

말 동결융해 정자의 생존성 및 수정능에 영향을 미치는 인자

박용수¹, 박흠대², 장용석³, 조길재^{4,*}

¹경상북도 축산기술연구소, ²대구대학교 식품생명공학부, ³상주 유정목장, ⁴경북대학교 수의과대학

Factors Affecting the Motility and Fertility of Frozen-thawed Stallion Semen

Yong-Soo Park¹, Hum-Dae Park², Yong-Seok Jang³ and Gil-Jae Cho^{4,*}

¹Gyeongsangbuk-do Livestock Research Institute, Yeongju 750-871, Korea

²Division of Life Food and Biotech, Daegu University, Gyeongsan 712-714, Korea

³Youjeong Farm, Sangju 742-706, Korea

⁴College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

ABSTRACT

The techniques for the collection, cooling and freezing of semen and artificial insemination of horses are not fully understood in Korea. We investigated the percentages of total motile (TM) and progressively motile (PM) sperms after the collection, cooling and freezing of stallion semen. The average volume of semen was 167 ml in Thoroughbred and 68 ml in Arab. The average numbers of spermatozoa in Thoroughbred and Arab were $104 \times 10^6/\text{ml}$ and $86 \times 10^6/\text{ml}$ respectively. The average percentages of TM and PM were 82.3% and 88.6% in Thoroughbred, and 61.4% and 82.6% in Arab, respectively. The average percentage of TM at 4 hr after cooling at 5°C was significantly lower than that at 0 hr ($30.0 \pm 4.1\%$ vs. $78.0 \pm 2.5\%$, $p < 0.05$), but the percentage of PM was similar between 66.5 and 73.2% at 0, 1, and 4hr. The average percentage of frozen-thawed Thoroughbred semen frozen in MFR5 extender was 56.2%, which was significantly higher than that of the semen frozen in LE extender (average 32.9%, $p < 0.05$). The percentage of TM in Arab was similar for semen frozen in MFR5 extender and LE extender (18.2% and 21.2%, respectively), but the percentage of PM was significantly higher in sperm frozen in MFR5 extender than in sperm frozen in LE extender (69.0% vs. 36.4% , $p < 0.05$). Four mares were artificially inseminated by Thoroughbred frozen-thawed semen and one of them fertilized at 11 day after artificial insemination. In this study, the collection, cooling and freezing of equine semen were possible under domestic conditions.

(Key words : equine, semen, cooling, freezing, artificial insemination)

서 론

지난 20년간 가축 정자의 채취, 동결 및 수정 기술의 발달로 인해 인공수정과 수정란 이식을 비롯한 생명공학 기술을 번식에 활용하고 있다. 말에서 정자의 이용 기술은 냉장 및 동결체계에 관한 여러 연구를 통하여 최근에는 이용이 확대되고 있으며, 결과 또한 안정적으로 보고되고 있다(Loomis와 Graham, 2008; Backman 등, 2004). 특히 2004년에 미국에서는 번식기의 암말 440,000두 중에서 88%인 387,000두가 인공수정을 이용하여 번식하였다(Loomis와 Graham, 2008). 그러나 국내에서 사육되고 있는 대부분의 말이 경주용(더러브렛종)으로 이들의 번식은 자연종부에 의존하고 있어, 인공번식에 필요한 정액 채취, 정자의 냉장과 동결 및 인공수정에 관한 기본 자료 및 기술의 확립이 미흡한 상태이다. 하지만 최근 레저 산업의

성장과 함께 승용마에 대한 요구가 증가하고 있어, 국외의 우수한 승용마의 도입이 요구되고 있다. 따라서 인공수정과 수정란이식 기술을 활용하면 우수한 승용마를 단기간에 많이 생산할 수 있으므로 말 정자를 이용한 번식 기술에 대한 체계적인 연구가 요구되고 있다.

