 \sim 6.87 \times 10^8$ / ml로 個體間에 상당한 差異가 認定되었고, 同一 個體에 있어서도 性慾의 強弱에 따라 精子濃度の 差異가 심하였다. 그리고 總精子數는 0.9×10^8 이었다.

精液 1·2 分割의 pH는 6.3으로 弱酸性을 나타내었고, 대체로 6.0~6.9의 範圍를 나타내었다.

採取直後에 精子를 slide grass로 塗抹하여 檢査한 精子의 畸形率은

Table 2. Semen characteristics of dogs used in this study*

Parameters	No. of ejaculation	Mean	Range
Semen volume(ml)	72	1.8 ± 0.08	0.6~3.7
1·2nd fraction	174	0.4 ± 0.01	0.1~1.6
3rd fraction	66	1.3 ± 0.06	0.2~2.5
Motility Index	109	89.0 ± 0.9	50~100
Viability(%)	91	87.6 ± 0.8	62~98
Sperm concentration(×10 ⁸ /ml)	51	1.9 ± 0.21	0.04~6.87
Total sperm count(×10 ⁸)	51	0.9 ± 0.09	0.02~2.75
pH	66	6.3 ± 0.01	6.0~6.9
Morphological defect(%)	71	13.3 ± 0.9	3~38.5
Time of ejaculation(min.)	70	6' 10" ± 13.0	2' 11" ~ 11' 38"
1·2nd fraction	114	2' 16" ± 6.3	44" ~ 6' 59"
3rd fraction	66	3' 49" ± 10.4	34" ~ 7' 45"

*Values are means ± SE.

Table 3. Percentage of morphological defects among the abnormal spermatozoa in dogs*

Morphological defects(%)			
Total	Head	Neck	Tail
13.3±0.9	9.2±0.7	20.3±1.3	70.5±1.6

*Values are means ± SE of 71 samples.

13.3 %였으며, 形態的 畸形率은 頭部畸形이 9.2 %, 頸部畸形이 20.3 %, 尾部畸形이 70.5 %로 尾部畸形率이 가장 높았다(Table 3).

1·2 分割의 射出時間은 2分 16秒였으나 供試犬의 性慾 強弱에 따라 44秒에서 6分 59秒까지 範圍를 보였고, 3 分割의 射出時間은 1·2 分割보다 精液採取時間이 길어 3分 49秒였으며, 역시 1·2 分割의 採取時間과 마찬가지로 性慾에 따라 採取時間이 差異를 나타냈다.

이러한 精液의 一般性狀에 대한 結果에서, 黑田(1982)은 Spitz 種에서 1 分割과 2 分割의 精液量은 각각 1.0 ml과 1.3 ml라 하였고, Bartlett (1962)는 1 分割보다 2 分割의 精液量이 많다고 보고하였다(P<0.01). 河野

