

## 제주흑우 정액 동결을 위한 AndroMed와 Triladyl 희석제의 동결성 비교

조상래<sup>1,\*</sup> · 조인철<sup>1</sup> · 한상현<sup>3</sup> · 강태영<sup>1</sup> · 조원모<sup>1</sup> · 채현석<sup>1</sup> · 김남영<sup>1</sup> · 박용상<sup>1</sup> ·  
강용준<sup>1</sup> · 김영훈<sup>2</sup> · 고응규<sup>1</sup> · 김현중<sup>1</sup> · 고문석<sup>1</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립축산과학원, <sup>2</sup>제주특별자치도 축산진흥원, <sup>3</sup>제주대학교 교육과학연구소

## Comparison of AndroMed and Triladyl Extender for Freezing of Jeju Native Black Bull Semen

Sang-Rae Cho<sup>1,\*</sup>, In-Chel Cho<sup>1</sup>, Sang-Hyun Han<sup>3</sup>, Tae-Young Kang<sup>1</sup>, Won-Mo Cho<sup>1</sup>,  
Hyun-Seok Chae<sup>1</sup>, Nam-Young Kim<sup>1</sup>, Yong-Sang Park<sup>1</sup>, Yong-Jun Kang<sup>1</sup>,  
Young-Hoon Kim<sup>2</sup>, Yeoung-Gyu Ko<sup>1</sup>, Hyun-Jong Kim<sup>1</sup> and Moon-Suck Ko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Institute of Animal Science, RDA, Jeju 690-150, Korea

<sup>2</sup>Jeju Special Self-governing Provincial Livestock Promotion, Jeju 690-150, Korea

<sup>3</sup>Educational Science Reserch Institute, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

### ABSTRACT

This study was carried out to investigate synthetic extender for semen cryopreservation of Jeju Native Black Bull. The semen was collected using an artificial vagina and transported to the laboratory. The semen was diluted 1:1 by Tris-Egg yolk extender and centrifuged in 1,500 rpm for 15 minutes. The supernatant was removed. The pellet was diluted to final sperm concentration of  $2 \times 10^8$ /ml by doubling in every 30 minutes at 4°C cold chamber. The semen was equilibrated for 4 hours at cold chamber and packed to 0.5 ml straw. The semen straws were located above 5 cm for 10 minutes. The height and duration affect the freezing speed by temperature. The frozen straw was plunged to LN<sub>2</sub>. The presented straws were examined the viability and motility after thawed at 37°C water bath. Frozen-thawed sperm were evaluated sperm viability, membrane integrity and acrosome integrity. Post-thawed sperm viability has been significantly higher ( $p < 0.05$ ) in fresh sperm (93.27±1.62%) than frozen-thawed sperm (73.34±3.27%). However, there were no significant differences between fresh and frozen-thawed dead cell rate (7.35±2.63 vs, 13.71±2.85). In sperm motility, between Triladyl and AndroMed Extender, there was no significant different (72.86±2.83 vs, 81.47±2.48), similarly, the dead cell rates was similar (18.41±3.42% and 17.26±4.25). The results of our study suggest that AndroMed to the freezing extender showed more positive effect on the frozen-thawed spermatozoa in Jeju Native Black bull semen.

(Key words : Jeju Native Black Bull, Triladyl, AndroMed, Freezing)

### 서 론

제주흑우는 한우의 품종 중 멸실 위험에 직면한 희소 한우로 분류되어 있다. 최근에는 천연기념물 제546호로 지정되어 국가의 보호를 받게 되었으며, 주로 제주에서만 사육되고 있다. 사육규모는 순수 제주흑우를 포함한 사육 두수는 약 1,300두 정도가 사육되고 있다. 그 중 종모축으로 사용되는 개체 수는 약 7두 정도에 불과하다. 현재 제주흑우의 산업적인 활용성을 증대시키기 위하여 인공수정과 수정란이식 방법으로 개체 수 증식을 위해서 연구를 진행하고 있으나, 활발한 산업적 이용은 미미한 실정

이다. 이런 희소 한우를 보존하고 이용하는 방안으로서는 정액을 이용한 번식과 그리고 수정란을 이용한 방법을 사용한다. 일반적으로 인공수정은 우수한 유전적 특징을 지닌 소, 돼지, 양 등과 같은 다양한 개체의 증식을 위해서 중요한 수단으로 이용되고 있다(Sukhato *et al*, 2001). 채취한 정액의 동결보존은 -196°C 액체질소에 침지하여 주로 보존하게 된다. 이러한 방법은 반영구적으로 보관이 가능하나(Bolten 등, 2005), 액상 정액 상태로 인공수정에 이용할 수 있는 기간은 축종과 품종에 따라 다양하며, 길어도 1주일 정도는 가능하다는 보고가 있다(소, Verberckmoes 등, 2005; 돼지, Johnsn 등, 2000; 염소, Peterson 등, 2006; 양, Salamon과 Maxwell, 2000). 한편, 돼지에서