말 정액의 채취는 인공질, 콘돔 및 화학적인 기법을 통하여 채취한 후 냉장 또는 동결 상태로 이용되고 있다. 냉장정액은 약 5°C에서 24~48시간 동안 사용이 가능하고, 동결 정액은 동결 융해 후 정자의 활력이 낮아지는 경향은 있으나 편리성 때문에 사용이 증가되고 있다(Backman 등, 2004). 정액을 동결하기 위한 희석액 및 동결 체계에 대한 연구는 많이 보고(Cristanelli 등, 1984; Palmar, 1984; Martin 등, 1979)되어 있으며, 정액 동결시 원심분리 기술, 희석액의 조성, 냉각 속도 및 포장 재료가 동결-융해후 정자의 품질에 영향을 미치는 것으로

* Correspondence : E-mail : chogji@knu.ac.kr

알려지고 있다(Amann와 Pickett, 1987). 또한, Ecot 등(2000)은 냉각 속도 및 정액 희석액이 씨수말에 따라서 동결 용해에 많은 영향을 미친다고 하였다. 따라서 씨수말의 정액 동결은 씨수말 선정 후 "test-freezing"이 반드시 필요하다.

따라서 본 연구는 국내 말 사육 조건에서 활용 가능한 정액 채취, 냉장 보존 및 동결 기술을 확보하고, 동결 정액을 이용한 인공수정의 효율성에 대한 기초 자료를 확보하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 희석 및 동결 완충액

정액의 희석액은 EZ mix-in-CST[®] 희석액(EZ; Animal Reproduction Systems, Chino, CA, USA)을 사용하였다. 정자의 동결에는 EZ mix-in "MFR5"[®] 희석액(MFR5; Animal Reproduction Systems, Chino, CA, USA) 또는 EZ mix-in - LE[®] 희석액(LE; Animal Reproduction Systems, Chino, CA, USA)을 실험 목적에 따라 이용하였다.

2. 정액 채취

정액 채취는 한국내륙말생산자협회와 월곡승마장에서 사육 중인 씨수말(더러브렛종과 아랍종) 2두를 대상으로 2008년 6월에서 7월사이에 실시하였다. 더러브렛종 씨수말은 나이 21세로 2003~2006년의 자연 교배 임신율이 70.6%이었고, 2007년부터는 교배가 없었다. 한편, 아랍종 씨수말은 5세로서 이전 교배 성적이 없었다. 씨수말은 충분히 시정한 후 발정기 씨암말에 승가를 허용하였다. 정액은 Missouri식 인공질(Nasco, Fort Atkinson, WI)에 필터가 장착된 채취병을 부착하여 채취하였다. 채취한 정액은 즉시 EZ 희석액으로 상온에서 정액과 1:1 (v:v)로 희석한 후 Equitainer(Hamilton Research, MA, USA)에 옮겨 5℃를 유지하였다.

3. Total motile(TM)과 Progressive Motile(PM) 측정

냉장 또는 동결 정액을 37℃ 수조에서 1분간 담근 후 잘 혼합한 정액 10 ul를 Markler counting chamber에 넣고 200배율(Olympus, Japan)에서 정자수와 활력을 검사하였다. 총 정자수는 chamber의 정자각형 10개 내의 정자수를 3회 측정하여 평균하였다. 이 정자수에 100만($\times 10^6$)을 곱하여 1 ml 중의 정자수를 산출하였다. 정자의 활력은 0~5단계로, 0 = No motion, 1 = Weak undulation or oscillatory motion, 2 = Slow progression, including stop and start motion, 3 = Steady progressive motion at a moderate speed, 4 = Rapid progressive motion, 및 5 = Very rapid and vigorous forward motion, 구분하였다(Herman 등, 1994). Total motile(TM)은 총 정자수에서 1단계 이상의 정자수를, Progressive motile(PM)은 3단계 이상의 정자수를 측정하였다.

4. 정액 동결

1차 희석된 정액은 5℃ 상태로 경상북도축산기술연구소(영주, 경북)로 운반하여 3회 부드럽게 흔들어서 정자와 희석액을 재혼합하였다. 동결과정은 먼저 50 ml 원심분리관에 냉장된 정액 40 ml씩을 넣고 400 g \times 10분간 원심분리하여 seminal plasma 및 부유액을 제거하고, 하층의 정자괴를 회수하였다. 정자수는 최종 농도 40×10^6 /ml로 조정된 후 동결용 LE와 MFR5 희석액으로 희석하였다. 희석된 정액은 5℃에서 90분간 냉각하여 냉장 상태를 유지하면서 정액을 0.5 ml 스트로우(FHK, Japan)에 충전한 다음 액체질소 증기($-165 \pm 5^\circ\text{C}$)에서 10분간 예비 동결한 후 액체 질소에 침지하였다.