Plate 1

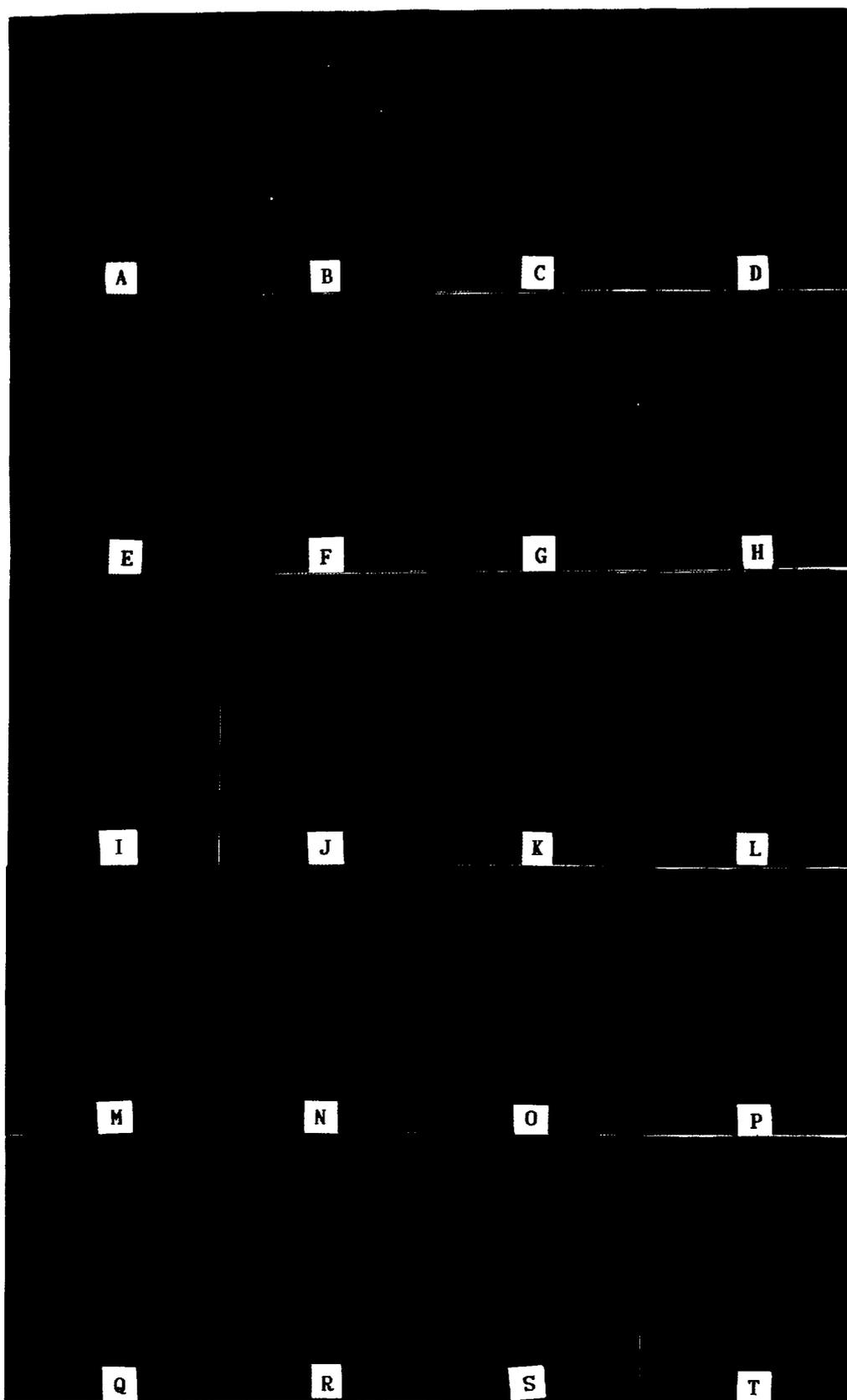


Plate 1. Classification of morphological defects of dogs spermatozoa.

A : Normal form	K : Double tail
B : Dwarf head	L : Double loop of the tail
C : Gigantic head	M : Loop of the end part of the tail
D : Indented head	N : Single loop of the tail
E : Mid cytoplasmic droplet	O : Short tail
F : Thickened midpiece	P : Undeveloped form
G : Proximal cytoplasmic droplet	Q : Coiled tail
H : double head	R : Bent midpiece
I : Bent midpiece	S : Loose head
J : Folded tail	T : Undeveloped tail

등(1988)은 72시간採取間隔에서 1分劃과 2分劃의精液量은 1.1 ml과 0.7 ml로 2分劃이 낮은傾向을 보였다. 그리고採取頻도가 많을수록精液量은減少하였다고報告하였다. 그러나 Harrop(1955)는 하루에 한번씩 18日 동안 연속하여精液을採取한結果,射出頻도에 따른精液量의差異는 없었다고報告하였다.本實驗에서는射精量이 적어서 1·2分劃을混合하여採取하였기 때문에 1分劃과 2分劃의量은分劃測定할 수 없었다.

河野 등(1988)은 72, 48, 24시간採取間隔에서精子の生存指數는 각각 100, 80.5, 34.2로採取頻도가 많을수록低下하였다고報告하였다($P < 0.01$).本實驗에서도週 2回精液을採取하고精子の生存指數를調査한 결과 89.0로類似한傾向을 보였다. 또한黑田(1982)은 여름보다는 봄, 가을, 겨울철에精子の生存指數가 높았다고 하였다.

Bartlett(1962)은分劃採取時 2分劃의精子濃度は $2.47 \times 10^8 / \text{ml}$ 였으나總精液量의精子濃度は $53 \times 10^6 / \text{ml}$ 였다고 보고하였다.分劃 또는全精液으로 채취했을 때, 이와 같은精子濃度の 큰差異는, Harrop (1955)는 3分劃이前立腺으로부터分泌되는前立腺液의量에 따라 좌우된다고報告하였다.河野 등(1988)은精子濃도가 72시간과 48시간採取間隔에서 각각 $7.6 \times 10^8 / \text{ml}$ 와 $3.8 \times 10^8 / \text{ml}$ 라고 하였으나,本實驗에서는週 2回採取한結果精子濃度は $1.9 \times 10^8 / \text{ml}$ 였다.

pH는 일반적으로弱酸性으로 Harrop(1955)는 1分劃 6.37, 2分劃 6.37, 3分劃 7.20이라고報告하였다. 그리고河野 등(1988)도 2分劃의 pH는 6.2였다고報告하였다.本實驗에서도 1·2分劃의 pH는 6.3으로 다른研究者들의結果와類似한傾向을 보였다.

Bartlett(1962)은精子畸形率은 15 %라고報告하였는데,本實驗에서의

13.3 %와 類似하였다. 精子的 形態的 畸形率의 比率은 河野 등(1988)은 72 時間 採取時間에서 頭部, 頸部, 中片部 및 尾部的 畸形率은 각각 18.8 %, 11.7 %, 21.9 % 및 45.7 %로 採取頻度가 많을수록 精子畸形率이 높아졌다고 報告하였다. 이는 本 實試驗에서 Table 3에 나타난 바와 같이 頭部 9.2 %, 頸部 20.3 %, 尾部 70.5 %와 比較하였을 때 頭部畸形率은 本 實驗의 結果가 낮았으나, 頸部畸形率은 높게 나타났고 尾部的 畸形率은 類似한 傾向을 보였다.

精液의 射出時間은 Harrop(1955), 黒田(1982) 등이 1·2 分劃의 射出時間은 約 2分, 3 分劃은 3~25分이라고 報告하였으나, Bartlett(1962)는 1 分劃 27秒, 2 分劃 52秒, 3 分劃 8分이라고 報告하였다. 本 實驗에서는 1·2 分劃의 射出時間은 2分 16秒, 3 分劃의 射出時間은 3分 49秒였다.

2. 精液의 保存

採取한 精液은 稀釋液에 35 °C 前後에서 稀釋시킨 후 保存液, caffeine 添加, 冷却速度, 保存溫度 및 保存期間에 따른 精子的 活力을 調査한 結果는 다음과 같다. 37 °C에서 保存한 精子들은 24時間 이후 거의 精子的 活力이 소멸되었기 때문에 統計分析에서 제외시켰다.

EYC 혹은 PETIC 保存液에 稀釋한 精液과 原精液을 37 °C와 緩慢冷却으로 下降하여 4 °C에 保存한 精子的 活力은 Table 4에 提示된 바와 같다.