\* Corresponding author : Phone: +82-10-9328-6684, E-mail: chosr@korea.kr

는 액상 정액이 동결 정액에 비해 높은 수태율을 기대할 수 있고, 정액 생산이 용이해 국내에서는 약 50여 군데의 민간 인공수정센터에서 액상 정액으로 주변 농가에 공급해 농가에서 활용되고 있는 실정인 반면, 한우에서는 국가 단위로 검정을 통해 우수한 개체를 선발하여 농협에서 동결 정액을 생산 공급하는 방식으로 인공수정으로 활용되고 있다. 또한 수컷의 공유에 따른 자연번식 방법은 질병 전파를 일으킬 수 있기 때문에, 이를 억제하고 차단하기 위하여 인공수정 방법을 통한 번식을 유도하고 있으며, 지역 민간 인공수정센터를 활성화시켜 액상 정액 상태로 이용하고 있다(Paulenz 등, 2005). 미국이나 호주 등에서는 우수한 유산양을 선발하여 이들로부터 채취한 정액을 동결보존 후 판매와 인공수정에 활용하고 있어, 다양한 축종에서 광범위한 방법으로 인공수정에 동결정액을 활용하고 있다.

현재 정액 동결보존 방법 중 액상으로 보존하는 방법으로는 탈지유, Laiciphos®, BTS, Biociphos Plus® 희석액들이 보고되고 있으며(Paulenz 등, 2005), 정장에 포함된 egg yolk coagulating enzyme (EYCE)은 구요도선에서 분비되는 정장 물질의 하나로 phospholipase인데, 이 효소가 난황의 레시틴을 분해하여 독성 물질을 만들어 반드시 정장을 제거하는 것이 필요하다는 보고가 있으며(Lebo와 Bradley, 1999), 정장 물질이 정액의 활력을 떨어뜨려 정액을 사출할 때 BSA가 첨가된 다량의 희석액에 바로 받아 정장 물질을 희석하고, 정자막을 코팅하는 것이 정자의 활력 유지에 도움이 된다는 보고도 있다(Yamashiro 등, 2006). 따라서 본 연구에서는 정장을 제거하고 난황이 첨가되지 않은 Triladyl® 희석액과 Soybean lecithin이 함유된 AndroMed®를 사용하여 제주흑우 정액의 동결성 연구를 비교하였다.

## 재료 및 방법

### 흑우 정액 채취

정액 채취로 사용된 흑우는 7~10살된 수컷 5두를 선별하여 별도 공간에서 자유 급식하여 사육하였으며, 월 8회 정액을 채취하였다. 정액 채취는 인공질(Model 6600-D, Nasco, FHK, 일본)을 사용하여 채정하였다. 정액 채취를 위해서 암컷을 시험장내 안전정액 채취 보정틀에 고정시킨 후, 흑우 수컷을 2~3회 암컷을 주위를 맴돌게 하여 흥분을 유도하였다. 승가가 이루어지면 수컷의 penis를 인공질에 삽입하여 정액 채취를 하였다. 인공질의 유지온도는 38°C를 유지하였으며, 인공질에는 penis의 삽입을 유도하기 위하여 젤을 도포하였다. 사출된 정액은 인공질 끝부분에 15 ml 튜브를 채취 전에 위치시켜 정액을 회수하였다. 회수된 정액은 37°C 온장고에 넣어 신속하게 실험실로 이동하였다.

### 정액의 처리 및 제조

정액의 품질은 현미경으로 운동성과 정자 형태에 의해 평가하였다. 정자들이 소용돌이 치며 움직이고, 꼬리나 두

Table 1. Composition of Tris-Egg yolk extender

Component	Concentration
Tris	121.1 mM
Fructose	180.2 mM
Citric acid	294.1 mM
Egg yolk	10%
Glycerol	7%
Gentamycin	10 mg/ml

부에 이상이 없음을 확인하여 개체별 활력을 90% 이상일 때 실험에 공시하였다. 본 연구에 사용된 정액 1차 희석제 조성은 Table 1과 같다.

