

돼지 액상정액을 위한 희석액 및 저온보존에 관한 연구

김명철¹ · 김용준* · 조정곤* · 이수진 · 이재일 · 김인철** · 손동수**

충남대학교 수의과대학

*전북대학교 수의과대학

**농촌진흥청 축산기술연구소

A Study on Extender and Lower Temperature Storage for Fresh-extended Porcine Semen

Myung-cheol Kim¹, Yong-jun Kim*, Jeong-gon Cho*, Soo-jin Lee, Jae-il Lee, In-cheol Kim** and Dong-soo Son**

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

*College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea

**National Livestock Research Institute, Rural Development Administration

Abstract : The aim of this study was to investigate the effect of sperm preservation according to the various kinds of commercially available semen extenders and to investigate the effect of sperm preservation according to the various temperature storages of fresh-extended porcine semen. To investigate the effect of sperm preservation according to the various kinds of commercially available semen extenders, porcine semens diluted in 3 semen extenders, Beltsville Thawing Solution(BTS), Androhep and Kiev, were cooled at 8°C storage temperature with a controlled cooling rate of 2-4°C/h. Motility, progressive motility, normal sperm(%) and sperm morphology were assessed comparatively. In motility and progressive motility, Androhep extenders revealed better result than other extenders. In normal sperm(%) and sperm morphology, 3 semen extenders revealed similar results. To investigate the effect of sperm preservation according to the various temperature storages of fresh-extended porcine semen, porcine semens diluted in BTS extender, were cooled at 3 storage temperatures(8°C, 12°C and 17°C) with a controlled cooling rate of 2-4°C/h. Motility, progressive motility, normal sperm(%) and sperm morphology were assessed comparatively. In motility and progressive motility, 8°C treatment group revealed better result than 12°C and 17°C treatment groups. In normal sperm(%) and sperm morphology, 3 temperatures of treatment groups revealed similar results.

Key words : motility, porcine, sperm, extender, semen

서 론

돼지의 번식에 있어서 인공수정기술의 적용은 세계적으로 크게 증가되고 있다. 돼지의 정액은 인공수정을 위하여 채취 및 분석 과정을 거쳐서 다양한 희석액에 희석된다. 희석된 정액은 15 및 18°C에 냉각된 후에, 인공수정을 위하여 수일 동안 이 온도에 보관된다.

다른 종들에서의 정액보존을 위한 경우와 마찬가지로, 희석정액의 냉각은 정자세포의 대사활동을 억압함에 의하여, 에너지 소비와 부산물 형성을 감소시키며 정자의 수명을 보존하는 것을 돕는다. 그럼에도 불구하고 돼지정자는 냉각에 특히 예민하며, 소나 말과 같은 다른 가축에서 관찰된 것 보다 온도의 저하에 내성이 약하다¹.

돼지에서의 희석정액의 장기간 보존³, 희석액에 따른 수태율 비교⁴, 세균오염이 희석액에 미치는 영향¹, 냉각 영향^{2,6}, 정장의 역할⁸, 수정능력 검정 등에 관한 연구^{9,13}가 이루어졌

으며, 한편 면양에서의 희석액 비교연구⁵, 소에서의 고회력 정자분리¹⁰⁻¹²에 관한 연구도 이루어진 바 있다.

그러나 돼지에서 최근에 많이 사용되고 있는 희석액들의 장기간 보존능력 및 냉각온도에 따른 보존능력의 차이에 관한 논문은 그리 많은 편이 아니다. 이에 저자들은 BTS, Androhep 및 Kiev 희석액을 이용하여 액상 보존할 때 돼지 정액 보존능력을 운동성 및 형태학적 관찰 등을 이용하여 비교하고, BTS 희석액을 돼지정액의 액상보존을 위하여 사용할 경우 냉각온도에 따른 정액의 장기간 보존능력 등을 알아보기 위하여 본 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

희석액

Beltsville Thawing Solution(BTS), Androhep(Minitube of America, 미국) 및 Kiev 희석액을 준비한 후, 사용하였다. Beltsville Thawing Solution(BTS)의 조제는 Johnson LA 등⁴에 준하였으며, Kiev extender¹⁰는 Glucose 60 grams, Sodium citrate(dihydrate) 3.7 grams, Sodium bicarbonate 1.2 grams, EDTA Na₂(dihydrate) 3.7 grams, Penicillin G,

¹Corresponding author.