原精液, EYC 혹은 PETIC 保存液에 稀釋하여 37 °C에 保存한 精子는 24時間에 活力이 거의 소멸하였다. 그리고 原精液과 두 保存液에 稀釋한 후 緩慢冷却으로 下降하여 4 °C에 保存하였을 때, 두 保存液에 稀釋한 후 精子

Table 4. Effects of slow cooling rate storage temperature and storage period on spermatozoal motility of semen undiluted or diluted with two extenders in dogs*

Extender	Storage temp. (°C)	No. of ejaculation	Time(hours)							
			6	12	24	48	72	96	120	
Udiluted	37	8	26.9±2.9	13.1±2.9	0.9±0.9	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	4	9	66.8±2.7 ^b	33.1±3.5 ^b	12.1±2.4 ^b	3.5±1.3 ^b	1.1±0.6 ^b	0.2±0.3 ^c	0 ± 0 ^c	0 ± 0
EYC	37	7	77.2±5.5	48.2±8.0	1.4±1.4	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	4	15	87.1±1.8 ^a	81.0±2.5 ^a	71.8±3.4 ^a	61.5±4.0 ^a	46.8±4.1 ^a	35.2±4.2 ^a	21.9±3.7 ^a	0 ± 0
PETIC	37	7	45.2±8.8	14.1±6.5	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	4	13	87.3±1.5 ^a	77.0±4.4 ^a	69.3±4.3 ^a	53.6±4.1 ^a	37.8±2.9 ^a	19.0±3.7 ^b	10.6±2.4 ^b	0 ± 0

*Value are means ± SE.

^{a-c}Means with different superscripts in the same column differ significantly (P<0.05). Observations at 37°C were not included in the statistical analysis.

의 活力은 原精液의 精子活力보다 우수하였다($P < 0.05$). 原精液을 4 °C에서 保存하였을 때, 24時間까지는 生存指數는 12.1였으나, 그 이후 精子의 活力은 거의 소멸되었다. 그러나 37 °C에 保存한 精子보다는 生存時間이 延長되었다.

EYC 또는 PETIC 保存液에 稀釋하여 4 °C에 保存한 精子의 生存指數는 24時間까지 각각 71.8과 69.3을 유지하였고, 保存 72時間에도 각각 46.8과 37.8로 差異가 없었다. 그러나, 保存 96時間과 120時間에서 EYC 保存液에 있어서는 精子의 活力이 각각 35.2와 21.9로 PETIC 保存液에서 보여준 19.0와 10.6보다 活力이 優秀하였다($P < 0.05$).

이러한 結果는, Bouchard 등(1990)이 NFDMS-G와 EYC 保存液에 雜種犬의 精液을 稀釋하여 37 °C에서 保存한 結果 24時間 이후에는 精子의 活力이 소멸하였다는 것과 一致하였다. Kreider 등(1985), 고 등(1990) 등이 말 精子를 稀釋하여 室溫에서 保存하였을 때 保存 24時間 이후에는 精子의 生存性이 거의 소멸하였다는 報告와도 類似하였다.

Gill 등(1970)은 trisaminomethane을 添加한 保存液으로 精子를 2億 이상 함유되게 稀釋한 후 5 °C에서 24時間 保存한 精液으로 授精시켜 自然交配와 같은 수준의 受胎率을 얻었다고 報告하였다.

그리고 Bouchard 등(1990)은 稀釋한 精子를 4 °C에 保存하는 것이 優秀하였으며, 고 등(1990)은 말 精子의 保存에 있어 室溫 혹은 15 °C에 保存한 精子보다는 7~8 °C의 低溫에 保存한 精子가 生存率이 優秀하다고 하였다.

한편, England 등(1992)은 精子를 1 分劃과 3 分劃의 精漿에 稀釋하여 37 °C에서 6時間 동안 培養하여 精子의 活力을 檢査한 結果 각각 27 %와 30 %로 유의차가 없었다고 하였다. 그러나, 前立腺液이 含有된 3 分劃에서는

精子の活力이 抑制되었고, 몇 sample에서는 1 分割과 3 分割의 精漿에서 培養 2時間 이내에 완전히 活力을 잃었다고 報告하였다. 本 實驗에서 1·2 分割의 精液을 混合하여 採取하였기 때문에 1 分割의 分泌液이 保存되는 精子の 活力에 有害한 影響을 끼쳤을지도 모른다. 그러나, Ashizawa 등(1984, 1987)은 닭 精漿 中の 低分子量因子들은 41 °C에서 닭 精子の 活力과 酸素 消費를 刺戟시켰다고 報告하였고, Blesbois 등(1992)은 精漿 中の 低分子量 因子들은 4 °C에서 保存되는 동안 精子の 受精能力에 有害한 반면에, 精漿 中の 高分子量因子들은 受精能力을 강화시켰다고 報告하였다.

고 등(1990)은 말 精子の 低溫保存時 높은 生存率을 나타내었으나, 常溫에서는 모두 早期死滅하였고, 原精液을 써서 保存한 각 保存溫度에서 短期間 밖에 生存하지 못하는 이유는, 保存液에는 에너지원 및 抗生物質을 포함하고 있는데 반하여, 原精液 내에는 한정된 代謝物質과 抗生物質의 不在에 따른 微生物의 增殖으로 인해 精液의 性狀變化의 可能性을 생각할 수 있다고 報告하였다.

일반적으로, 一般家畜들에 있어서도 37 °C 또는 室溫 등에서 保存한 것 보다는 4~5 °C의 低溫에서 短期保存한 精子が 活力이 훨씬 優秀하였다 (Provin 등, 1985; Varner 등, 1988, 1989; 박 등, 1992).

PETIC 保存液의 基本組成液에 3, 6, 9, 12, 15 mM caffeine을 添加하여 精子를 稀釋한 후 37 °C와 緩慢冷却으로 下降하여 4 °C에 保存한 精子の 活力은 Table 5에 提示된 바와 같다.

