

제1차년도
최종보고서

X-, Y-정자로 분리된 돼지 액상 및 동결정액
생산과 보급에 관한 연구

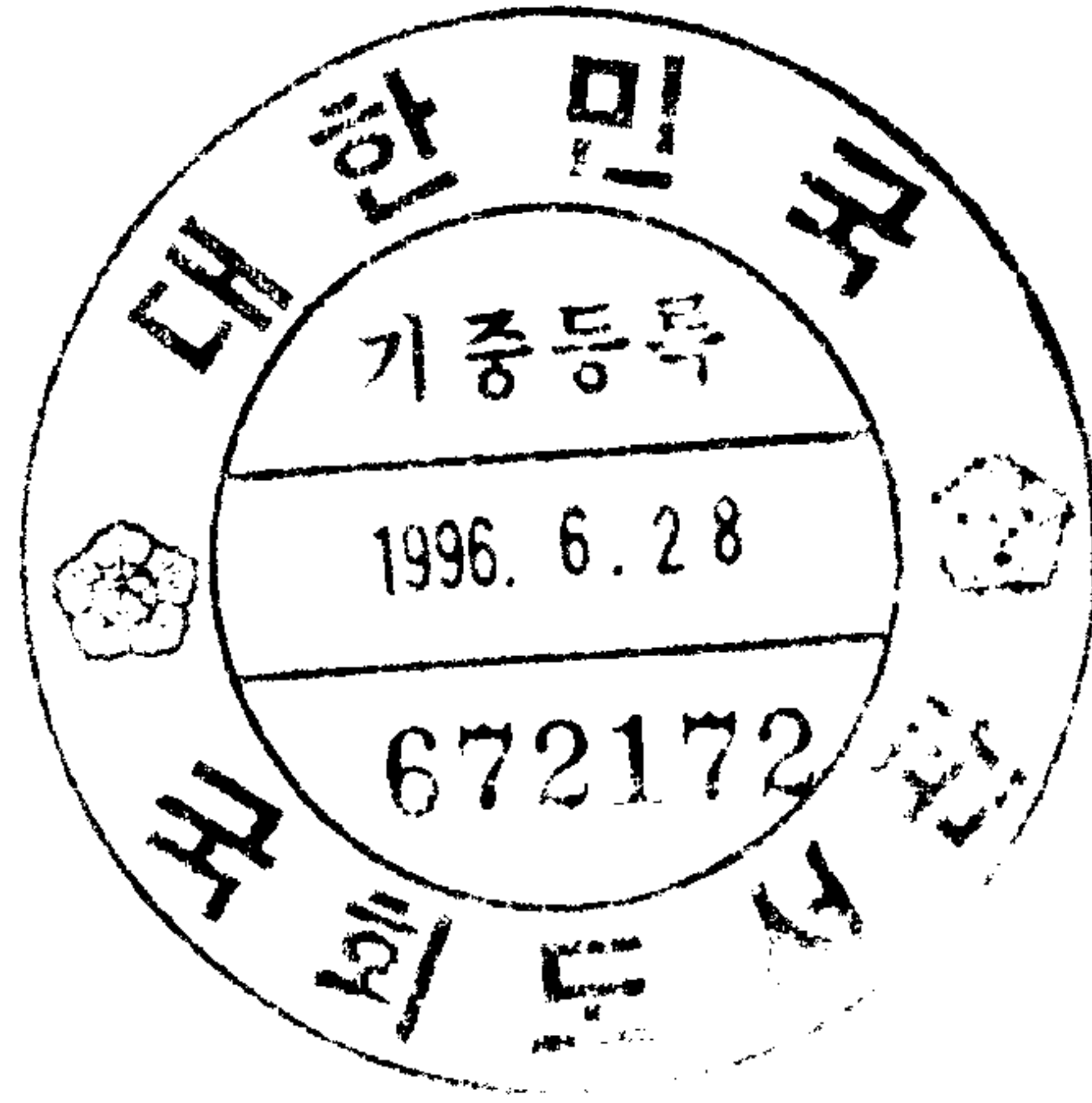
Studies on Production and Supply of Fresh and Frozen
Boar Semen Separated X- and Y-Sperm

I . 액상정액의 보존온도와 기간 및 처리과정에
관한 기술개발 연구

I . Studies on Technological Development of Processing Treatments,
Preservation Period and Temperature on Fresh Boar Semen

충남대학교 농과대학

농 립 수 산 부



제 출 문

농림수산부 장관 귀하

본 보고서를 “X-, Y-정자로 분리된 돼지 액상 및 동결정액 생산과 보급에 관한 연구과제(1차년도 세부과제 “액상정액의 보존온도, 기간 및 희석처리기술 개발에 관한 연구”)의 최종보고서로 제출합니다.

1995. 12.

주관연구기관명 : 충남대학교농과대학

총괄연구책임자 : 박 창 식

연 구 원 : 윤 우 식

연 구 원 : 유 만 봉

연 구 원 : 김 원 흥

연 구 원 : 정 미 영

협동연구기관명 : 축산기술연구소

협동연구책임자 : 김 인 철

협동연구책임자 : 이 장 희

연 구 원 : 이 수 헌

연 구 원 : 김 상 운

연 구 원 : 정 경 용

연 구 원 : 서 상 교

요 약 문

I. 제 목

X-, Y-정자로 분리된 돼지 액상 및 동결정액 생산과 보급에 관한 연구

Studies on Production and Supply of Fresh and Frozen Boar Semen
Separated X- and Y-Sperm

(액상정액의 보존온도와 기간 및 처리과정에 관한 기술개발 연구)

(Studies on Technological Development of Processing Treatments,
Preservation Period and Temperature on Fresh Boar Semen)

II. 연구개발의 목적 및 중요성

1. 목 적

가. 고능력 우량종모돈의 확대 보급 수단으로써 인공수정기술 개발

- 1) 돼지고기 수입개방에 대응한 경쟁력 제고
- 2) 양돈농가의 종모돈 구입예로 해소

나. 다양한 형태의 인공수정용 돼지정액 생산기술 실용화

- 1) 농가 소득증대에 기여
- 2) 돼지개량 촉진

다. 종돈 유통에 따른 질병전파 차단

- 1) 전염병에 의한 양돈산업의 생산성 저하방지
- 2) 종모돈유통 최소화에 의한 질병전파 예방

2. 중요성

가. 돼지 인공수정 보급 확대에 의한 생산비 절감으로 돼지고기 수입자유화에 대응한 경쟁력 향상에 기여

- 1) '95년말 현재 국내 돼지 인공수정율은 8% 수준으로 매우 저조
- 2) 국내 돼지 인공수정 기반조성 시급

나. 능력이 검증된 종돈의 보급확대로 무분별한 외국종돈 수입 자제유도

- 1) '95년 종돈 도입 계획량은 3,000두(MMA 물량)로 매년 증가추세이며 종돈구입에 따른 외화지출로 양돈농가의 돼지 번식비용 부담가중
- 2) 구입 종돈의 규격 다양화로 부분육 유통화를 위한 균일성저하

다. 생산 돼지의 성비조절 등 용도에 따른 정액활용으로 농가소득 증대기여

- 1) 양돈농가의 암돼지 출하 선호(암, 수 두당 평균 경락단가 차이 : 1만5천원)
- 2) X-, Y-정자로 분리된 정액생산 시급

라. 양돈 농가의 종돈 구입난 등 현장애로 타개에 기여

- 1) 수출단지 및 양돈조합 등 공동 정액생산 인공수정 기술지도
- 2) 종돈개량 및 규격화된 돈육생산으로 수출을 위한 상품성 제고

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

가. 액상정액의 보존온도, 기간 및 희석처리방법 개발 (1차년도)