5. 인공 수정 및 임신 진단

인공 수정은 발정 징후를 나타내는 씨암말을 12시간 간격으로 난소의 크기를 측정하여 난소가 2.5 cm 이상(Fig. 1)에 도달하였거나 배란이 확인된 개체에 한하여 동결 정액(40×10^6 /ml) 2~3스트로우를 용해하여 4두의 암말 자궁각 중간 부분에 주입하였다. 임신 진단은 초음파(Honda, Japan)를 이용하여 수정 후 11일(Fig. 1)과 45일에 수정 및 임신을 확인하였다.

6. 실험 설계

1) 정액량 및 Total Motile(TM)과 Progressive Motile(PM) 측정
더러브렛 및 아랍종의 씨수말의 정액을 각각 3회 채취하여 정액량, 정자수 및 TM과 PM을 측정하였다.

2) 냉장 보관 시간

더러브렛종의 정액을 채취 직후 5℃로 냉장하여 각각 0시간, 1시간 및 4시간 보관 후 TM 및 PM을 측정하였다. 3회 반복 실시하였다.

3) 품종 및 동결 희석액

더러브렛 및 아랍 종의 정액을 4시간 냉장·운반 후 EZ 또

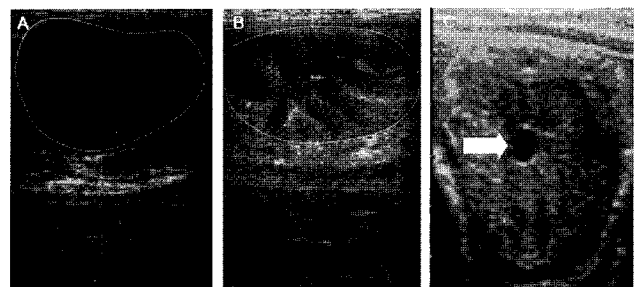


Fig. 1. Pictures of ovary and uterus of estrus, and embryonic vesicle at 11 day after artificial insemination. A : Graafian follicle (White line), B : Uterine horn at estrus (White line), C : Embryonic vesicle (White arrow).

는 MFR5 동결 희석액을 이용하여 동결하였다. TM과 PM은 동결 후 7일째에 동결정액 2개씩을 용해하여 측정하였다.

4) 인공 수정

MFR5 희석액으로 제조된 더러브렛종의 동결 정액을 4두의 더러브렛종 암말에 인공수정을 하였다.

7. 통계 처리

TM 및 PM은 Mean±SE로 나타냈으며, 각각의 평균에 대한 통계학적 분석은 SAS package를 이용하여 분산 분석을 실시하였고, 군간의 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's 다중 검정을 이용하였다.

결 과

1. 정액량 및 Total Motile(TM)과 Progressive Motile(PM) 측정

씨수말 2두에서 채취한 정액량, 정자수 및 TM과 PM은 Table 1과 같다. 더러브렛종의 정액량은 평균 167 ml이었고, 아랍종은 평균 68 ml이었다. 정자수는 더러브렛종이 평균 $104 \times 10^6/ml$ 로서 아랍종에 비하여 많았다. 한편, TM과 PM은 더러브렛종이 평균 82.3% 및 88.6%, 아랍종은 평균 61.4% 및 82.6%이었다.

2. 냉장 보관 시간

씨수말의 정액을 5°C로 냉장 후 보관 시간에 따른 TM 및 PM을 검토한 결과는 Fig. 2와 같다. 냉장 시작(0시간), 1시간 및 4시간째의 TM이 각각 $78.0 \pm 2.5\%$, $61.7 \pm 1.8\%$ 및 $30.0 \pm 4.1\%$ 로서 4시간째의 TM이 0시간의 것에 비하여 유의하게 낮았다 ($p < 0.05$). 한편, PM 비율은 0, 1 및 4시간째에 각각 $70.3 \pm 2.9\%$, $66.5 \pm 4.6\%$ 및 $73.2 \pm 9.0\%$ 로서 유사한 경향이었다.

3. 품종 및 동결 희석액

말의 품종과 동결 희석액이 동결-용해 정자의 TM과 PM에

Table 1. Volume, number of spermatozoa, total motile (TM) and progressively motile (PM) of equine semen

Breed	Total semen (ml)	Number of spermatozoa ($\times 10^6/ml$)	TM* (%)	PM** (%)
Thoroughbred	167±9	104±9	82.3±5.6	88.6±6.8
Arab	68±4	86±3	61.4±9.8	82.6±7.9

* TM: Live spermatozoa / total spermatozoa.