37 °C에서 保存 24時間에 全處理에 있어 精子の 活力은 거의 소멸되었다. 이것은 caffeine을 添加하지 않은 PETIC 保存液에 稀釋하여 37 °C에 保存한 精子の 活力과 類似하였다.

Table 5. Effects of slow cooling rate, storage temperature and period on spermatozoal motility of semen diluted with PETIC extender with or without caffeine in dogs*

Caffeine conc. (mM)	Storage temp. (°C)	No. of ejaculation	Time (hours)							
			6	12	24	48	72	96	120	
Control	37	7	45.2±8.8	14.1±6.5	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	4	13	87.3±1.5	77.0±4.4	69.3±4.3	53.6+4.1 ^{ab}	37.8±2.9 ^a	19.0±3.7	10.6±2.4 ^{ab}	
3	37	8	41.9±8.4	13.4±8.3	0.2±0.2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	
	4	9	85.3±3.4	80.3±4.3	71.5±5.2	59.0±4.3 ^a	48.8±4.3 ^a	28.2±5.1	21.7±5.6 ^a	
6	37	7	41.3±8.8	12.3±5.8	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	
	4	10	83.0±3.1	77.5±3.8	62.1±6.9	50.9±6.7 ^{ab}	32.9±7.0 ^{ab}	19.8±4.5	9.0±2.6 ^{ab}	
9	37	8	44.7±8.6	15.0±6.0	1.1±1.1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	
	4	6	80.4±1.3	72.7±3.7	66.3±4.9	57.1±5.4 ^{ab}	30.1±12.0 ^{ab}	18.6±9.1	9.7±5.2 ^{ab}	
12	37	7	55.2±10.0	15.8±10.3	4.3±4.3	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	
	4	8	82.4±4.0	67.8±5.5	55.0±6.1	42.8±4.4 ^b	29.6±5.9 ^b	16.8±5.8	6.5±2.2 ^b	
15	37	7	67.5±5.4	13.7±3.0	0.1±0.1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	
	4	9	78.8±4.6	69.5±4.6	62.5±4.2	47.1±4.9 ^{ab}	24.9±6.1 ^b	14.1±4.8	7.5±3.2 ^b	

*Values are means ± SE.

^{a-b}Means with different superscripts in the same column differ significantly (P<0.05). Observation at 37 °C were not included in the statistical analysis.

Table 6. Effects of fast cooling rate and storage period on spermatozoal motility of semen diluted with PFTTC extender with or without caffeine at 4 °C in dogs*

Caffeine conc. (mM)	No. of ejaculation	Time (hours)						
		6	12	24	48	72	96	120
Control	9	54.5 ± 9.0 ^{ab}	43.1 ± 8.8 ^{ab}	37.8 ± 8.6 ^{ab}	26.3 ± 6.1	16.8 ± 4.6 ^{ab}	7.7 ± 2.9 ^{ab}	4.9 ± 2.2 ^{ab}
3	7	70.5 ± 7.0 ^a	60.9 ± 7.3 ^a	51.5 ± 7.5 ^a	35.7 ± 6.5	26.5 ± 4.0 ^a	19.9 ± 5.2 ^a	11.1 ± 2.9 ^a
6	7	71.4 ± 5.6 ^a	59.6 ± 4.8 ^a	42.7 ± 6.0 ^{ab}	35.0 ± 5.6	22.3 ± 6.3 ^{ab}	10.4 ± 2.7 ^{ab}	4.1 ± 2.4 ^{ab}
9	7	63.9 ± 5.1 ^{ab}	50.6 ± 7.0 ^{ab}	39.8 ± 7.5 ^{ab}	21.5 ± 5.2	9.9 ± 3.7 ^b	4.0 ± 2.3 ^{bc}	0.6 ± 0.5 ^b
12	7	37.9 ± 11.8 ^b	25.4 ± 11.1 ^b	23.2 ± 8.9 ^b	13.9 ± 8.6	8.0 ± 5.9 ^b	6.5 ± 5.7 ^{abc}	3.1 ± 3.1 ^{ab}
15	7	55.4 ± 8.1 ^{ab}	40.0 ± 10.9 ^{ab}	33.3 ± 11.6 ^{ab}	17.4 ± 7.9	8.6 ± 4.2 ^b	0.2 ± 0.1 ^c	0.05 ± 0 ^b

*Valuesn are means ± SF.

^{a-c}Means with different superscripts in the same column differ significantly (P<0.05).

한편, 4 °C에서 保存한 精子的 活力은 24時間까지는 모든 caffeine 수
준에 있어 類似하였으나($P>0.05$), 72時間과 120時間에서 3 mM caffeine을
添加한 保存液에 稀釋한 精子的 活力은 12 mM과 15 mM caffeine을 添加한
保存液에 稀釋한 精子的 活力보다 優秀하였다($P<0.05$). 즉, caffeine 12 mM
이상의 濃度는 精子を 장기간 保存함에 있어 有害하였다. 그러나, caffeine
을 添加하지 않은 PETIC 保存液에 稀釋하여 保存한 精子的 活力과
caffeine을 添加한 PETIC 保存液에 稀釋하여 保存한 精子的 活力 사이에는
有意差가 認定되지 않았다.

PETIC 保存液의 基本組成液에 3, 6, 9, 12, 15 mM caffeine을 添加 稀
釋한 후 急速冷却으로 下降하여 4 °C에 保存한 精子的 活力은 Table 6에 提
示된 바와 같다.