- 1) 수태율 및 산자수 향상을 위한 보존액 및 희석처리방법 개선
- 2) 액상정액의 보존기간을 연장할 수 있는 저온(5℃)보존의 액상정액
생산 보급

나. 동결정액 확대보급을 위한 정자농도 및 포장방법 개발 (2차년도)

- 1) Straw당 활력정자 농도를 30억 수준으로 낮춘 정액 생산
- 2) 동결융해후 정자활력 및 정상두모율이 60-70% 이상의 정액생산
보급 (현재 기술수준은 50% 정도)
- 3) 수태율 및 산자수 향상을 위한 주입방법 및 포장방법 개발

다. X-, Y-정자로 분리된 정액 제조기술 개발 (3차년도)

- 1) 정자 sexing을 80%이상의 액상정액 생산
- 2) H-Y항혈청 및 Percoll밀도균배법에 의한 정자분리 기술개발
- 3) Flow cytometry 및 PCR에 의한 sexing과 검정기술 개발

Ⅳ. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

본 연구는 액상·동결·성감별 정액에 의한 돼지 번식실용화를 통해 우리

나라의 돼지인공수정 보급을 제고, 돼지개량 및 양돈농가 소득 향상에 기여하고자 하는 것으로서 3년 기간의 연구중 1년차 연구결과는 다음과 같다.

- 가. 단체로 구성된 140개 농가에 액상정액 15,390개를 공급하여 6,896두에 수정하였으며, 10개 농가에 동결정액 563개를 공급하여 147두에 수정하였다. 이들에 대한 수태율 및 산자수는 액상정액이 89.4% 및 10.7 두였고 동결정액은 65.3% 및 8.0 두로 조사되었다.
- 나. 희석액종류 및 보존기간에 따른 정자활력은 Androhep희석액이 다른 보존액보다 다소 높은 정자활력을 나타냈으나 유의적인 차이가 인정되지 않았다. 희석액종류에 따른 수태율은 Modena가 92.0%로 BTS 89.4% 및 Androhep 86.1% 보다 높았으며 산자수는 보존액간에 차이가 없었다.
- 다. 희석액 및 보존기간에 따른 정자활력은 3일까지 보존시에는 수태가 가능한 정도의 활력을 나타내었으나 그 이후에는 현저히 감소하였다. 희석액 종류에 따른 보존성은 Androhep의 경우 3일 보존시에도 정자활력이 58.3% 유지하여 다른 처리구보다 다소 높은 보존성을 나타냈다.
- 라. 병당(80ml) 정자농도를 15, 20, 25 및 30억으로 공급하였을때 정자농도에 따른 수태율은 30억의 정자농도일때가 가장 높게 나타났다.
- 마. 품종별 보존기간에 따른 정자활력은 랜드레이스 품종이 다른 품종보다 다소 높았으며 기형율은 햄프서 품종에서 다소 낮게 나타났다.

2. 활용에 대한 건의

가. 돼지 액상정액의 인공수정 기술을 확대보급키 위해 지역 단위별로 연계추진

- 농촌지도소, 도종축장, 지역양돈조합, 양돈작목반 등

나. 전업 양돈장의 자가 인공수정유도와 정액의 공동생산 및 이용으로 지역단위별 양돈 경쟁력 제고 분위기 조성

다. 돼지 인공수정용 정액생산 확대를 위해 축산기술연구소의 핵돈군 최대활용

라. 향후 냉장정액, 동결정액 및 성감별된 정액 등의 농가보급 확대

SUMMARY

This study was conducted to improve swine, to enhance farm's incomes and to identify superiority on reproductive performance through enlarging supply of boar semen for artificial insemination in domestic, as fresh, frozen and X-Y separated semen type.

The results obtained in this study are summarized as follows:

1. Boar semen were supplied 15,390 bottles for fresh type and 563 straws for frozen type to 140 farms composed of organization. Fresh type semen were inseminated to 6,896 heads sows and frozen type semen were inseminated to 147 heads sows twice per one estrus. Conception rate and litter size of each type semen were investigated 89.4%, 10.7 heads(fresh) and 63.3%, 8.0 heads(frozen), respectively.
2. Sperm motility on diluents was better in Androhep than the others ($p > 0.05$), but conception rate was better in Modena(92%) than BTS (89.4%) and Androhep(86.1%). Litter size was statistically insignificant among treatments.
3. Sperm motility on preservation period was degree of being able to supply until 3 days from collection date. After then, sperm motility was reduced rapidly. Sperm motility on diluents was better in Androhep(58.3%) than the others at 3 days from collection date.
4. Conception rate on sperm concentration was higher in 3.5×10^9 sperm than 1.5 , 2.0 and 2.5×10^9 sperm concentration per bottle.

5. Landrace breed had better motility than the other breeds on preservation period and Hampshire was less than the other breeds in sperm abnormality.

CONTENTS

I. Introduction

§1. Status of pig A.I. in Korea	13
§2. A plan of pig A.I. utility in Korea	14
1. Reduction of reproductive cost	15
2. Improvement of pig production	15
3. Application of high technology in pig industry	17
§3. Technological status of pig A.I. in Korea and foreign country	17
1. Technological status in Korea	17
2. Technological status in foreign country	19

II. Materials and methods

§1. Animals and semen collection	23
§2. Inspection of semen characteristic	23
§3. Treatments of diluents	23
§4. Semen supply channel	25
§5. Analysis of reproductive data	26

III. Results and discussion

§1. The results of conception rate and litter size on farms supplied with fresh semen -----	28
§2. Conception rate on preservation temperature of semen -----	29
§3. Sperm motility and conception rate on diluents and preservation periods -----	30
§4. Sperm motility and conception rate on concentration and preservation periods of semen -----	32
§5. Changes of sperm characteristics on breeds and preservation periods -----	33
IV. References -----	35

목 차

제 1 장 서 론

제 1 절 국내 돼지인공수정 현황	13
제 2 절 돼지인공수정의 이용방안	14
1. 생산비 절감수단으로서의 이용	15
2. 종돈개량수단으로서의 이용	15
3. 첨단 유전공학기법의 도입수단으로서의 이용	17
제 3 절 국내.외 기술현황	17
1. 국내기술현황	17
가. 액상 및 동결정액	17
나. X-정자 및 Y-정자분리	18
2. 외국 기술현황	19
가. 돼지 정액 관련 연구	19
나. 정자 sexing	21

제 2 장 재료 및 방법

제 1 절 공시두수 및 정액채취	23
제 2 절 정액의 일반성상검사	23

제 3 절	정액의 희석처리	23
1.	보존액조성	23
2.	정액의 희석 및 보존	24
제 4 절	정액의 공급체계	25
제 5 절	번식자료 분석	25
제 3 장	결과 및 고찰	
제 1 절	액상정액의 공급처별 번식성적	28
제 2 절	정액보존 온도에 따른 수태율	29
제 3 절	희석액 종류 및 보존기간에 따른 정자활력과 번식성적	30
1.	희석액 종류 및 보존기간에 따른 정자활력	30
2.	희석액 종류 및 보존기간에 따른 번식성적	31
제 4 절	정자농도에 따른 보존기간별 정자활력 및 수태율	32
제 5 절	품종별 보존기간에 따른 정액성상 변화	33
제 4 장	참고문헌	35

제 1 장 서 론

제 1 절 국내 돼지 인공수정 현황

'95년 상반기 국내 보유 모돈수는 약 75만두로 이들로부터 생산된 자돈들에 대한 돼지정액의 혈통확인 현황은 매우 낮은 수준이고 국내 인공수정 보급율은 10%수준으로 추정되어 선진 외국의 경우 노르웨이 71%, 네덜란드 57%, 덴마크 40% 및 대만 20%의 보급율 보다는도 매우 저조한 실정이다. '95년 종돈도입 계획량은 총 3,000두(최소시장접근물량)이며 이중 '95년 9월까지 도입된 실적은 1,530두(종돈개량협회)에 달하고 '96년 수입예정두수는 8,000두로 예정되어 종돈개량을 위한 외화낭비와 외국 의존도가 매우 높다.