E-mail : mckim@cnu.ac.kr

본 연구는 2000년도 농림기술개발사업의 첨단기술개발과제의 연구비로 수행된 과제임.

crystalline 200,000 IU, Dihydrostreptomycin 1.0 grams에 distilled water를 가하여 1,000 ml이 되도록 하여 만들었다.

정액의 준비 및 검사

정액은 축산기술연구소에서 사육중인 종모돈 6두로부터 수술용 글러브를 착용하고 수압법으로 채취하였다. 정자운동성, 전진운동성, 정상정자율 및 형태학적 특성은 37°C의 슬라이드가온판을 이용하여, 위상차 현미경으로 100배 및 200배의 배율로 검사하였다.

정액의 냉각 및 보존

희석액들의 장기간 보존능력 비교에 있어서는, BTS, Androhep 및 Kiev 희석액군으로 실험군을 구분하였으며, 준비된 희석액에 34-35°C에서 ml 당 50×10^6 sperm이 되도록 희석한 후, 시간당 2-4°C의 하강속도로 최종 온도가 8°C가 되도록 하강시켜서, 8°C로 조정된 incubator에 보존하면서, 12시간 간격으로 72시간 동안, 정자 운동성, 전진 운동성, 정상정자율 및 형태학적 특성을 검사하였다.

냉각온도의 변화에 따른 액상정액 보존능력을 평가하기 위해 8°C, 12°C 및 17°C 온도군으로 실험군을 구분하였으며, 상기와 같은 방법으로, 최종온도가 8°C, 12°C 및 17°C가 되도록 하강시켜서, 각각의 온도로 조정된 incubator에 보존하면서, 12시간 간격으로 72시간 동안, 정자운동성, 전진운동성, 정상정자율 및 형태학적 특성을 검사하였다.

통계처리

검사 결과치의 평균과 표준편차를 구하였으며, 각 희석액군 간과 각 온도 간에 있어서 유의성 검정은 F 검정으로 실시하였다.

결과 및 고찰

돼지정자는 다른 가축의 정자에 비하여 저온충격에 관한

저항성이 약하므로, 돼지정자를 저온충격으로부터 보호하는데 적합한 희석액을 연구하였다.

희석액들의 장기간 보존능력 비교를 위하여, 돼지 6두로부터 정액을 채취하고, BTS, Androhep 및 Kiev 희석액군으로 실험군을 구분한 후, 준비된 희석액에 34-35°C에서 ml 당 50×10^6 sperm이 되도록 희석한 후, 시간당 2-4°C의 하강속도로 최종온도가 8°C가 되도록 하강시켜서, 8°C로 조정된 incubator에 보존하면서, 12시간 간격으로 72시간 동안, 정자 운동성, 전진운동성, 형태학적 특성을 검사한 결과는 Table 1 및 2와 같다.

정자운동성과 전진운동성은 12시간부터 48시간까지는 Androhep 희석액군이 다른 희석액군에 비하여 양호한 결과를 나타내었으며($p < 0.05$), 60시간 및 72시간에서는 더욱 현저한 차이를 나타내었다($p < 0.01$). 정상정자율은 3개 희석액군 모두 유사한 결과를 나타내었다(Table 1). Kuster와 Althouse³는 돼지정액을 Androhep와 X-CELL 희석액에 2-6일 동안 보존시의 생식력을 비교한 연구에서, 암태지에서의 적절한 생식력을 확보하기 위해서는 Androhep 희석액의 경우는 3일 이내에 인공수정을 위하여 사용해야 된다고 보고하였다. 본 연구에서도 Androhep 희석액은 72시간 경과에서도 운동성을 57.6%를 나타냄으로서, 양호한 보존능력을 나타내었다.