Caffeine을 添加하지 않은 PETIC 保存液과 添加한 PETIC 保存液에 稀
釋하여 4 °C로 急速冷却한 精子的 活力에 대한 有意差는 보이지 않았으나,
12 mM caffeine 濃度에 稀釋한 精子的 活力은 保存 48時間을 제외하고 3 mM
caffeine 濃度에 稀釋한 精子的 活力보다 낮았으며($P<0.05$), 15 mM
caffeine에 稀釋한 精子的 活力도 또한 낮았다($P<0.05$). 그리고 全 保存期
間 동안 有意差는 인정되지 않았으나, 3 mM과 6 mM caffeine을 添加한 保存
液에 稀釋한 精子的 活力은 對照區와 9 mM의 caffeine 濃度에 稀釋한 精子
의 活力보다 優秀한 傾向을 보여 주었다.

Table 5, 6과 같은 結果에서, Miyamoto 등(1979)은 소 精子を Ca-free
KRP 液에 2回 洗精한 다음 이 液에 精子を 浮遊시켜 37 °C에서 8時間 동안
培養하였는데, 10 mM의 glucose와 fructose에 10 mM caffeine을 添加하여
培養한 精子が 基質이 없거나 다른 lactate, pyruvate, acetate 등에 添加

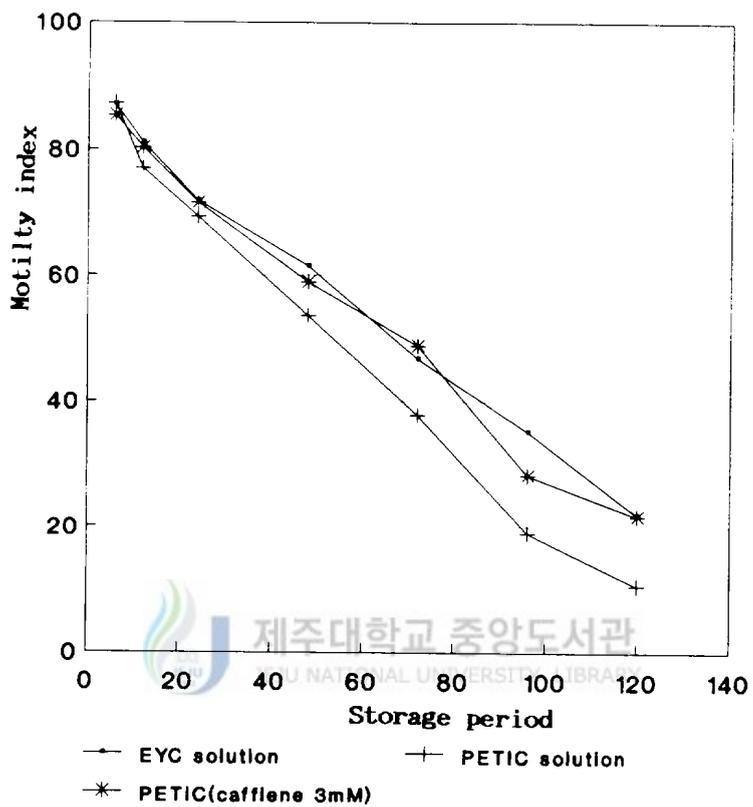


Fig. 1. Effect of storage period and extenders on spermatozoal motility index of dog semen.

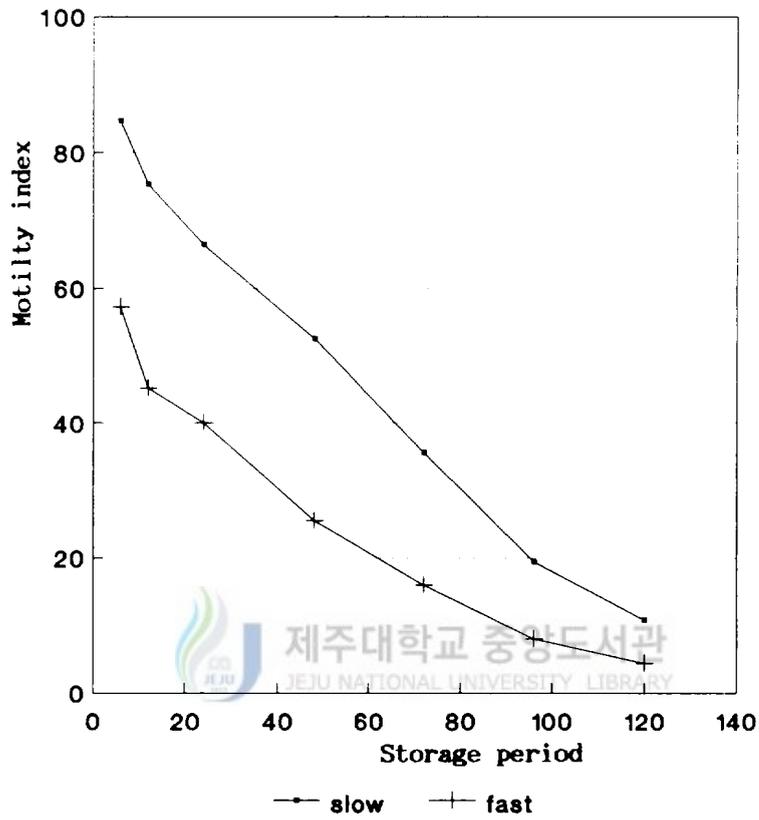


Fig. 2. Effect of storage period and cooling rate on spermatozoal motility index of dog semen.

하여 培養한 精子보다 精子의 活力이 우수하였다고 報告하였다. 그리고 소 精子를 여러 가지 caffeine 濃도가 들어 있는 egg yolk sodium citrate에 稀釋하여 37 °C에 6時間 동안 培養한 結果 5.4~18.0 mM caffeine 濃도가 精子活力에 效果的이었다고 報告하였으나, Rees 등(1990)은 사람 精子에 있어서 3 mM 이상의 caffeine을 含有한 培養液은 37 °C에서 2時間 培養 후 精子의 活力은 減少하였으나 有意差는 認定되지 않았다고 報告하였다.