현재 국내 액상정액 공급업체는 17개업체가 정액등처리업허가 업체로 등록되어 운영되고 있으나 영세성과 지역성을 크게 벗어나지 못하고 있는 실정이며 기존의 보존방법(17℃)에 의한 인공수정시 정액의 장기보존 및 수송에 어려움이 많아 냉장고를 이용한 저온보존 및 동결보존방법의 개선과 정액의 수요와 공급의 불일치에 따른 정액낭비 및 수송에 관련된 제반 문제점에 대한 개선이 시급하다. 동결정액제조기술은 시설 및 장비에 따른 투자비용 부담으로 국내에서는 산업화로 성공한 예가 전무하고 겨우 시험적 연구수준에 머물러 있는 실정이다.

양축농가에서는 출하돼지의 성별에 따른 경락단가 차이가 현저하기 때문에 암돼지의 출하를 선호하고 있으며 액상정액의 자가 인공수정과 종축개량을 위한 우수 종모돈의 확보에 따른 경비부담과 기술미흡으로 우수 돼지정액 수요가 급증하고 있다. 따라서 축산기술연구소에서는 액상정액 이용에 따른 농가부담을 줄이기 위하여 저온 보존(4℃)액상정액 보급과 소규모농가의

집단화에 의한 지역양돈조합단위별 공동 정액생산, 보급기술 이전과 아울러 종돈개량을 위한 고능력 종모돈의 동결정액보급 및 X-, Y-정자분리정액의 공급으로 자돈의 암수분리 생산이 가능하여 비육돈 출하시 경락단가를 제고시켜 양돈농가의 소득증대 및 종돈개량을 동시에 종축시키고자 하는 바 이러한 정액보급 및 생산기술에 대한 기반이 조성되었을 경우에는 인공수정보급에 의하여 농가소득은 물론 종축개량효과가 가속화되어 국제경쟁력이 높아짐으로서 양돈산업이 안정화추세로 지속되고 종모돈의 감축효과에 대한 축산폐기물량도 감소시킬 수 있으며 자연종부에서 비롯될 수 있는 양돈장의 만성질병 발생율을 줄일 수 있다. 또한 암컷 위주의 돈육생산이 가능해짐으로서 국민 기호에 충족되는 양질의 신선돈육 공급체계가 확립되어 수입개방에 효과적으로 대처할 수 있는 방법으로서 양돈산업이 선진국에 대한 수출전략산업으로 발전할 수 있을 것으로 기대된다.

제 2 절 돼지 인공수정의 이용방안

인공수정은 번식효율을 높일뿐만 아니라 종돈개량의 수단이며 더 나아가서는 최근 다양하게 개발되고 있는 첨단 유전공학기술의 현장도입수단으로서도 이용되어질 수가 있다. 첨단 유전공학기술이 국내 양돈산업에 아직까지 적용되지 못한 가장 큰 이유는 인공수정이 널리 보급되지 않았기 때문이며 향후 인공수정기술을 농가에서 어떻게 이용하느냐에 따라 농가단계의 개량도가 매우 크게 차이나고 결국은 생산비 절감에 따른 국제적 우위를 점할 수 있는 경쟁력을 갖출 수 있게 된다. 그러므로 양돈농가에서 인공수정의 적극적인 이용은 번식비용을 더욱 낮출 수 있는 생산비 절감수단과 함께 종돈개량의 수단으로서의 이용 및 첨단 유전공학기술의 현장도입 수단으로서 이용되어야 한다.

1. 생산비 절감수단으로서의 이용

인공수정은 자연종부보다 번식경영비가 절감된다. 이러한 인공수정은 어떤 방법으로 행하느냐에 따라 생산비를 더욱 절감시킬 수 있는 요인이 있다. 흔히 전업규모이하의 농가에서는 종돈개량과 아울러 생산비절감을 위해 구입정액으로 인공수정을 시킬 수 있으나, 이러한 농가들이 다수가 된다면 우수한 종모돈의 확보와 시설투자면에서 정액의 공동생산과 이용을 통해 개별 농가의 부담을 줄일 수가 있다. 이러한 정액의 공동생산 및 이용은 양돈단지, 양돈단체, 양돈작목반 및 연구회를 구축함으로써 가능해 진다. 그 이유는 액상정액의 경우 거리제한에 따른 수송의 문제가 해결되고 정액의 자가정액생산비용이 더욱 절감되기 때문이다. 자가 정액생산, 인공수정이 가능한 대규모 농장에서는 원가절감을 위한 정액보존액의 직접제조라든지 보유종모돈을 최소화 하면서 정액생산을 가능한 최대로 하는 등의 기술부분에서 정액생산비를 더욱 절감시킬 수 있다. 상업적 AI센타에서는 앞서 언급한 기술적부분을 최대로 적용시키면서 보유종모돈의 능력을 특성있게 최고로 높이면서 수요량보다 더 많은 정액생산체계의 종모돈 확보에서 공급되고 남은 정액은 동결정액제조로 전환해야 된다. 그렇지 않고서는 계획생산이 어려우며 공급농가에 대한 신뢰도가 낮아진다. 이와같이 인공수정기술자체에서도 생산비절감의 여지는 매우 많다.

2. 종돈개량을 위한 수단으로서의 이용

인공수정이 앞서 언급한 바와 같이 번식효율을 증대시키고 보유종돈의 능력을 개량시키려면 자가정액생산, 인공수정농가, 종돈장 또는 AI센타에서라도 각 보유 종모돈의 우수한 유전자원이 상호 교류되어야 한다. 이러한

우수 유전자원의 상호교류는 인공수정으로 가능해질 수 있기 때문이다. 지금까지 국내의 종돈개량이 도입유전자원으로만 대부분 이루어져 왔으며 이러한 유전자원의 활용도 자체 농장에서 폐쇄적으로 이용되어져 왔기 때문에 농장단위에서 종돈개량은 많은 비용을 부담하면서도 개량효과는 매우 제한적이었다. 앞으로의 인공수정은 계통조성, 산자검정 및 산육검정이 포함된 당대 능력검정 및 후대검정의 수단으로 이용되어 개량속도를 가속화 시키고 선발의 목표를 다양하게 적용하여 강도 높은 선발이 이루어진 우수한 종모돈을 활용할 수 있게 된다. 국내에서 기업 및 대규모 농장수준에서도 계통조성기간이 오래걸리고 어려웠던 이유는 계획교배수행에 종모돈, 인력 및 시설자본 투자가 과다했기 때문이며 능력검정수준도 도체검정성적 평가가 어려워 당대검정에만 국한되었기 때문에 우수한 종모돈을 평가, 선발이용하기가 어려웠다.

국내 돼지개량속도를 가속화시키기 위해서는 반드시 인공수정이 전제되어야 하며 국가기관, 단체 및 농가가 협력하여 총체적으로 체계적인 육종체계를 마련하고 우수한 유전자원의 활용과 이용에 공동노력한다면, 또한 인공수정에 의해 계획교배가 이루어져 도체성적까지 포함된 당대 및 후대검정까지 가능하게 되어 다양한 특성의 보증종모돈(후대검정으로 자손들의 능력까지도 평가되어 그 종모돈의 능력을 확실히 보증할 수 있는 종모돈)의 이용도 가능하게 된다면 우리나라의 양돈산업도 수입개방에 흔들리지 않는 자생력을 가지게 될 것으로 생각된다. 여기에서 체계적인 육종체계란 민간단체 또는 AI센타 및 국가기간에서 농가에 정액을 공급하고 농가에서는 인공수정으로 생산된 우수한 개체의 일부는 능력검정받게 하고 나머지는 반드시 도체검정을 받을 수 있는 공판장에 출하시키므로서 등급판정소에서는 개체별 도체성적을 자동으로 판정하게 하고 종축개량협회에서는 이의 도체성적 및 번식성적에 대한 기록을 전산화하여 개량자료를 유기적인 체계로 공동 이용하여야 한다.