형태학적 특성은 보존시간이 증가함에 따라서 총기형율이 높아지는 현상을 보였으며, 희석액군간에 있어서 유의성은 인정되지 아니 하였다(Table 2).

돼지정자는 조금만 저온충격을 받아도 정자의 생존성과 활력이 크게 저하된다. 이러한 특성을 충분히 고려하여, 돼지정자를 장기간 액상보존하는데 적합한 정액보존온도에 관하여 연구하였다.

액상정액의 사용시 냉각온도에 따른 보존능력의 차이에 관한 비교를 위하여, 돼지 6두로부터 정액을 채취하고, 8°C, 12°C 및 17°C 온도군으로 실험군을 구분한 후, BTS 희석액에 34-35°C에서 ml 당 50×10^6 sperm이 되도록 희석한 후,

Table 1. Porcine sperm characteristics in Androhep, BTS and Kiev semen extenders at 8°C storage temperature for 3 days (n = 5; mean ± SD)

		Duration of preservation (hours)						
		0	12	24	36	48	60	72
Motility (%)	Androhep	84.3± 8.76	80.2± 7.82*	73.3± 5.75*	68.8± 5.48*	65.0± 7.15*	61.0± 4.52**	57.6 ± 3.98**
	BTS	82.8± 7.91	58.6± 6.52	52.4± 4.06	47.3± 4.18	43.2± 5.72	35.1± 3.70	32.9 ± 3.65
	Kiev	83.7± 6.93	52.7± 5.85	51.7± 6.37	42.2± 4.28	36.1± 4.39	32.9± 3.28	30.96± 3.21
Progressive Motility (%)	Androhep	3.9± 0.37	3.8± 0.35*	3.3± 0.27*	3.1± 0.26*	2.9± 0.30*	2.6± 0.24**	2.5 ± 0.22**
	BTS	3.9± 0.35	2.9± 0.31	2.7± 0.23	2.4± 0.22	2.1± 0.27	1.7± 0.20	1.5 ± 0.18
	Kiev	3.7± 0.29	2.6± 0.30	2.3± 0.22	2.0± 0.20	1.5± 0.24	1.2± 0.16	1.0 ± 0.19
Normal sperm (%)	Androhep	84.6± 5.67	82.4± 6.71	81.2± 7.62	79.9± 6.35	77.5± 5.74	76.4± 6.19	74.8 ± 8.31
	BTS	83.2± 5.20	81.9± 6.34	79.2± 6.90	78.9± 7.81	75.3± 5.40	74.2± 6.67	72.1 ± 7.15
	Kiev	85.6± 6.83	80.5± 7.03	78.6± 7.14	76.0± 6.64	75.9± 5.61	73.1± 5.95	71.0 ± 7.36

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

Table 2. Porcine sperm morphology in Androhep, BTS and Kiev semen extenders at 8°C storage temperature for 3 days (n = 5; mean ± SD)