本 實驗에서는 37 °C에서 保存한 精子의 活力은 caffeine 濃도에 따른 有意差가 없었고, caffeine을 添加하지 않은 對照區間에도 差異가 없었다. 그러나 Rees 등(1990)도 有意差는 認定되지 않는 않았으나, caffeine을 添加한 保存液에서 培養한 精子가 活力이 좋았다고 報告하였다.

本 實驗에서 4 °C에서 全 保存期間 동안 비록 有意差는 認定되지 않았으나, 3 mM에서 精子의 活力은 對照區보다 優秀한 경향을 보여 주었다(Fig. 1). 그러나 3 mM 이하의 caffeine 濃도에 稀釋된다면 caffeine이 添加되지 않은 精子의 活力보다 양호할 것으로 여겨진다. Miyamoto 등(1978)은 소 精子를 4 °C에서 7日間 保存한 경우, 소 精子의 生存성에 대한 caffeine의 適定濃도는 5.4~13.5 mM이라고 報告하였다. 그리고 EYC에 稀釋한 소 精子를 4 °C에서 3日間 保存 후 caffeine을 添加하여 7일까지 保存한 結果는 caffeine을 添加한 精子의 活力이 높았고 生存時間도 延長시켰다고 報告하였다. 이때 caffeine 濃도는 10 mM이 가장 좋았다고 하였다.

冷却速度에 대한 Bouchard 등(1990)의 實驗에서는 EYC 液에 稀釋한 精子는 保存 2時間과 72時間에서 急速冷却(- 1 °C / min)한 것이 緩慢冷却(- 0.1 °C / min)한 것 보다 精子의 活力이 優秀하였다고 報告하였으나, Varner 등(1988)은 緩慢冷却(- 0.3 °C / min)한 精子가 急速冷却(- 1.3 °C

/ min)한 精子보다 活力이 優秀하였다고 報告하였다. 本 實驗에서는 1時間에 걸쳐 $-0.5\text{ }^{\circ}\text{C} / \text{min}$ 의 冷却速度로 下降한 것이 急速冷却(稀釋 후 곧 바로 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 의 물에 浸漬)한 것보다 精子의 活力이 우수한 경향을 보였다 (Fig. 2). 그리고 3 mM과 6mM caffeine을 添加한 保存液에 稀釋한 精子活力이 caffeine을 添加하지 않은 對照區보다 우수한 경향을 보였다($P>0.05$).

Caffeine 添加에 대한 實驗은 一般 家畜에서도 널리 實施되었는데, Schoff 등(1987)은 소 精子에서 caffeine은 精子의 活力과 代謝를 促進하였고, 精子의 活力과 代謝를 抑制시키는 fluoride에 處理한 精子의 活力을 回復시켰으나, NH_4Cl , NaHCO_3 및 8-bromo-cAMP와 같이 精子의 活力과 代謝를 촉진시키는 物質들은 caffeine과 같은 效果는 없었다고 報告하였다. 또한 Hammitt 등(1989)은 凍結融解한 돼지 精液을 0, 0.5 및 3時間 후 1~2分 동안 2 mM caffeine에 培養하여 caffeine을 處理하지 않은 精子의 活力과 비교했을 때 caffeine을 處理한 精子에서 活力이 優秀하였다고 報告하였다. Miyamoto 등(1979)의 報告에 의하면, caffeine 添加에 의한 소 精子의 生存性에 대한 改善은 본래 生存성이 높은 精子보다 오히려 낮은 精子의 경우 및 caffeine 添加에 따라서 凍結, 融解한 소 精子의 受精能力이 높아지는 傾向이 있었다고 報告하였다. 또한 和出 등(1977)은 caffeine 添加가 돼지 精子에서 양호한 受胎率이 얻어졌다고 報告하였다. 吉田(1978), Zaneveld 등(1982)은 caffeine 添加에 의하여 精子内の cAMP 濃도가 높아지고, cAMP 依存性的 protein kinase가 關여하여 精子의 活力을 증가시키고, 그 結果 ATP의 濃도가 低下함에 따라 caffeine에 刺戟받아 呼吸, 解糖 등에 의한 ATP를 生産하는 代謝가 활발하게 이루어진다고 하였다.

그러나 Rees 등(1990)은 사람 精子에 대한 實驗에서 caffeine은 ATP의

濃도에 影響을 주지 않았으나 약간의 變化는 있었다고 報告하였다. 그리고 caffeine을 含有하지 않은 精子에서 ADP의 濃度は 培養 30分 후 減少하였으나, 6 mM caffeine을 含有한 精子의 ADP 濃도와 類似하였다. 또한, Zaneveld 등(1982), Schoff 등(1987)은 caffeine은 cAMP의 濃度を 增加시켰으나 無處理의 精子와 비교했을 때 protein phosphorylation에서 현저하게 增加하지는 않았다고 報告하였다.

IV . 摘 要

本實驗은 개 精液에 保存液, caffeine 濃度, 冷却方法, 保存溫度 및 保存期間에 따른 精子의 活力에 미치는 影響을 調査하기 위하여 實施하였다.