** PM: Progressive spermatozoa / number of TM spermatozoa.

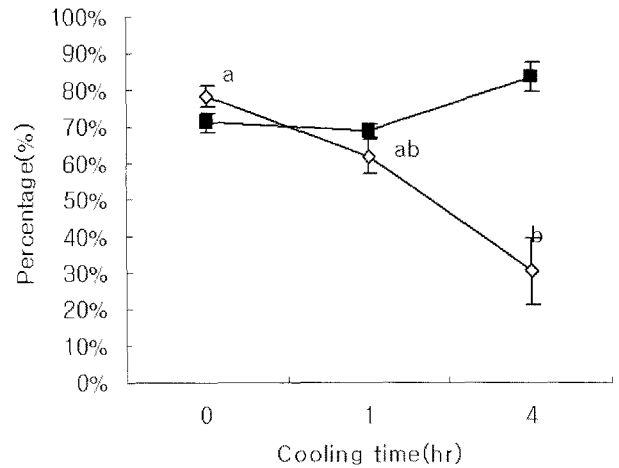


Fig. 2. Effect of storage time after cooling on total motile (◇) and progressively motile (■) in equine spermatozoa. ^{a,b} Values with different letters significantly differ ($p < 0.05$).

미치는 효과를 검토한 결과는 Table 2와 같다. 더러브렛종의 TM은 MFR5 희석액이 LE희석액에 비하여 유의하게 높았으나 ($p < 0.05$), PM은 차이가 없었다. 한편, 아랍종의 TM은 비슷한 경향이었으나, PM은 LE 희석액이 MFR5 희석액의 것에 비하여 유의하게 높았다 ($p < 0.05$). 특히 더러브렛 종의 TM과 PM이 아랍 종의 것에 비하여 유의하게 높은 경향이 있었다 ($p < 0.05$).

4. 인공 수정

더러브렛종의 동결 정액을 이용하여 4두의 더러브렛종 씨 암말을 대상으로 인공수정을 실시한 결과 1두에서 수정 후 11일에 수태된 것으로 확인되었으나, 45일경에 임신 감정에서는 수태를 확인할 수 없었다(Table 3).

Table 2. Effect of breed and extender on the percentage of total motile (TM) and progressively motile (PM) in frozen-thawed equine spermatozoa

Breed	Extender	Frozen-thawing	
		TM* (%)	PM** (%)
Thoroughbred	LE	32.9±3.1 ^{b1}	85.5±0.7 ¹
	MFR5	56.2±4.3 ^{a1}	89.6±1.8 ¹
Arab	LE	18.2±1.2 ²	69.0±7.2 ^{a2}
	MFR5	21.2±2.2 ²	36.4±3.4 ^{b2}

* TM: Live spermatozoa / total spermatozoa.

** PM: Progressive spermatozoa / number of TM spermatozoa.

^{a,b,1,2} Columns with different superscripts significantly differ ($p < 0.05$).

Table 3. Results of artificial insemination to Thoroughbred mares

Horse name	Age	Estrus	No. of straw	Fertility at 11 day	Pregnancy at 45 day
Goowolsan	21	Natural	2	Yes	No
Keuroo	17	Natural	2	No	No
Baekhwacheonsa	9	Natural	3	No	No
Sangwansa	22	Natural	2	No	No

고 찰

말에서 정액 채취는 인공수정과 씨수말로서의 정액 품질을 평가하기 위하여 실시하고 있다. 말 정액의 채취는 인공질, 콘돔 및 화학적 채취법이 이용되고 있으나, 인공질법이 채취한 정액량, 품질 및 동결 용해성을 안정적으로 유지할 수 있어 가장 널리 이용되고 있다. 콘돔법으로 채취한 정액의 품질은 penis의 이물질과 콘돔의 독소로 인하여 인공질의 것에 비하여 낮다(Hafez와 Hafez, 2000). 말에서 상업적으로 이용되는 인공질에는 Missouri(Nasco, WI, USA), C.S.U.(ARS, CA, USA), Lane(Lane, CO, USA) 및 Roanoke(Roanoke Labs, VA, USA) 모델의 4종이 있으며, 이 중에서 Missouri 모델을 본 연구에서 사용하였다. 인공질의 끝부분에는 필터가 포함된 정액 채취병을 부착하였고, 인공질의 내부에는 45~48℃의 온수를 주입하였다. 정액 채취 전 씨수말은 충분히 시정한 다음 발정기 씨암말에 승가를 허용하였다. 발정기 씨암말에 직접 승가를 허용하는 것은 채취자에 많은 위험이 내포되어 있으나, 정액 채취에는 문제가 없었다.