희석액 AndroMed®, Triladyl®은 Minitub(독일)에서 구입하여 사용하였으며, 희석액은 사용 설명서에 따라 제조하였으며, 단, Triladyl® 희석액은 설명서와 달리 난황을 첨가하지 않았다. 간단히 설명하면 Triladyl®과 AndroMed® 희석액은 액상 상태로 구입하여 2차 증류수 30 ml에 Triladyl® 10 ml를 부어 섞은 후 사용하였다. 원정액을 희석제와 1:1로 희석하여 1,500 rpm 15분간 원심분리 후 상층액을 제거하고, Andromed와 Triladyl 1 ml로 희석한 후, 4°C 콜드챔버에서 30분 간격으로 두 배로 희석하여 최종 정자농도  $2 \times 10^8$ 개/ml 농도로 희석한 후 4시간 동안 평형하였다. 평형 후 0.5 ml 스트로우에 밀봉하고 액체 질소 상단 5 cm 10분 동안 유지한 후 액체질소에 직접 침지하여 동결 보존을 실시하였다.

### 정액의 용해

정자의 생존율과 활력 검사를 위해서 정액의 용해는 액체질소 탱크로부터 스트로우를 꺼내어 공기 중에 약 10초간 용해한 후 37°C 온수에서 약 20초간 스트로우를 침지하여 용해하였다. 정액의 활력과 생존성의 평가는 IX 70 현미경(Olympus, Japan)하에서 정자의 활력을 평가하였으며, 정자의 생존율확인을 위해서 용해 정액을 MARKER CHAMBER에 넣은 후 MicroLux 현미경( $\times 70$ )하에서 정자를 평가하였다.

### 정자의 운동성 평가

37°C 가온 판에서 5분간 가온 후, 광학현미경상에서 정자 운동성을 평가하였다. 혈구계산판에 5  $\mu$ l의 정액을 놓고 커버글라스를 덮은 후, 100배율에서 정자의 운동성을 평가하고, 200배율에서 삼투압 충격이나 저온 충격으로 발생할 수 있는 정자 꼬리 꺾임 등의 기형 변화가 발생되었는지 확인하였다. 정자의 정상 평가를 위해서 CASA 시스템과 혈구 계산판을 사용하였으며, 혈구계산판을 이용한 평가는 격자 2군데를 반복적으로 관찰하여 생존 정자 비율을 퍼센트로 나타내었다. 관찰되는 거의 모든 정자들이 소용돌이 치며 활발하게 움직이는 것을 90% 이상으로, 생존 정자들이 격자별로 100개 가량을 관찰하여 활발하게 움직이는 정자들이 80% 이상일 때 80%, 70% 이상일 때 70% 등으로 보고, 50% 이하는 움직이는 정도

가 전진 운동 혹은 느리게 전진 운동하는 수준이며, 20% 이하는 느리게 전진 운동하거나 진자 운동 혹은 미동하는 수준으로 평가하였다.

**침체막 변화 측정**

침체막의 변화 양상을 측정하기 위하여 chlortetracyclin(CTC) 염색법을 사용하였으며, 이 방법으로 정자의 침체막 변화 양상을 조사하였다. 정액을 400  $\mu$ g에서 2분간 원심 분리하여 세척한 다음 500  $\mu$ l의 CTC 용액(750  $\mu$ M CTC, 130 mM NaCl, 5 mM cysteine, 20 mM Tris buffer; pH 7.8)을 혼합하여 20초간 암실에서 배양하였다. CTC 반응을 고정시키기 위하여 10  $\mu$ l의 12.5% glutaraldehyde를 혼합하여 4 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 염색 후 24시간 이내에 형광현미경 하에 관독하였다(IX 71, Olympus, Japan) 정자 침체막 양상의 관독기준은 Fraser (1995)의 분류를 따라 정자 두부가 전체적으로 형광 발광을 할 경우, 수정능 획득이 일어나지 않은 것으로, 적도면 부분에 띠가 형성되어 침체 아랫부분에서 형광발광을 할 경우, 수정능 획득이 일어난 것으로 각각 구분하였으며, 마지막으로 정자 두부가 형광 발광을 하지 않거나, 얼룩덜룩한 발광을 할 경우 침체반응이 일어난 것으로 구분하였다.

**통계분석**

실험결과의 통계학적 분석은 SAS package(version 6.12) 이용과 GLM producer를 사용하여 각 처리구간 유의성을 검증 하였다.