3. 첨단 유전공학기법의 도입수단으로서의 이용

지금까지 우리나라 양돈산업에 첨단 유전공학기법의 적용이 어려웠던 이유는 국내 돼지인공수정 보급율이 매우 낮기 때문이며 이로 인하여 육종을 위한 새로운 개량체계도 갖추기 어려웠다. 돼지에 있어서 인공수정의 실용화는 축우산업에서 개발되어지는 첨단 유전공학기법을 농가차원에서의 적용도 가능함을 시사해 준다. 최근에 수정란이식기술과 관련된 첨단기법들은 인공수정기술에 접목시키기 위한 노력으로 간주되고 있다. 수정란주입기술도 처음에는 외과적 방법에 의존하였으나 최근에는 인공수정과 같은 방법의 비외과적 방법으로 정착되어가고 있다. 물론 첨단 유전공학기법들의 대부분은 최종 수단인 수정란주입기술에 접목시키려고 노력해 왔기 때문에 장차 수정란주입기술도 인공수정과 접목해야할 과제를 안고 있다. 인공수정으로 수정란주입까지 가능하게 된다면 이에 관련된 수정란이식, 체외수정, 핵이식, sexing 등으로 무한한 복제수정란의 생산과 유전자조작까지도 가능하게 된다. 특히 인공수정기술은 정자생리와 밀접한 관계가 있으므로 이에 관련된 정자의 미세주입, 정자의 sexing 유전자재조합에 의한 정자생산 등이 결국 인공수정기술에 의해 완성하게 된다. 그러므로 인공수정으로의 전환이 시급히 이루어져야할 과제이다.

제 3 절 국내.외 기술현황

1. 국내 기술현황

가. 액상 및 동결정액

액상 및 동결정액의 인공수정에 대한 수태율 및 산자수에 관한 보고는 연구자들마다 차이가 많으나 윤종택 등(1986)이 소혈청 알부민과 당류가 돼지 동결정액정자의 생존성 및 두모형태에 미치는 영향에 관한 연구에서 BSA를 첨가함으로써 정자손상율을 줄일수 있었다고 하였으며 정용균 등(1986)은 혈장단백질이 돼지 동결정자의 생존성, 두모형태 및 수태에 미치는 영향에 관한 연구에서 신선정액 및 동결정액의 수태율이 각각 75% 및 50%였다고 하였고 정홍기 등(1993)은 도입된 돼지 동결정액의 2회 및 3회 수정이 수정능력에 미치는 영향에 관한 연구에서 수태율이 각각 40% 및 54.5%였으며 산자수는 수정회수에 따라 차이가 없었다고 하였다. 또한 김 등(1993)은 '83-'93년 기간동안 국립종축원에서 도입한 동결정액의 인공수정에서 평균수태율이 70%수준이라고 하였으며 김 등(1995)은 국립종축원의 '94년도 사업보고서에서 액상정액의 수태율이 93%수준이고 동결정액의 수태율이 81%정도라고 하였다. 돼지 정자에 관련된 연구로는 이장희(1993)가 돼지난포란의 동결보존과 체외수정에 관한 연구에서 돼지 정소상체미부정자의 보존형태별 체외수정후 난할율은 4℃에서 12시간 보존하였을때가 가장 높았으며 신선정자가 동결정자보다 유의적으로 높은 난할율을 보였으나 체외수정된 수정란의 발생능은 동결정자가 다소 높았다고 하여 정자의 보존온도에 따라 수정율과 수정란의 발생에 차이가 있다고 하였으며 박수봉 등(1992)은 동결융해돼지정자의 수정능에 대한 Glass Wool 여과법과 swim-up법에 의한 정자선별의 효과에 관한 연구에서 Glass Wool여과법이 유의적으로 높은 활력 정자를 얻을수 있다고 하여 활력정자의 분리법을 제시하였다.

나. X-정자 및 Y-정자의 분리

X-, Y-정자의 분리기술은 다양한 방법으로 연구되어 왔으나 국내에

서는 이규영 등(1988)이 소 정자에서 X- 및 Y-정자 분리에 관한 연구로 sephadex gel여과와 Percoll중층원심분리법으로 정자분리를 시도하여 활력 정자를 분리전과 같게 유지하면서도 X-정자의 출현율을 유의하게 높일수 있다고 하였으며 양부근 등(1988)은 H-Y항체에 의한 생쥐 초기배의 성판별에 관한 연구에서 H-Y항혈청과 보체가 첨가된 배양액내에서 수정란을 일정시간 배양시킨 뒤 정상적으로 발생된 수정란을 염색체분석한 결과 자성 수정란이 81.5% 였으며 음성 수정란이 18.5%였다고 하였다. 또한 김상근(1988)은 양에 있어서 protein column 및 H-Y 항체의 처리에 의한 성비조절에 관한 연구에서 양(羊)정자를 protein column에 의해 분리하였을때 나타난 상층액과 하층액을 각각 자궁경관내에 인공수정시킨후 출산한 산자의 자웅의 성비는 각 76.9%와 23.1%, 18.8%와 81.3%였으며, 羊의 체장과 정소를 이용하여 각각 제작한 H-Y 항체와 보체로 8-16 세포 및 상실배를 처리하여 정상적으로 발달한 수정란을 이식하였을때 출산한 자웅의 성비는 79.0%와 21.0%, 82.6%와 17.4%였다고 하였다. 최근에 최화식 등(1994)은 흰쥐 H-Y항혈청을 이용한 생쥐배의 성감별에 관한 연구에서 음성 흰쥐의 비장세포를 H-Y항혈청으로 하여 제조한 혈청은 음성수정란의 발달을 억제한다고 하였으나 돼지에서는 분리정자에 의한 인공수정후 산자를 얻은 성적은 전무한 실정이다.

2. 외국기술현황

가. 돼지 정액관련 연구

외국의 경우 돼지 인공수정에 관한 연구는 1930년경에 시작되어 소에 비해 짧은 역사이지만 오히려 구미지역보다 아세아지역에서 빨리 실용화 되었으며(Niwa, 1979) 소에서만큼은 활발하지 못하며 일본의 경우에서도 인공

수정용 정액의 수요가 증대되고 있으나 세계적으로 동결정액의 경우에는 액상정액에 비해 수태율이 10% 정도 낮으며 산자수도 복당 1-2두 낮기때문에 일부 나라를 제외하고는 상업화 되어있지 않다. 1980년 19개국에서 동결정액의 인공수정에서 조사된 평균 수태율은 53%(30-65%)수준이며 1978년 Polge의 분리채취에 의한 동결정액의 경우에도 75%의 수태율을 보였고 Wilmut와 Polge(1977)의 동결정액 수태율도 Persel과 Johnson(1975)의 75% 수준과 비슷한 결과를 얻었다. 근래에 액상정액에 관한 연구는 Waberski 등(1994)이 독일에서 배란직전과 배란직후에 장기보존된 돼지액상정액으로 수정한 결과 보존시간에 따라 평균 임신율이 40.5-89.5%였다고 보고하였으며 Machaty 등(1993)은 Beltsville TS(BTS)희석액과 Modified Kiev(MK)희석액으로 보존시간별, 정자농도별 수태율에 관한 연구에서 MK희석액이 BTS희석액보다 양호하다고 하였으며 정자농도는 30억수준에서도 수태에 차이가 없었다고 하였다. 특히 돼지수정에서 정자의 농도는 다정자침입과 밀접한 관련이 있기때문에 체외수정시 고려되어야 할 주요 요인으로 강조되어 왔다(Hunter, 1991; Shamsuddin 등,1993; Laurincik 등, 1994). Nagai 등(1984)은 체외수정의 경우에서 4×10^8 /ml의 정자농도에서 높은 정자침입율도 보였으나 다정자침입율이 높다고 보고한 바 있으며, Seizo와 Toyoda(1986)는 농도가 높을수록 정자침입율이 높아지며 다정자침입율도 따라서 높아짐을 보고하였다. 정자농도에 관한 최근의 연구에서는 체외수정시의 정자농도가 낮아지는 경향이 있으며(Yoshida 등, 1990; Wang, 1992) 특히 Ding 등(1992)은 체외수정시 정자농도를 2.5×10^4 /ml로 하였을 때 정상적인 수정이 많았고 낮은 농도로 수정시간을 다소 연장시키는 것이 정상수정에 효과적이라고 하였다. 그러므로 인공수정시의 정자농도는 수태율 및 산자수에 영향이 있으나 종모돈의 활용도를 높이기 위해서는 수태 및 산자에 영향이 없을 정도의 수준으로 정자농도를 낮추는 것에 대한 연구가 더욱 진행되어야 한다.