말에서 채취한 정액량은 30~250 ml 정도로 개체 차이가 심하고, 정자의 농도도 30~600 × 10⁶/ml로 다양하며, 인공수정에 이용 가능한 정자의 성상은 정상 형태 60% 이상, PM 60% 이상의 것을 사용하면 좋은 것으로 알려지고 있다(Hafez와 Hafez, 2000). 본 연구에서 얻은 정액량은 68~167 ml이었고, TM은 61.4~82.3%, PM은 80% 이상으로 인공수정이 가능한 수준이었다.

말의 정자를 이용하는데 있어서 미주 및 유럽에서는 냉장(5℃) 상태로 24~48시간 운송하여 이용하고 있다. Crockett 등(2001)은 냉장 보관 2, 6 및 12시간에서 TM이 각각 73%, 65% 및 48%, PM이 60%, 49% 및 35%로서 시간이 경과함에 따라 낮아졌으나, 동결-용해 정자의 TM과 PM 비율은 차이가 없었고, 또한 말 정자를 5℃에서 24시간 동안 보존 후 동결하였을 때 seminal plasma를 미제거한 경우에는 PM 비율이 낮았으나, 제거한 경우에는 차이가 없었다고 보고한 바 있다. 본 연구에서는 seminal plasma를 미제거한 상태로 EZ 희석액에

희석하여 4시간까지 보관하였다. 그 결과, 냉장 보관시간이 길어짐에 따라 TM 비율은 유의하게 낮아지는 경향이었으나, PM 비율은 차이가 없었다(Fig. 2).

말 정자의 동결 보존에 여러 가지 방법이 이용되고 있으나, 말의 품종, 정자의 희석액 및 동결 과정의 차이로 인해서 결과는 다소 불규칙적인 것으로 알려지고 있다(Ecot 등, 2001). 말 정액의 동결에 이용되는 희석제는 egg yolk-containing extender(Crockett 등, 2001), skim milk-egg yolk extender(Backman 등, 2004), skim milk-glucose extender(Backman 등, 2004) 및 egg yolk에 sugar, salt 및 HEPES를 첨가한 희석제(Jasko 등, 1992) 등에 glycerol을 첨가 또는 미첨가하여 사용하고 있지만, 말의 개체 차이로 인하여 어떤 희석제가 적합한지는 씨수말이 선발되는 시점에서 항상 평가가 필요한 것으로 보고되고 있다(Crockett 등, 2001). 한편, 희석액에 첨가하는 egg yolk 또는 skim milk는 동결 용해 후 정자의 운동성에 효과적으로 작용하고 있고, skim milk만 첨가된 희석액에 비하여 egg yolk를 첨가하였을 때 더욱 효과적인 것으로 알려지고 있다(Bedford 등, 1995; Jasko 등, 1992). Crockett 등(2001)은 seminal plasma를 원심분리로 제거한 후 정자를 재희석한 다음 동결하였을 때 PM 비율이 skim milk 단독보다는 egg yolk 첨가로 유의하게 상승되었음을 확인하였다. 본 연구에서는 국내에서 사육중인 씨수말 정액의 동결성을 평가하기 위하여 egg yolk 또는 skim milk를 각각 또는 혼합 첨가된 시판용 희석제 두 가지를 평가하여, 희석액 종류에 따른 TM 또는 PM 비율의 차이가 인정되었다(Table 2). 따라서 본 연구와 이전 보고를 종합하면 말의 정액 동결 시 품종과 희석액의 종류를 동시에 검토하여야 하며, 더 나아가서 개체차에 대한 평가도 동시에 이루어져야 할 것으로 생각된다.