**결과 및 고찰**

Fig. 1은 제주흑우 정자의 수정능 획득과 침체반응의 비율을 조사하기 위해서 서로 다른 4개체에서 동결된 정액을 용해하였을 때 일어난 정자의 정상 변화를 조사한 결과이다. 정자는 사출 직후부터 침체반응이 일어나기 시작하며, 동결과정 동안 정자 침체의 손상으로 인해 정자가 난자의 투명대와 결합하지 못하여 수정 능력이 소실될 수 있다(Yanagimachi, 1994). 정자의 동결 용해 후 정상 평가에 있어 운동성, 생존율 및 정자막 상태의 온전성 뿐만 아니라, 수정능획득 또는 침체반응 역시 매우 중요하다. 정자의 수정능획득과 침체반응은 난자의 수정율과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고하였다(Kommissrud, 2002). 또한 Oh 등(2010)은 돼지 정자에서도 CTC 염색법을 이용한 정자의 수정능획득 및 침체 반응의 평가는 번식 성적이 불량한 개체를 예측하는데 매우 유용하다고 하였으며, 수정능획득이 완료된 정자는 투명대에 의해 침체반응이 일어나지만(Yanagimachi, 1994), 투명대와 결합 전 침체반응이 일어난 정자는 투명대와의 결합에 필요한 요소를 손실하게 되므로 정상적인 수정에 참여할 수 없다(Adeoya-Oshiguwa *et al.*, 2004). 본 연구에서 1번부터 4번까지 개체의 정자에서 일어난 수정능 획득과 침체반응의 비율은 36.8%, 26.8%, 37.8% 그리고 38%의 결과를 나타내었다. 2번 개체 정자에서 수정능 획득과 침체반응의

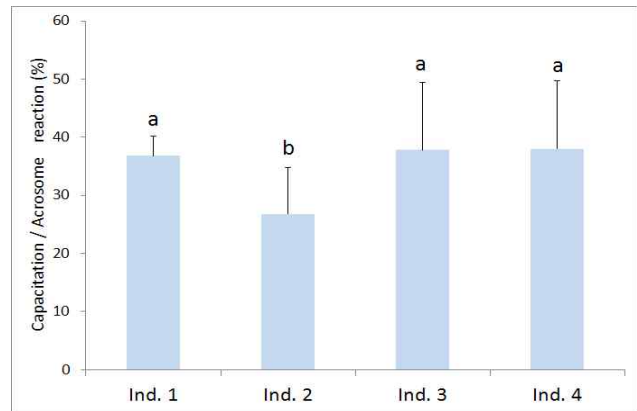


Fig. 1. Analysis of capacitation and acrosome reaction of frozen-thawed spermatozoa in four different individual.

비율이 유의적으로( $p<0.05$ ) 낮은 결과를 보였다. 이와 비슷하게 한우에 있어서 침체반응의 비율은 개체간의 차이가 있으나, 침체막의 손상비율은 대체적으로 약 21.37~28.38 수준으로 나타난 결과를 보고하였다(Park *et al.*, 2012). 이러한 결과를 볼 때 본 연구와 유사한 결과로서 정액의 일반적인 정상 평가에서 품종 간의 특이성은 존재하지 않은 것으로 사료된다. 그러나 수태율의 직접적인 원인이 되는 수정능 획득 반응과 침체의 손상의 반응이 높을수록 수태율 저하의 직접적인 원인이 되기 때문에 정자의 손상을 줄이는 다양한 연구가 수행되어야 할 것이다.

Table 2에서는 신선정액과 동결정액의 정자의 생존율을 평가한 결과이다. 본 실험에서는 제주흑우로 부터의 정액 채취는 5회 반복하여 실시하였다. 정액을 채취한 후, 실험실로 운반한 다음, 정액의 평가를 실시한 결과로서 신선정액의 생존율과 활력은 90% 이상의 수준으로서, 정액이 우수한 것으로 평가되었다. 제주흑우 정액을 동결하기 전 정자의 생존율은 약 93.27 $\pm$ 1.62% 동결·용해 후 생존율은 73.34 $\pm$ 3.27%로 나타나, 동결 전 정액의 생존율이 유의적으로( $p<0.05$ ) 높은 결과를 나타내었으나, 사멸 정자의 비율은 약 7.35 $\pm$ 2.63%와 13.71 $\pm$ 2.85%의 결과를 나타내었다. 사멸 정자의 비율에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 적정 희석제의 선정과 동결을 위한 냉각 및 용해 조건의 적절한 과정이 정자의 손상을 줄여 생존 효율을 향상시킨 결과로 보인다.