동결정액에 관한 연구는 Soejima 등(1983)이 돼지동결정액제조시 보존 용기와 정자농도에 따른 생존율에 관한 연구에서 pellet형태 제조시와 스트로우형태 제조시 생존율에 차이가 없음을 밝혔고 Almlid와 Johnson (1988) 및 Hashizume 등(1990)은 정자의 보존 및 배양양에 따라 침체반응율의 차이가 있기때문에 정자의 보존 및 배양시간에 따라 수정율과 배발생에 차이가 있다고 보고한 바 있다. 또한 Kovachev 등(1994)은 돼지 정액을 알루미늄 튜브와 펠렛으로 동결시켰을때 정자활력은 알루미늄 튜브에 포장하여 동결하였을때가 높았다고 하였다.

나. 정자 sexing

정자의 sexing은 성판정기술의 하나로 최근 수정란이식기술의 발달과 함께 다양한 방법이 개발되고 있다. Flow cytometry에 의한 정자분리기술은 Pinkel등(1982)에 의해서 개발되었으며 X- 또는 Y-bearing sperm의 분리기술도 이 시기에 개발되었다. 최근 이들 방법에 의한 정자분리기술로는 Johnson 등(1994)이 소에서 Flow cytometry을 이용하여 X-, Y-chromosome bearing 정자를 분리하였을때 95%의 정확도를 나타낸다고 하였고, Johnson(1988) 및 Morrell 등(1988)은 소에서 Flow cytometry을 이용하여 X-, Y-chromosome bearing 정자를 분리하였을때 분리율이 75% 이상 얻었다. 소수정란에서는 Picard 등(1985)이 수정란 절반을 염색체 분석에 의해 성판정한 후 이식하였을때 60%의 성판정율을 얻었으며 Boomam(1985)은 H-Y 항체에 의한 수정란 sexing시 85%의 정확도를 얻었다. 또한 Distech 등(1984)은 X 및 Y-염색체에 대한 DNA probe를 이용하여 95%의 sexing을 보인 바 있다.

돼지에서는 Flow cytometry을 이용하여 X-, Y-chromosome bearing

정자를 분리하여 외과적으로 수정하였을 때 자웅 성비가 85%:15% 및 78%:22%로 분리되었으며(Johnson 등, 1991), 大谷悟 등(1988)은 돼지의 X-, Y-정자 분리에 대한 F-body 검출시험 및 Percoll 밀도균배원심분리법의 적용에 관한 연구에서 Percoll원심분리법으로 약 60%의 자성비율을 얻었다. 한편 Bennett와 Boyse(1973)는 생쥐에서 H-Y항혈청으로 정자를 분리 수정하였을 때 분만된 산자의 성비는 자성이 65%수준이었다고 하였다.

제 2 장 재료 및 방법

제 1 절 공시두수 및 정액채취

축산기술연구소에서 사육중인 훈련된 종모돈 22두 및 구입종모돈 4두를 정액공급용 종모돈으로 이용하였다. 이들 종모돈은 주당 3회 정액을 채취하였으며, 채취시에는 의빈대에 2-3회 가승가 시킨후 수압법으로 희박정액 및 농후정액을 각각 분리채취하여 35℃보온병에 담아 정액제조실로 운반하였다.

제 2 절 정액의 일반성상 검사

채취된 정액은 희석처리전의 일반성상으로 정액의 농도, 활력, 생존율 및 기형율을 검사하였으며 보존기간에 따라 정자활력 및 생존율을 검사하였다. 정자의 농도는 광전비색계(Spectronic 20, USA)로 측정하였으며 활력은 직진정자를 기준으로 백분율로 평가하였다. 생존율 및 기형율은 Fast Green FCF 염색법으로 생사염색을 통해 생존율과 기형율을 동시에 조사하였다.

제 3 절 정액의 희석처리

1. 보존액 조성

최적의 희석보존액을 규명하기 위해 BTS, Modena 및 Androhep 희석액

을 사용하였으며 이들 희석액의 조성표는 표 1과 같다.

표 1. 돼지 액상정액 희석액의 조성분 (g/per 1,000ml)

Ingredient	BTS	Modena	Androhep
Glucose(monohydrate)	37.00	27.5	26.0
Sodium citrate	6.00	6.9	8.0
Sodium bicarbonate	1.25	1.0	1.2
EDTA (disodium)	1.25	2.35	2.4
KCL	0.75	-	-
Tris	-	5.65	-
Citric acid	-	2.9	-
BSA	-	3.0	2.5
Hepes	-	-	9.5
mOsm	330.0	240.0	309.0
PH	7.2	7.2	6.8

2. 정액의 희석 및 보존

채취된 정액은 총정자수를 조사하여 정액과 희석액 비율을 1:1로 1차 희석한 다음 2-3시간에 걸쳐 17℃까지 냉각시킨후 최종 총정자수가 병당 1.5×10^9 , 2.0×10^9 , 2.5×10^9 및 3×10^9 의 농도가 되도록 조정하였으며 병당 정액량은 80ml가 되도록 2차 희석하였다.

정액의 보존은 상온(17℃) 및 냉장(5℃)온도에서 실시하였으며 보존기간은 1-10일간으로 하였다. 일상적인 분양용 정액은 80ml병당 생존 정자수 30억을 기준으로 하여 BTS희석액으로 제조하였으며 상온보존(17℃)하여 공급하였다. 동결정액의 경우에는 1차희석액으로 LYE(lactose anhydrate 110g,

sodium citrate 6.9g, sodium bicarbonate 1.0g / 1,000ml)보존액을 사용하였으며 2차희석액은 1차희석액에 glycerol 4% 및 O.E.P. 1%을 첨가하여 glycerol 최종농도가 2%가 되게 조정하였다. 정액포장은 5ml straw에 총정자수가 50억이 되도록 하였으며 용해후 생존율 및 정상두모 비율이 60% 이상인 정액만 공급하였다.

제 4 절 정액의 공급체계 및 방법

희석처리 및 정자농도에 따라 제조된 액상정액은 정액검사시 활력이 80%이상인 정액을 총 140개 농장에 15,390명('95.12.22현재)을 Fig 1.의 정액분양 체계에 따라 대상농가에 공급하였다.