소에서는 수십 년간 인공수정 회사들이 개체 능력뿐만 아니라 정자의 능력에 바탕을 둔 종모우를 선발하였기 때문에 동결정액의 품질이 일관성이 있었다. 그러나 말에서는 이러한 선발 방법이 활용되지 않기 때문에 개체간에 차이가 많다(Loomis와 Graham, 2008). Amann과 Pickett(1987)은 40두의 씨수말에서 336회 정액을 채취하였을 때 38%만이 80% 이상의 생존력을 가지고 있었고, 62%는 65% 미만의 낮은 활력이었다고 보고하였다. 한편, Tischner(1979)은 20% 씨수말만이 동결시 "good freezer" 등급이고, 60%는 "fair/sufficient freezers"이고, 나머지 20%는 동결시 "poor freezers"라고 하였다. Good freezer는 동결용해 활력이 40% 이상, fair freezers는 20~40%, poor freezers는 20% 미만을 말한다. 한편, 스트로우에 주입하는 정자수는 10 × 10⁶~500 × 10⁶/ml로 다양하다. Loomis 등(1983)은 고농도를, Heitland 등(1995)는 저농도의 정자가 동결에 효과적이며 임신도 가능하다고 보고하였다. 또한, Sampedro와 Morris(1998)는 저농도의 정자를 동결할 경우, 영양과 동결보호제의 이용성을 높이므로 용해 직후에 운동성이 좋은

정자의 비율이 증가한다고 하였다. 따라서 본 연구에서는 정자수를 약 $40 \times 10^6/\text{ml}$ 로 조정하여 스트로우에 주입하였다.

말 동결 정액의 임신율에는 씨수말(Samper, 1995)과 암말(Samper 등, 1994)의 상태가 영향을 끼친다. 씨수말의 25%만이 자연종부 및 냉장정액과 비슷한 수준의 임신율을 나타내고(Samper, 1995), 암말의 나이, 사양 관리와 발정 상태에 따라 임신율에 차이가 있었다(Samper 등, 1994; Vidament 등, 1997). 한편, 동결 정액을 이용한 말의 인공수정 후 임신율이 Backman 등(2004)은 16~53%, Loomis(2001)는 51.3~75.6%의 임신율을 보고하였다. 특히 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 의 활력 있는 정자를 자궁 각 심부에 주입한 경우 35%의 임신율을 보고하였으며(Buchanan 등, 2000), Woods 등(2000)은 인공수정의 이상적인 정자 농도가 $25 \times 10^6/\text{ml}$ 라고 하였다. 본 연구에서는 동결 정액 2 또는 3개를 이용하여 용해하여 PM 정자수가 $22 \sim 30 \times 10^6/\text{ml}$ 되게 조절하여 인공수정을 하였다. 암말 4두에 인공수정을 하여 1두에서 수태를 확인하였으나, 45일령에 재검사한 결과 비임신으로 판명되었다(Table 3).

본 연구를 통하여 국내에서도 말 정액의 채취가 가능하였으며, 채취한 정액의 냉장과 동결에 대한 기본 자료를 축적할 수 있었다. 그러나 인공수정의 활성화와 승용마 생산의 효율성을 증가시키기 위해서는 동결 정액 생산 및 이를 활용한 다양한 번식 기술에 대한 추가적인 연구가 진행되어야 할 것이다.

결 론

마필의 인공번식에 필요한 정액 채취, 정자 냉장과 동결 및 인공수정에 관한 기본 자료 및 기술의 확립이 미흡한 상태이다. 본 연구에서는 국내 말 사육 조건에서 채취한 정자의 냉장 및 동결-용해 후 totile motile(TM) 및 progressively motile(PM) 비율과 인공수정의 효율성을 검토하였다. 더러브렛종의 정액량이 평균 167 ml이었고, 아랍종은 평균 68 ml이었다. 정자수는 더러브렛종이 평균 $104 \times 10^6/\text{ml}$ 로서 아랍종에 비하여 많았다. 한편, TM과 PM은 더러브렛종이 82.3% 및 88.6%, 아랍종은 61.4% 및 82.6%이었다. 냉장 시작(0시간), 1시간 및 4시간째의 TM이 각각 $78.0 \pm 2.5\%$, $61.7 \pm 1.8\%$ 및 $30.0 \pm 4.1\%$ 로서 4시간째의 TM이 0시간의 것에 비하여 유의하게 낮았다($p < 0.05$). 한편, PM 비율은 0, 1, 및 4시간째에 각각 $70.3 \pm 2.9\%$, $66.5 \pm 4.6\%$ 및 $73.2 \pm 9.0\%$ 로서 유사한 경향이였다. 더러브렛종의 TM은 MFR5 희석액이 LE 희석액에 비하여 유의하게 높았으나($p < 0.05$), PM은 85.5~89.6%로서 비슷한 경향이였다. 한편, 아랍종의 TM은 18.2~21.2%로서 유사한 경향이였으나, PM은 LE 희석액이 MFR5 희석액의 것에 비하여 유의하게 높았다. 4두의 씨암말에 인공수정을 하여 1두에서 수정 후 11일에 수태된 것으로 확인되었다. 본 연구를 통하여 국내에서 말 정액의 채취가 가능하였으며, 채취한 정액의 냉장과 동결에

대한 기본 자료를 축적할 수 있었다.