		Duration of preservation (hours)						
		0	12	24	36	48	60	72
Abnormal heads (%)	BTS	4.8±2.90	6.7±4.23	5.9±3.98	9.2±4.77	10.2±7.63	7.2±5.05	9.2±4.28
	Androhep	6.4±3.22	5.9±4.57	6.2±4.39	7.7±4.30	9.1±5.66	9.8±5.58	10.0±5.63
	Kiev	4.6±2.74	8.4±4.38	9.3±5.66	9.3±4.87	9.5±5.68	9.0±6.01	10.7±4.92
Detached heads (%)	BTS	3.5±2.36	2.8±1.89	3.2±3.27	1.8±2.08	1.9±2.51	2.5±1.95	1.7±2.02
	Androhep	2.9±2.38	2.9±2.10	3.0±3.52	2.5±1.86	1.6±2.03	1.8±2.02	1.9±2.28
	Kiev	3.3±2.98	2.6±2.51	2.3±1.87	2.8±2.33	1.5±1.83	2.0±2.31	1.6±1.86
Proximal droplets (%)	BTS	0.4±0.38	0.3±0.35	0.3±0.29	0.2±0.25	0.2±0.32	-	-
	Androhep	0.7±0.85	0.4±0.43	0.4±0.34	0.2±0.21	0.3±0.35	-	-
	Kiev	0.5±0.56	0.4±0.60	0.2±0.28	0.3±0.24	0.2±0.27	-	-
Distal droplets (%)	BTS	0.4±0.50	0.3±0.41	0.2±0.36	0.3±0.52	0.2±0.49	-	-
	Androhep	0.3±0.47	0.2±0.49	0.3±0.49	0.2±0.34	-	-	-
	Kiev	0.2±0.44	0.3±0.38	0.2±0.35	0.2±0.28	0.3±0.50	-	-
Bent/Coiled midpieces and tails (%)	BTS	6.3±2.01	7.5±7.45	9.2±8.29	9.7±8.41	10.0±6.83	13.3±5.97	14.3±9.38
	Androhep	6.5±2.29	8.2±6.90	10.9±8.45	10.5±7.90	13.7±7.46	14.2±6.88	16.0±9.97
	Kiev	5.8±2.33	7.8±7.75	9.4±8.07	11.4±9.92	12.6±8.08	15.9±9.81	16.7±8.09
Total Abnormalities (%)	Androhep	15.4±3.23	17.6±3.65	18.8±3.09	21.2±4.30	22.5±3.02	24.6±3.58	25.2±4.09
	BTS	16.8±3.82	18.2±3.78	20.8±3.45	21.1±3.29	24.7±3.80	25.8±4.27	27.9±3.81
	Kiev	14.4±3.20	19.5±3.92	21.4±4.08	24.0±4.87	24.1±3.44	26.9±2.89	29.0±4.45

Table 3. Sperm characteristics at various temperature storages of fresh-extended porcine semen

(n=5; mean ± SD)

		Duration of preservation (hours)						
		0	12	24	36	48	60	72
Motility (%)	8°C	81.5±7.90	56.3±6.54	52.7±4.90	48.2±4.52	45.2±5.31	34.9±4.39	32.1±3.26
	12°C	82.5±8.53	70.8±7.52	68.7±6.39	65.3±6.01	60.6±6.02	56.9±4.76	54.3±4.72
	17°C	84.3±8.76	80.2±7.82*	73.3±5.75*	68.8±5.48*	65.0±7.15*	61.0±4.52**	57.6±3.98**
Progressive Motility (%)	8°C	3.8±0.32	2.8±0.32	2.6±0.22	2.4±0.24	2.1±0.26	1.8±0.16	1.5±0.19
	12°C	3.9±0.30	3.3±0.37	3.0±0.29	2.7±0.22	2.5±0.26	2.3±0.25	2.0±0.19
	17°C	3.8±0.35	3.5±0.32*	3.3±0.25*	2.9±0.24*	2.7±0.32**	2.6±0.29**	2.4±0.25**
Normal sperm (%)	8°C	83.7±5.31	81.7±6.34	78.5±7.55	77.2±6.18	75.2±5.30	73.8±6.62	72.2±6.28
	12°C	82.3±7.39	80.2±7.63	79.3±6.91	77.0±7.05	76.6±7.02	73.2±5.86	71.7±5.67
	17°C	84.9±8.07	82.0±8.12	80.2±6.84	78.5±6.36	77.0±7.59	74.2±6.77	72.6±5.65

*: p<0.05, **: p<0.01.

시간당 2-4°C의 하강속도로 최종온도가 8°C, 12°C 및 17°C가 되도록 하강시켜서, 각각의 온도로 조정된 incubator에 보존하면서, 12시간 간격으로 72시간 동안, 정자운동성, 전진운동성, 형태학적 특성을 검사한 결과는 Table 3 및 4와 같다.

정자운동성은 12시간부터 48시간까지는 17°C 온도군이 8°C 및 12°C 온도군에 비하여 양호한 결과를 나타내었으며 (p<0.05), 60시간 및 72시간에서는 더욱 현저한 차이를 나타

내었다(p<0.01). 전진운동성은 12시간부터 36시간까지는 17°C 온도군이 8°C 및 12°C 온도군에 비하여 양호한 결과를 나타내었으며(p<0.05), 48시간부터 72시간까지는 더욱 현저한 차이를 나타내었다(p<0.01). 정상정자율은 3개 희석액군 모두 유사한 결과를 나타내었다(Table 3).