精液은 手指法(digital manipulation)에 의하여 Miniature Poodle 種로 부터 週 2回 採取하였다. 精子를 含有한 1·2 分劃의 精液은 egg yolk sodium citrate(EYC) 保存液과 peptone, egg yolk, trisaminomethane, inositol, citric acid를 主成分으로 하는 保存液(PETIC)에 稀釋하여 37 °C 와 4 °C에 6, 12, 24, 48, 72, 96 및 120時間 동안 保存하였고, 이 때 4 °C까지의 冷却速度는 - 0.5 °C / min 下降하여 보존한 것과 稀釋直後 4 °C 로 冷却한 水中에 곧바로 浸漬하여 保存한 후 檢査하여 얻어진 實驗結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 採取한 精液의 一般性狀은 1·2 및 3 分劃의 精液量이 각각 0.4 ± 0.01 ml와 1.3 ± 0.06 ml, 1·2 分劃의 精子濃度는 $1.9 \pm 0.21 \times 10^8$ / ml, pH는 6.3 ± 0.01 , 精子畸形率은 13.3 ± 0.9 %였다.
2. 畸形精子(13.3 %)에 있어서, 精子의 形態的 畸形率은 頭部畸形 9.2 ± 0.7 %, 頸部畸形 20.3 ± 1.3 %, 尾部畸形 70.5 ± 1.6 %로 尾部畸形率이 현저히 높았다.
3. 原精液 및 EYC와 PETIC 保存液에 稀釋하여 緩慢冷却(- 0.5 °C / min)에

- 의하여 4 °C에 保存한 精子的 活力은 두 保存液에 稀釋하여 保存한 精子的 活力이 原精液에 비해 높았다($P < 0.05$).
4. EYC와 PETIC 液에 稀釋하여 緩慢冷却에 의하여 4 °C에 保存한 精子的 活力은 72時間까지 두 保存液간에 差異가 없었으나, 保存 96時間과 120時間에서 EYC에 稀釋한 精子的 生存指數가 PETIC 液보다 精子活力이 良好하였다($P < 0.05$).
 5. PETIC 液의 基本組成液에 3, 6, 9, 12 및 15 mM caffeine을 添加하여 精子를 稀釋하고, 37 °C에서 24時間 이상 保存한 精子는 活力이 거의 소멸되었다. 緩慢冷却에 의하여 4 °C에 保存한 精子的 活力은 24時間까지는 모든 濃度 사이에 類似하였으나($P > 0.05$), 保存 72時間과 120時間에는 3 mM caffeine 添加가 12 mM과 15 mM caffeine을 添加하여 保存한 精子的 活力에 비해 優秀하였다($P < 0.05$).
 6. Caffeine을 添加하지 않은 PETIC 液과 添加한 PETIC 液에 精液을 稀釋하여 4 °C까지 急速冷却(4 °C의 물에 浸漬)한 精子的 活力에 대한 有意差는 없었으나, 3 mM과 6 mM의 caffeine 添加濃度에서는 對照區와 他 添加濃度에 비하여 높은 活力을 보였다($P > 0.05$).

參 考 文 獻

1. Ahmed, N.A., M.H. Salem, H.A. EL-Oksh, and V.G. Pursel. 1984. Effect of incubation conditions, inhibitors and seminal plasma on protein synthesis in ram spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 71 : 213 - 219.
2. Ashizawa, K. and K. Okauchi. 1984. Stimulation of sperm motility and oxygen consumption of fowl spermatozoa by a low molecular weight fraction of seminal plasma. *J. Reprod. Fert.*, 71 : 593 - 598.
3. Ashizawa, K. and G.J. Wishart. 1987. Resolution of the sperm motility-stimulating principle of fowl seminal plasma into Ca^{2+} and an unidentified low molecular weight factor. *J. Reprod. Fert.*, 81 : 495 - 499.
4. Bartlett, D.J. 1962. Studies on dog semen I. Morphological characteristics. *J. Reprod. Fert.*, 3 : 173 - 189.
5. Blesbois, E. and M. de Reviere. 1992. Effect of different fractions of seminal plasma on the fertilizing ability of fowl

- spermatozoa stored *in vitro*. J. Reprod. Fert., 95 : 263 - 268.
6. Bouchard, G.F., J.K. Morris, J.D. Sikes, and R.S. Youngquist. 1990. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoa motility. Theriogenology, 34 : 147 - 157.
 7. England, G.C.W. and W.E. Allen. 1992. Factors affecting the viability of canine spermatozoa II. Effects of seminal plasma and blood. Theriogenology, 37 : 373 - 381.
 8. Foote, R.H. 1964. Extenders for freezing dog semen. Am. J. Vet. Res., 25 : 37 - 40.
 9. Gill, H.P., C.F. Kaufman, R.H. Foote, and R.W. Kirk. 1970. Artificial insemination of Beagle bitches with freshly collected, liquid-stored and frozen-stored semen. Am. J. Vet. Res., 31 : 1807 - 1813.
 10. Hafez, E.S.E. 1980. Reproduction in farm animals. 4th edition. In : Secretion of the male reproductive tract and seminal plasma (ed. White, I.G.), pp. 189 - 202, Lea & Febiger, Philadelphia.

11. Hammitt, D.G. and P.A. Martin. 1989. Correlations among assays of porcine semen quality following cryopreservation. *Theriogenology*, 32 : 369 - 383.
12. Harrop, A.E. 1955. Some observations on canine semen. *Vet. Rec.*, 494 - 498
13. Jasko, D.J. J.A. Hathaway, V.L. Schaltenbrand, W.D. Simper, and E.L. Squires. 1992. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 37 : 1241 - 1252.
14. 康珉秀. 1992. 小動物의 人工授精 技法과 그 展望. *綜合畜産*. 48 - 53.
15. 고태혁, 김한섭, 이상호, 송해범. 1990. Thoroughbred 精液의 液狀保存에 關한 研究. *韓國家畜繁殖學會誌*. 14 : 199 - 204.
16. 河野寬昭, 中尾敏彦, 森好政晴, 河田啓一郎. 1988. 犬の採精頻度と精液性狀について. *獸醫畜産新報*. 804 : 420 - 424.
17. 韓國家畜繁殖研究會編. 1979. 家畜繁殖學實驗 제 4 장 生殖細胞. pp. 129 - 141. 邦轉出版社, 서울.