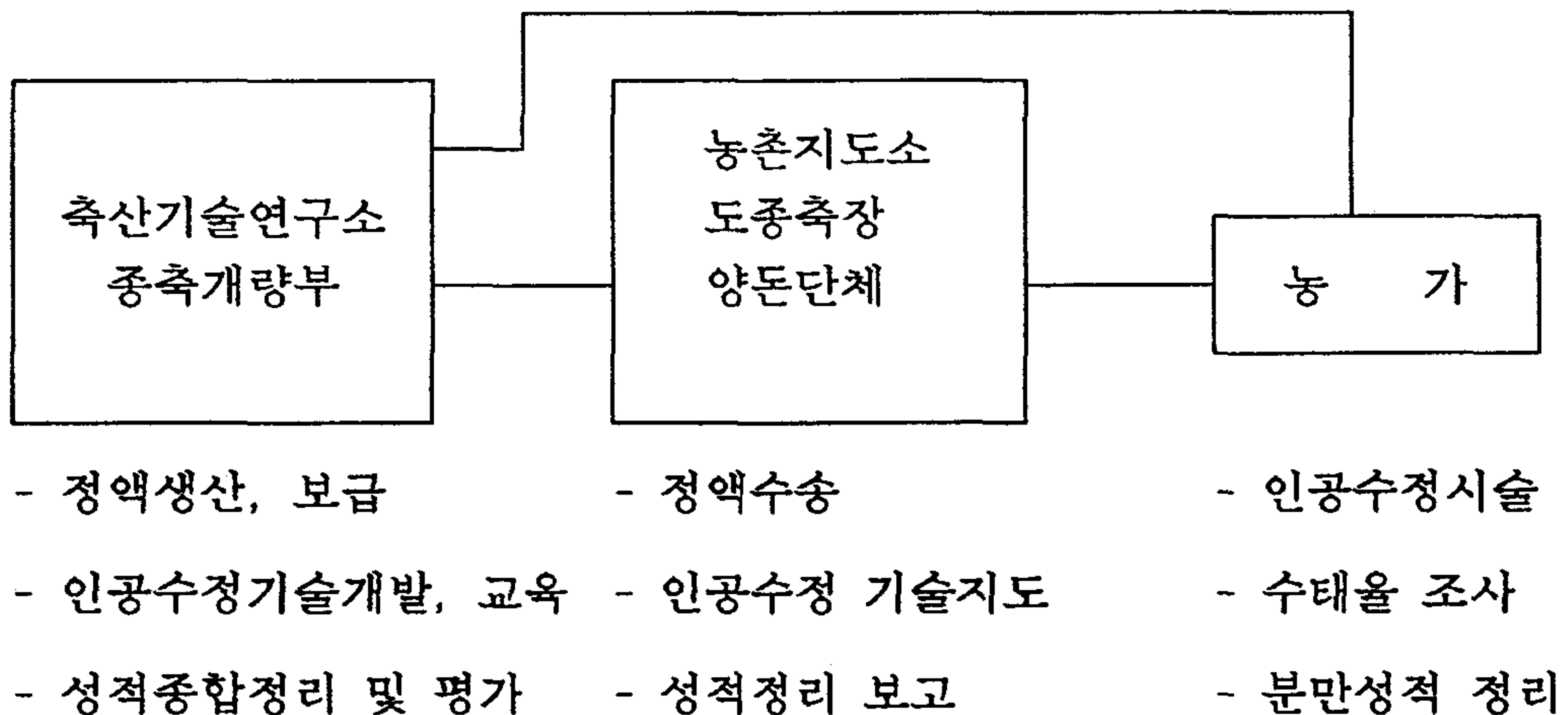


Fig 1. 돼지정액공급 및 자료수집체계 흐름도

시험에 참여한 농가는 인공수정교육을 이수하였거나 인공수정 경험이 있는 농가에 한해서 공급하였다. 단, 인공수정기술이 미흡한 개인 또는 단체

는 인공수정실습교육후 자가 인공수정토록 유도하였으며 정액수송중 일정한 온도를 유지할 수 있도록 정액보관고(온장고)를 갖추게 하였다. 액상정액의 공급방법은 매주 월, 수 및 금요일에 공급하였으며 동결정액 563 straw는 각 도청에서 추천한 10농가에 대하여 동결정액의 특성과 사용방법을 교육하고 보존액과 함께 일괄 보급하였다.

표 2. 정액 공급중간기지 및 대상농가

구 분	중 간 공 급 기 지	농가수
액 상 정 액	농촌 지도소 (5 개소)	47농가
	도 종 축 장 (2 개소)	14
	양 돈 협 회 (2 개소)	18
	양돈영농법인 및 연구회(2 개소)	33
	기 타 농 가	18
소 계		130
동 결 정 액	각 도청 축산과 추천농가	10
합 계	중간공급기지 11개소	140

제 5 절 번식자료 분석

돼지 정액을 분양받은 농가 및 단체는 수정기록, 수태율 및 분만 성적에 관련된 모든 기록을 소속 단체를 통하여 축산기술연구소 종축계량부에

통보하도록 하였으며 보존액종류별, 정자농도별, 요인별로 제조된 정액의 수태율 및 분만성적을 조사, 분석하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절 액상정액의 공급처별 번식성적

1. 액상정액공급 대상농가별 번식성적

표 3. 액상정액공급처별 번식성적

정액종류	중간공급처	대 상 농가수	정 액 공급량	수 정 두 수	평 균 수태율	평 균 산자수
액상정액	농촌지도소(5)	47농가	3,520병	1,566두	91.3%	- 두
	충 북 도 종	13	1,018	485	74.1	11.1
	전 남 도 종	1	120	13	100.0	11.5
	홍 성 협 회	7	2,044	920	94.2	-
	평 택 협 회	11	910	409	75.5	-
	김포양돈조합	24	2,842	1,280	93.9	10.8
	신구전문대	11	1,076	484	86.4	10.5
	당진연구회	9	549	248	87.7	10.4
	기 타	7	3,311	1,491	90.0	10.5
			130	15,390	6,896	89.4%

다양한 방법으로 제조된 돼지액상정액은 중간공급기지인 농민단체(양돈영농조합, 양돈협회 및 양돈연구회), 도종축장 및 농촌지도소를 통하거나

인근지역인 경우에는 대상농가에 직접 공급하였다. 정액을 공급받은 농가는 주중 특정요일에 한해서 발정은 모돈을 대상으로 인공수정을 실시하도록 하였다. 모돈에 대한 인공수정은 1발정당 2회 인공수정을 원칙으로 하였으며 인공수정후 대상모돈과 수정기록을 중간기지를 통하거나 직접 종축개량부에 보고하도록 한 결과 대상농가별 번식성적은 표3과 같다.

표 3에서 나타낸바와 같이 농촌지도소, 도종축장, 대한양돈협회지부, 축협등을 통하여 공급된 정액량은 총 15,390명으로 분양된 정액의 평균수태율은 89.4%였고 평균산자수는 10.7두였다. 이들 대상 농가중에서는 대한양돈협회 홍성지부 및 김포양돈조합 농가들의 평균수태율이 각각 94.2% 및 93.9%로서 다른 농가보다도 높게 나타났다.

이러한 연구 결과는 Waberski 등(1994)이 배란직전과 배란직후에 장기 보존된 돼지 액상정액으로 수정한 결과 보존기간에 따라 임신율이 40.5 - 89.5% 범위였다고 보고한 결과보다 다소 높은 번식율을 보였다.

제 2 절 정액보존 온도에 따른 수태율

1. 정액 보존온도에 따른 수태율

액상정액을 BTS희석액으로 제조하여 상온(17℃) 및 냉장(5℃)보존하면서 인공수정하였고 동결정액은 LYE동결보존액으로 희석하여 영하 196℃에서 보관하다가 BTS보존액으로 용해하여 인공수정하였으며 보존온도별 수태율은 표 4에서 보는바와 같이 각각 89.4%, 74.2% 및 65.3%로 상온정액이 가장 높았으며 평균산자수도 상온보존 정액이 10.7두로 냉장정액의 9.6두, 동결정액의 8.0두보다 월등히 높았다. 전체 수정두수에 대한 평균수태율 및 산자수

는 각각 88.6% 및 10.6두였다.