형태학적 특성은 보존시간이 증가함에 따라서 총기형율이 높아지는 현상을 보였으며, 보존온도군간에 있어서 유의성은

Table 4. Sperm morphology at various temperature storages of fresh-extended porcine semen (n=5; mean ± SD)

		Duration of preservation (hours)						
		0	12	24	36	48	60	72
Abnormal heads (%)	8°C	4.2±2.23	5.3±4.56	6.5±3.70	8.7±4.51	10.7±6.93	9.9±5.68	9.2±3.88
	12°C	6.8±3.54	6.2±3.96	6.8±4.20	7.9±4.01	10.7±6.04	8.5±4.79	9.2±4.70
	17°C	5.3±3.02	6.8±4.96	8.7±4.24	9.8±5.02	8.9±6.03	8.4±5.52	9.8±5.11
Detached heads (%)	8°C	3.6±2.54	3.0±1.45	3.0±2.10	2.2±2.16	1.5±1.98	2.4±1.67	1.9±1.98
	12°C	2.7±2.61	2.3±1.09	2.6±2.69	2.4±2.01	1.9±2.36	1.6±1.55	1.9±2.59
	17°C	2.9±2.33	2.5±2.18	2.3±1.29	2.0±1.48	1.8±2.28	2.1±2.28	1.7±1.64
Proximal droplets (%)	8°C	0.3±0.41	0.3±0.29	0.2±0.31	0.2±0.40	0.2±0.33	-	-
	12°C	0.5±0.54	0.3±0.38	0.4±0.28	0.2±0.25	0.2±0.27	-	-
	17°C	0.4±0.40	0.3±0.46	0.2±0.23	0.3±0.26	0.2±0.19	-	-
Distal droplets (%)	8°C	0.3±0.45	0.3±0.32	0.3±0.28	0.3±0.51	-	-	-
	12°C	0.4±0.37	0.2±0.30	0.3±0.29	0.2±0.31	-	-	-
	17°C	0.3±0.28	0.3±0.33	0.2±0.27	0.3±0.20	0.3±0.38	-	-
Bent/Coiled midpieces and tails (%)	8°C	7.9±2.37	9.4±6.90	11.5±5.29	10.1±4.38	12.4±5.02	13.9±5.75	16.7±7.76
	12°C	7.3±3.01	10.8±5.02	10.6±5.23	12.3±8.55	10.6±6.22	16.7±8.05	17.2±8.60
	17°C	6.2±2.78	8.1±7.33	8.4±4.62	9.1±5.48	13.6±5.23	15.3±6.76	15.9±6.25
Total abnormalities (%)	8°C	16.3±3.51	19.3±4.01	21.5±4.50	22.8±5.98	24.8±4.79	26.2±5.52	27.8±4.82
	12°C	17.7±4.21	19.8±4.29	20.7±5.11	23.0±5.49	23.4±6.25	26.8±5.98	28.3±4.39
	17°C	15.1±3.78	18.0±4.20	19.8±4.88	21.5±6.03	23.0±4.60	25.8±6.01	27.4±5.66

인정되지 아니하였다(Table 4). Althouse 등²은 Androhep 회석액에 희석된 돼지액상정액의 보존온도를 8°C, 10°C, 12°C, 14°C, 및 17°C로 구분하여 운동성을 관찰한 연구에서 17°C에서 보존시 운동성이 가장 높았었다고 보고한 바 있다. BTS 회석액을 사용하여 돼지액상정액의 보존온도를 8°C, 12°C 및 17°C로 구분하여 운동성 등을 관찰한 본 연구에서도 운동성이 17°C에서 보존시 가장 양호한 결과를 나타냄으로써, Althouse 등²의 연구결과와 유사한 결과를 나타내었다.

결 론

돼지에서 최근에 많이 사용되고 있는 회석액들의 장기간 보존능력을 비교하고, 액상정액의 사용시 냉각온도에 따른 보존능력의 차이를 알아보기 위하여 본 실험을 수행하였다.