18. Kreider, J.L., W.C. Tindall, and G.D. Potter. 1985. Inclusion of bovine serum albumin in semen extenders to enhance maintenance of stallion sperm viability. *Theriogenology*, 23 : 399 - 408.
19. 黒田治門, 西川義正, 入谷 明. 1970. 犬精液の凍結保存に関する研究.
1) 精液稀釋劑の組成に関する2・3の検討. 凍結精液研究會報. 31 : 3 - 7.
20. Kuroda, H. and Kazumasa, H. 1973. Studies on the metabolism of dog spermatozoa. II. Effects of buffers and diluents on the aerobic metabolism of dog spermatozoa. *Jap. J. Animal Reprod.*, 19 : 115 - 119.
21. 黒田治門. 1982. 犬精子の保存と授精. *家畜繁殖誌*. 28 : 22 - 26.
22. 黒田治門. 1988. 小動物の人工授精. *獣醫畜産新報*. 806 : 573 - 576.
23. 李用斌. 1988. 家畜人工授精要論. 제 8 장 : 개의 人工授精(김창근). pp. 297 - 312. 先進文化社, 서울.
24. Miyamoto H. and Y. Nishikawa. 1979. Effect of caffeine on motility of bull spermatozoa. *Jap. J. Zootech. Sci.*, 50 : 601 - 607.
25. Olar, T.T., R.A. Bowen, and B.W. Pickett. 1989. Influence of

- Extender, cryopreservation and seminal processing procedures on postthaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. *Theriogenology*, 31 : 451 - 461.
26. 박창식, 한성욱, 소중섭, 김덕임, 정홍기, 류창구. 1992. 5 ml 스트로에 보존한 돼지 液狀精液의 精子濃度에 따른 受精能力에 관한 研究. *韓畜誌*. 34 : 97 - 100.
27. Parks, J.E. and J.K. Graham. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*. 38 : 223 - 237.
28. Province, C.A., E.L. Squires, B.W. Pickett, and R.P. Amann. 1985. Cooling rates, storage temperatures and fertility of extended equine spermatozoa. *Theriogenology*, 23 : 925 - 933.
29. Rees, J.M., W.C.L. Ford, and M.G.R. Hull. 1990. Effects of caffeine and of pentoxifylline on the motility and metabolism of human spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 90 : 147 - 156.
30. Salem, M.H., M.Y. Mekkawy, N.A. Ahmed, I.Y. Abdel-Aziz, A.A. Mohamed, H.A. EL-Oksh, and V.G. Pursel. 1992. Effect of cyclic AMP on fructose utilization, progressive motility and protein synthesis by ram spermatozoa. *Theriogenology*, 37 : 1061 - 1074.

31. Schoff, P.K. and H.A. Lardy. 1987. Effects of fluoride and caffeine on the metabolism and motility of ejaculated bovine spermatozoa. *Bio. Reprod.*, 37 : 1037 - 1046.
32. Seager, S.W.J. and W.S. Fletcher. 1973. Progress on the use of frozen semen in the dog. *Vet. Rec.*, 92 : 6 - 10.
33. Seager, S.W.J., G.C. Platz and W.S. Fletcher. 1975. Conception rates and related data using frozen dog semen. *J. Reprod. Fert.*, 45 : 189 - 192.
34. Sorensen, Jr. A.M. 1979. *Animal reproduction principles and practices*. Chapter 6: Semen production, processing, and storage, pp. 152 - 179, McGraw-Hill Book Company, New York.
35. 武石昌敬. 1988. 犬の繁殖生理について. *獣醫畜産新報*. 806 : 541 - 549.
36. Varner, D.D., T.L. Blanchard, C.L. Love, M.C. Garcia, and R.M. Kenney. 1988. Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology*, 29 : 1043 - 1053.

37. Varner, D.D., T.L. Blanchard, P.J. Meyers and S.A. Meyers. 1989. Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 20 °C. *Theriogenology*, 32 : 515 - 525.
38. Wishart, G.J. 1984. Metabolism of fowl and turkey spermatozoa at low temperatures. *J. Reprod. Fert.*, 70 : 145 - 149.
39. Zaneveld, L.J.D., and R.D. Chatterton. 1982. Biochemistry of mammalian reproduction. pp. 157 - 165. In : *The sperm tail and midpiece*(ed. Peterson, R.N.), John Wiley & sons, New York.



謝 辭

어느덧 2年이라는 歲月이 흘렀습니다. 이 論文은 여러 분들의 指導와 도움으로 完成을 보게 되었습니다.

論文이 完成되기까지 實驗遂行에 不足함이 없도록 아낌없는 配慮를 하여 주시고 不足함이 많은 저를 끝까지 指導하여 주신 康珉秀 教授님께 眞心으로 感謝를 드립니다.

그리고 未治한 本 論文을 위하여 하나하나 가르침을 베풀어 주시고 審査해 주신 金重桂 教授님과 梁榮勳 教授님을 비롯한 畜産學科 여러 教授님께 깊은 感謝를 드립니다.

또 實驗을 遂行하는데 있어 供試動物을 提供하여 주고 實驗遂行에 많은 도움을 준 金瑞中 後輩에게 感謝를 드립니다. 그리고 저와 같은 實驗室에서 공부하면서 바쁜 日課中에서도 實驗을 도와 준 조홍필, 김경천, 현승웅, 오숙희, 김우형 後輩들과 畜産學科 모든 院友들과 學友들에게도 感謝를 드립니다.

끝으로 오늘이 있기까지 걱정과 근심으로 돌보아 주시고 어려운 與件에서도 사랑으로 저를 지켜 보아주신 父母님께 이 기쁨을 드리오며, 全 家族과 더불어 이 작은 기쁨을 나누고자 합니다. 感謝합니다.