이러한 결과는 Waberski 등(1994)이 액상 및 동결정액으로 인공수정 하였을때 각각 55.8 - 96.0% 및 54.9 - 88.1%의 수태율보다 본 실험성적이 다소 높은 경향을 보였다. 그러나 Zheng 등(1992)은 돼지사출정자와 동결정자로 체외수정하였을 경우에 자웅전핵형성을(수정율)이 동결정자에서 다소 높았다고 보고한 바 있다.

표 4. 정액의 보존온도에 따른 수태율 및 산자수

정액종류	보존형태	수정두수	수태율	평균산자수
상온	17℃	6,896 두	89.4 %	10.7 두
냉장	5℃	198	74.2	9.6
동결	-196℃	147	65.3	8.0
계	(평균)	7,241	88.6	10.6

제 3 절 희석액 종류 및 보존기간에 따른 정자활력과 번식성적

1. 희석액 종류 및 보존기간에 따른 정자활력과 번식성적

액상정액제조시 이용되는 BTS, Modena 및 Androhep의 희석액으로 제조된 정액을 10일간 보관하였을때 정자활력의 변화는 표 5에 나타낸 바와 같으며 Androhep희석액이 다른 희석액보다 다소 높은 정자활력을 나타냈으나 유의적인 차이는 인정되지 않았다.

보존기간에 따른 정자활력은 대체적으로 3일까지 보관시에는 높은 활력을 유지하였으나 그 이후에는 매우 낮아지는 경향을 보였다. 이러한 결과는 Waberski 등(1994)이 Androhep 및 BTS희석액으로 제조된 정액을 5일까지 보관하였을때의 정자활력과 유사한 성적이었다.

표 5. 희석액 및 보존기간에 따른 돼지액상정액의 정자활력

보존 기간 (Day)	활 력 (% , ±SD)		
	BTS	Modena	Androhep
0*	83.6 ± 6.6	84.5 ± 9.3	86.7 ± 5.2
1	69.5 ± 13.6	69.1 ± 16.4	76.7 ± 5.2
3	45.0 ± 21.9	41.8 ± 20.9	58.3 ± 11.7
5	27.7 ± 16.6	15.5 ± 11.3	41.7 ± 14.7
7	14.5 ± 12.6	4.5 ± 6.9	16.7 ± 12.1
10	7.3 ± 9.4	-	8.3 ± 9.8

* Day 0 : 정액제조직후의 정자 활력

2. 희석액 종류 및 보존기간에 따른 번식성적

희석액 종류별 수태율 및 산자수는 표 6에 나타난바와 같이 Modena희석액에서 수태율 및 산자수가 각각 92.0% 및 11.0두로써 다른 처리구에 비해 높게 나타났다.

이러한 결과는 표 5에서 나타난 보존액별 보존기간에 따른 정자활력과는 상반된 결과로써 대상 농가별 인공수정기술의 경험과 숙련정도에 따른

표 6. 보존액 종류에 따른 수태율 및 산자수

보존액종류	농가수	수정두수	수태율	산자수
B. T. S.	21농가	157두	89.4%	10.9두
MODENA	22	213	92.0	11.0
ANDROHEP	8	72	86.1	10.8

차이로 생각되며 Almlid와 Johnson(1988)은 보존기간이 경과될수록 정상침체율이 낮아진다고 함으로서 정자활력은 보존기간과 밀접한 관계가 있다는 것을 시사해주고 있다. 그러나 인공수정에 대한 수태율은 Soede 등(1995)이 지적한 바와 같이 인공수정시간에 크게 영향을 받기 때문에 많은 시험 두수에 대해서 계속 수태성적을 조사해 볼 필요가 있다고 사료된다.

제 4 절 정자농도에 따른 보존기간별 정자활력 및 수태율

1. 정자농도에 따른 보존기간별 정자활력과 수태율

정자농도에 따른 보존기간별 정자활력은 표 7에 나타난 바와 같이 병당 30×10^8 sperm의 농도에서 다소 높았으며 수태율도 정자농도가 가장 높은 30×10^8 sperm의 농도에서 다소 높았다. 그러나 정자활력은 보존기간이 경과될수록 낮아졌으며 이러한 경향은 정자의 농도가 낮은 농도에서 현저히 나타났다.

이러한 결과는 Hunter(1991)와 Shamsuddin(1993)이 언급한 바와같이

돼지의 체외수정에서 정자의 농도는 다정자침입과 밀접한 관계가 있기 때문에 반드시 높은 농도의 정자수가 수태율이나 산자수에 유리하다고는 할 수 없다고 생각되며 최근 돼지의 체외수정에 있어서도 다정자침입을 줄이기 위해서 수정시 정자농도가 낮아지는 경향에 있다(이장희, 1994; Wang, 1992; Yoshida 등, 1990).

표 7. 정자농도에 따른 보존기간별 정자활력 및 수태율(BTS)

정자농도 (/병)	보 존 기 간(일)			수태율(%)*
	0	1	3	
15x10 ⁸	74.4±7.3	36.7±12.2	18.9± 9.3	90.7
20x10 ⁸	87.3±5.5	75.9±10.1	63.2±11.3	91.8
25x10 ⁸	83.6±6.6	69.5±13.6	45.0±22.0	92.3
30x10 ⁸	86.6±6.3	78.5±11.6	68.1±12.4	93.0

* 정액공급후 3일까지 보관하면서 수정한 평균수태율

제 5 절 품종별 보존기간에 따른 정액성상 변화

1. 품종별 보존기간에 따른 정액성상 변화

랜드레이스, 요크셔, 듀럭 및 햄프셔종에 대한 품종별 보존기간에 따

른 정액성상 변화는 표 8과 같다. 표 7에서 보는바와 같이 보존기간의 경과에 따른 활력은 랜드레이스 품종이 다른 품종보다 높게 나타남으로써 보존성이 다소 좋았다.

표 8. 품종별 보존기간에 따른 정액성상 변화

보존기간 (Day)	L(랜드레이스)			Y(요크셔)			D(듀럭)			H(햄프셔)		
	M	V	A	M	V	A	M	V	A	M	V	A
0	88.3	89.2	6.8	66.6	78.2	6.5	83.3	85.6	6.3	82.5	87.2	4.5
1	73.2	76.3	6.9	65.0	66.3	6.9	71.7	70.3	6.7	67.5	66.3	4.8
2	46.4	50.4	7.2	43.0	45.4	7.2	46.7	45.4	6.9	43.3	44.7	4.8
3	35.2	35.4	7.6	28.3	32.6	7.6	25.0	31.7	7.6	27.5	28.2	5.3
7	20.0	25.8	8.3	16.7	21.5	8.3	10.0	15.6	8.3	10.0	16.6	6.8
10	8.3	21.3	8.5	10.0	20.8	8.5	5.0	11.4	8.9	5.0	16.3	6.9

* M:활력(%), V:생존율(%), A:기형율(%)

이러한 결과는 Althouse와 Hopkins(1995)가 두가지 형광염색법개발에 관한 연구에서 활력이 개체별 차이는 있으나 61.5 - 98.0%의 범위를 나타낸 결과와 유사한 경향의 활력을 나타내었다. 생존율은 요크셔 품종이 다른 품종에 비해 다소 낮게 나타났으며 이러한 결과는 Vazquez 등(1992)이 정액채취후 triple stain법으로 염색하였을때의 85.2%정도의 생존율과 비슷한 수준이었다. 기형율은 품종간에 차이가 인정되지 않았다.