참고문헌

- Amann RP and Pickett BW. 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J. Equine Vet. Sci.* 7:145-173.
- Backman T, Bruemmer JE, Graham JK and Squires EL. 2004. Pregnancy rates of mares inseminated with semen cooled for 18 hours and then frozen. *J. Anim. Sci.* 82:690-694.
- Bedford SJ, Graham JK, Amann RP, Squires EL and Pickett BW. 1995. Use of two freezing extenders to cool stallion spermatozoa to 5°C with and without seminal plasma. *Theriogenology* 43:939-953.
- Buchanan BR, Seidel GE, McCue PM, Schenk JL, Herickhoff LA and Squires EL. 2000. Insemination of mares with low numbers of either unsexed or sexed spermatozoa. *Theriogenology* 53:1333-1344.
- Cristanelli MJ, Squires EL, Amann RP and Pickett BW. 1984. Fertility of stallion semen processed, frozen and thawed by a new procedure. *Theriogenology* 22:39-45.
- Crockett EC, Graham JK, Bruemmer JE and Squires EL. 2001. Effect of cooling of equine spermatozoa before freezing on post-thaw motility: preliminary results. *Theriogenology* 55:793-803.
- Ecot P, Vidament M, deMornac A, Perigault K, Clement F and Palmer E. 2000. Freezing of stallion semen: interactions among cooling treatments, semen extenders and stallions. *J. Reprod. Fertil.* 56:141-150.
- Hafez ESE and Hafez B. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th ed, Lippincott Williams & Wilkins, Maryland, pp. 382-385.
- Heitland AV, Jasko DJ, Graham EL, Squires EL, Amann RP and Pickett BW. 1995. Motility and fertility of stallion spermatozoa cooled and frozen in a modified skim milk extender containing egg yolk and liposome. *Biol. Reprod. Monograph series* 1:753-759.
- Herman HA, Mitchell JR and Doak GA. 1994. *The Artificial Insemination and Embryo Transfer of Dairy and Beef Cattle*. 8th ed, Interstate publishers Inc, Illinois, pp. 66-67.
- Jasko DJ, Hathaway JA, Schaltenbrand VL, Simper WD and Squires EL. 1992. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology* 37:1241-1252.
- Loomis PR and Graham JK. 2008. Commercial semen free-

- zing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Anim. Reprod. Sci.* 105:119-128.
- Loomis PR, Amann RP, Squires EL and Pickett BW. 1983. Fertility of unfrozen and frozen stallion spermatozoa extended in EDTA-lactose-egg yolk and packaged in straws. *J. Anim. Sci.* 56:693-987.
- Loomis PR. 2001. The equine frozen semen industry. *Anim. Reprod. Sci.* 68:191-200.
- Martin JC, Klug E and Gunzel AR. 1979. Centrifugation of stallion spermatozoa and its storage in large volume straws. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 27:47-51.
- Palmer E. 1984. Factors affecting stallion semen survival and fertility. *Proce. 10th Cong. Anim. AI* 3:377.
- Samper JC and Morris CA. 1998. Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. *Theriogenology* 49:895-903.
- Samper JC, Hearn PH and Ganheim A. 1994. Pregnancy rates and effect of extender and motility and acrosome status of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Of the 40th Ann. Conv. Amer. Assoc. Equine Pract.* pp. 41-43.
- Samper JC. 1995. Stallion semen cryopreservation: Male factors affecting pregnancy rates. *Proc. Soc. Study Theriogenology* 160-165.
- Tischer M. 1979. Evaluation of deep-frozen semen in stallions. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 27:53-59.
- Vidament M, Dupere AM, Julienne P, Evain A, Noue P and Palmer E. 1997. Equine frozen semen freezability and fertility results. *Theriogenology* 48:907-917.
- Woods J, Rigby S, Brinsko S, Stephens R, Varner D and Blanchard T. 2000. Effect of intrauterine treatment with prostaglandin E₂ prior to insemination of mares in the uterine horn or body. *Theriogenology* 53:1827-1836.

(접수일: 2008. 9. 2 / 채택일: 2008. 9. 17)