돼지정액 액상보존시에 있어서, BTS, Androhep 및 Kiev 회석액의 보존능력을 비교하기 위하여, 시간당 2-4°C의 하강속도로 최종온도가 8°C가 되도록 하강시켜서 보존하면서, 정자운동성, 전진운동성, 정상정자율 및 형태학적 특성을 비교 검사하였던 바, 운동성 및 전진운동성은 Androhep 회석액군이 다른 회석액군에 비하여 양호한 결과를 나타내었으며, 정상정자율 및 형태학적 특성은 3개 회석액군 모두 유사한 결과를 나타내었다.

BTS 회석액을 사용한 돼지정액의 액상보존시에 있어서, 시간당 2-4°C의 하강속도로 최종온도가 8°C, 12°C 및 17°C가

되도록 하강시켜서, 각각의 온도로 보존하면서, 냉각온도에 따른 정액의 장기간 보존능력 등을 12시간 간격으로 72시간 동안, 정자운동성, 전진운동성, 정상정자율 및 형태학적 특성을 비교 검사하였던 바, 정자운동성, 전진운동성은 17°C에서 양호한 결과를 나타내었으며, 정상정자율 및 형태학적 특성은 3개의 온도군 모두 유사한 결과를 나타내었다.

참 고 문 헌

1. Althouse GC, Kuster CE, Clark SG, Weisiger RM. Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. *Theriogenology* 2000; 53: 1167-1176.
2. Althouse GC, Wilson ME, Kuster C, Parsley M. Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen. *Theriogenology* 1998; 50: 535-543.
3. Estienne MJ, Knight JW, Beal WE. Long-term storage of porcine spermatozoa separated using a discontinuous bovine serum albumin gradient. *J Anim Sci* 1989; 67: 1497-1502.
4. Johnson LA, Aalbers JG, Grooten HJG. Artificial insemination of swine: fecundity of boar semen stored in Beltsville TS(BTS), modified Modena(MM), or MR-A and inseminated on one, three and four days after collection. *Zuchthygiene* 1988; 23: 49-55.
5. Kuster CE, Althouse GC. The fecundity of porcine semen stored for 2 to 6 days in Androheps and X-CELL extenders.

- Theriogenology 1999; 52: 365-376.
6. Lopez-Saez A, Ortiz N, Gallego L, Garde JJ. Liquid storage (5 degrees C) of ram semen in different diluents. Arch Androl 2000; 44: 155-164.
 7. Maxwell WMC, Johnson, LA. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. Theriogenology 1997; 48: 209-219.
 8. Parks JE, Lynch DV. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. Cryobiology 1992; 29: 255-266.
 9. Rozeboom KJ, Troedsson MH, Hodson HH, Shurson GC, Crabo BG. The importance of seminal plasma on the fertility of subsequent artificial insemination in swine. J Anim Sci 2000; 78:443-448.
 10. Thompson LH. Managing swine reproduction. In: College of Agriculture/Cooperative Extension Service, Urbana-Champaign: University of Illinois. 2001: 1-10.
 11. Xu X, Pommier S, Arbov T, Hutchings B, Sotto W, Foxcroft GR. In vitro maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. J Anim Sci 1998; 76: 3079-3089.
 12. 김명철, 조충호, 정순오. Albumin density gradient 방법에 의한 고탈력정자 분리시의 정자두부 크기의 비교 관찰. 대한불임학회지 1984; 11: 69-76.
 13. 김명철. 고탈력 우정자의 선택적 분리에 관한 연구. 대한수의학회지 1984; 24: 245-266.
 14. 김명철. 소에 있어서 인공수정시의 임신율, 출생시 성비 및 고탈력정자의 분리에 관한 연구. 한국가축번식학회지 1986; 10: 182-187.
 15. 김용준. Hamster test를 이용한 가축정자의 수정능력 검정 I. 돼지정자의 보존온도 비교 및 돼지와 개정자의 Hamster test 결과. 대한수의학회지 1992; 32: 435-450.