제 4 장 참고 문헌

1. Almlid, T. and L. A. Johnson. 1988. Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa. *J. Animal Sci.*, 66:2899-2905.
2. Althouse, G. C., S. M. Hopkins. 1995. Assessment of boar sperm viability using a combination of two flouorophores. *Theriogenol.*, 43:595-603.
3. Booman, P. 1985. Control of sex ratio by sexing sperm and embryos. *CEC Seminar*, Edinburgh, 19-20 June 1985.
4. Ding, J and G. R. Foxcroft. 1992. Follicular heterogeneity and oocyte maturation in vitro in pigs. *Biol. Reprod.*, 47:648-655.
5. Disteche, C., D. Luthy, D. B. Haslam and D. Hoar. 1984. Prenatal identification of a deleted Y chromosome by cytogenetics and a Y-specific repetitive DNA probe. *Hum. Genet.*, 67:222-224.

6. Hashizume, T., I. Tanimura and S. Kanematsu. 1990. Ultrastructures of the acrosome in frozen-thawed boar spermatozoa by the pellet freezing method. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 36:195-202.
7. Hunter, R. H. F. 1991. Oviduct function in pigs, with particular reference to the pathological condition of polyspermy. *Mol. Reprod. Dev.*, 29:385-391.
8. Johnson, L. A. 1988. Flow cytometric determination of sperm sex ratio in semen purportedly enriched for X- and Y-bearing sperm. *Theriogenol.*, 29:265.
9. Kovachev, K. D., D. I. Zagorski, M. G. Ivanova and N. D. Bobadov. 1994. Cryogenic damage to boar spermatozoa frozen in pellets and tubes. *Theriogenol.*, 42:1369-1379.
10. Laurincik, J., D. Rath and H. Niemann. 1994. Differences in pronucleus formation and first cleavage following in vitro fertilization between pig oocytes matured in vivo and in vitro. *J. Keprod Fert.*, 102:277-284.
11. Morell, J. M., K. D. Keeler, D. E. Noakes, N. M. Mackenzie and D. W. Dresser. 1988. Sexing of sperm by

- flow cytometry. *Vet. Rec.*, 122:322-324.
12. Nagai, T., K. Niwa and A. Iritani. 1984. Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization in vitro of pig follicular oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 70:271-275.
13. Nagai, T., T. Takahashi, H. Masuda, Y. Shioya, M. Kuwayama, M. Fukushima, S. Iwasaki and A. Hanada. 1988. In-vitro fertilization of pig oocytes by frozen boar spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 84:585-591.
14. Niwa, T. 1979. Artificial insemination in swine. *Korean J. Animal Reprod*, 3:26-29.
15. Picard, L., W. A. King and K. J. Betteridge. 1985. Production of sexed calves from frozen-thawed embryos. *Vet. Rec.*, 117:603-608.
16. Pinkel, D., B. L. Gledhill, S. Lake, D. Stephenson, M.A. Van Dilla. 1982. Sex preselection in mammals? Separation of sperm bearing Y and "0" chromosomes in the vole *Microtus oregoni*. *Science* 218:904-06.

17. Polge, C. 1978. Fertilization in the pig and horse. J. Reprod. Fert., 54:461-470.
18. Pursel, S. G. and L. A. Johnson. 1975. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. J. Animal Sci., 40:99.
19. Seizo, H. and Y. Toyoda. 1986. In vitro fertilization of pig eggs with ejaculated spermatozoa preincubated at high sperm concentration. Jpn. J. Anim. Reprod., 32:177-183.
20. Shamsuddin, M., B. Larsson, and H. Rodriguez-Martinez. 1993. Maturation-related change in bovine oocytes under different culture conditions. Anim. Reprod. Sci., 31:49-60.
21. Soede, N. M., C. C. H. Wetzels, W. Zondag, M. A. I. de Koning and B. Kemp. 1995. Effect of time of insemination relative to ovulation as determined by ultrasonography, on fertilization rate and accessory sperm count in sows. J. Reprod. Fert., 104: 99-106.
22. Soejima, A., H. Masuda, Y. Waide and Y. Matsukawa. 1983.

Effect of dilution rate, pellet volume, packed volume in aluminium-pack, straw volume and freezing methods on the survival of boar spermatozoa. *인공수정연지(研誌)* 5(1):6-8.

23. Vazquez, J. M., E. Martinez, J. Roca, P. Coy and S. Ruiz. 1992. Use of triple stain technique for simultaneous assessment of vitality and acrosomal status in boar spermatozoa. *Theriogenol.*, 38:843-852.

24. Waberski, D., K. F. Weitze, C. Lietmann, W. Lubbert zur Lage, F. P. Bprtolozzo, T. Willmen and R. Petzoldt, 1994. The initial fertilizing capacity of longterm-stored liquid boar semen following pre- and postovulatory insemination. *Theriogenol.*, 41:1367-1377.

25. Waberski, D., K. F. Weitze, T. Gleumes, M. Schwarz, T. Willmen and R. Petzoldt. 1994. Effect of time of insemination relative to ovulation on fertility with liquid and frozen boar semen. *Theriogenol.*, 42:831-840.

26. Wang, Z. K., P. H. Wei., J. Z. Wang., C. Lei and M. Q. Kou. 1992. Maturation and fertilization of porcine oocytes in vitro. *Theriogenol.*, 37:733-739.

27. Wilmut, I and C. Polge. 1977. The low temperature preservation of boar spermatozoa. 3. The fertilizing capacity of frozen and thawed boar semen. *Cryobiology* 14:483-491.
28. Yosida, M. Y. Ishizaki and H. Kawagihi. 1990. Blastocyst formation by pig embryos resulting from in vitro fertilization of oocytes matured in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 88:1-8.
29. Zheng. Y. S., P. Fisher and M. A. Sirard. 1992. The use of ejaculated boar semen after freezing in 2 or 6% glycerol for in vitro fertilization of porcine oocytes matured in vitro. *Theriogenol.*, 38:1065-1379.
30. 大谷悟 등. 1988. 돼지의 X-,Y-정자분리에 대한 F-body 검출시험 및 Percoll 밀도균배원심분리법의 적용에 관한 연구. *일본가축번식학지* 34:34-38.
31. 김상근. 1988. 양에 있어서 Protein Column 및 H-Y 항체의 처리에 의한 성비조절에 관한 연구. *한국가축번식학회지* 12(1):42-47.

32. 박수봉 등. 1992. 동결용해 돼지 정자의 수정능에 대한 Glass Wool 여과법과 swim-up법에 의한 정자선별의 효과에 관한 연구. 한국수정란이식학회지 7:133-136
33. 양부근, 장정순, 김정익. 1988. H-Y항체에 의한 생쥐 초기배의 성판별에 관한 연구. 한국가축번식학회지 12:37-41.
34. 이규영, 정길생, 김용배. 1988. X-정자와 Y-정자의 분리에 관한 연구 IV. Sephadex Gel 여과법과 Percoll 중층원심분리법의 병용에 의한 소 정자의 분리. 한국가축번식학회지 12:141-147.
35. 이장희, 김창근, 정영채, 박충생. 1994. 정자처리와 공배양이 체외성숙된 돼지 난포란의 분할에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지 9:269-277.
36. 이장희. 1993. 돼지 난포란의 동결보존과 체외수정에 관한 연구. 중앙대학교 박사학위논문. pp.3-11
37. 정용균 등. 1986. 혈장단백질이 돼지 동결정자의 생존성, 두모형태 및 수태에 미치는 영향에 관한 연구. 한국축산학회지 28:66-72.

38. 정행기, 김태건, 천용민, 박창식. 1993. 도입된 돼지 동결정액의 2회 및 3회 수정이 수정능력에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지 8(2):139-142.
39. 최화식 등. 1994. 흰쥐 H-Y항혈청을 이용한 생쥐배의 성감별에 관한 연구에서 음성 흰쥐의 비장세포를 H-Y 항혈청으로 하여 제조한 음성수정란의 발달에 관한 연구. 한국번식학회지 17:305-310.