Table 2. Analysis of viability and dead rate on before and after cryopreservation of Jeju Native Black Bull semen

Semen source	Evaluation to semen (%)	
	Viability	Dead
Fresh	93.27 $\pm$ 1.62a	7.35 $\pm$ 2.63
Frozen	73.34 $\pm$ 3.27b	13.71 $\pm$ 2.85

<sup>a,b</sup> Percentage with different superscripts within columns indicate significant different( $p<0.05$ ). Replicates 5.

**Table 3. A comparison of motility and dead cell between two different extender sources for freezing of Jeju Native Black Bull**

Extender	Post-thawed(%)	
	Motility	Dead
Triladyl	72.86±2.83	18.41±3.42
AndroMed	81.47±2.48	17.26±4.25

Replicates 7.

Table 3에서는 서로 다른 정액 동결보호제를 사용하여 제주흑우 정액을 동결 보존 후 운동성 평가를 위해 CASA 분석 시스템을 이용하여 성장 평가를 실시한 결과이다. 일반적으로 소의 정액 동결 보존을 위해서 사용하는 동결 보존액으로는 Triladyl<sup>®</sup>과 AndorMed<sup>®</sup>를 상업적으로 판매되는 합성 동결 보존액을 개발하여 소 정액의 동결보존을 위해 사용하고 있다. 최근에는 양(Kasimanickam 등, 2006; Perez-Garnelo 등, 2005), 가젤(Garde 등, 2003), 유럽들소(Perez-Garnelo 등, 2006), 사슴(Esteso 등, 2003) 등 다른 축종이나 멸종 동물의 정액 동결 보존 등과 같은 다양한 목적에 맞게 활발히 연구가 진행되어 오고 있다. 상업적으로 판매되는 제품의 특성상 조성 성분은 명확하게 알려져 있지 않으나, 동해 방지제는 두 가지 종류를 사용하고 있다. 우선 비침투성 동해 방지제로서는 주로 lactose가 들어 있으며, 침투성 동해 방지제로 glycerol이 첨가되어 있고, pH buffer로 Tris와 citric acid와 tylosin, spectinomycin, gentamycin, lincomycin의 네 가지 항생제가 포함된 것으로 알려져 있다(Garde 등, 2003). 그리고 De Pauw 등(2003)은 소의 정액을 Triladyl<sup>®</sup> 희석액에 20% 난황과 6.7%의 글리세롤을 첨가하여 6일간 상온과 4°C에서 보존하였을 때 정자 운동성이 그대로 유지된 반면, Heps-TALP에서는 급격하게 운동성이 저하되었다는 결과를 보고하기도 하였다. 이러한 원인은 축종 간의 변이 때문으로 추정된다. 본 연구에서는 Triladyl<sup>®</sup> 동해 방지제를 사용하였을 때 정자의 운동성은 72.86±2.83%, AndorMed<sup>®</sup>를 사용하였을 때 운동성은 81.47±2.48%로 AndorMed<sup>®</sup> 동해방지제를 사용하였을 때 운동성이 다소 높은 경향을 보였으나, 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 마찬가지로 정자의 사멸율에서도 Triladyl<sup>®</sup> 동해 방지제는 18.41±3.42%, AndorMed<sup>®</sup> 동해방지제는 17.26±4.25%의 결과를 보여 AndorMed를 사용한 동해방지제가 정자의 생존율을 향상시키는 것으로 나타났다. 일반적으로 소의 정액을 채취할 때 Triladyl<sup>®</sup>에 20% 난황과 6.7%의 글리세롤이 첨가된 튜브로 채취한 후, 바로 원심 분리하여 보관하여도 세포막과 침체막에 코팅 효과가 발생하여 정자의 보존성이 월등히 향상된다고 하였다(De Pauw 등, 2003). 현재 BTS와 Modena 등은 돼지 액상 정액의 보존에 가장 많이 사용되는 희석액으로 glucose, sodium citrate, sodium bicarbonate, EDTA, potassium chloride로 구성되어 있다. 이 희석액은 단순한 구성물질로 이루어져 있으나, 돼지 정액을 보존하는데 우수한 희석액으로 알려져 있으므로, 한우보다 제주 흑우의 정액이 저온 충격에 본 실험의 결과, 다소 약한 것으로 파악되어 돼지 정액 동결 보호제와 유사한 조성을 가진 희석제를 개발하여 사용이

가능할 것으로 사료된다. Paulenz 등(2005)은 정액을 우유에 난황을 첨가한 희석액, sodium citrate에 난황을 첨가한 희석액, Tris, fructose, citric acid에 난황을 첨가한 희석액에 양의 정자의 활력을 관찰한 결과, Tris를 근거로 한 희석액에서 다른 희석액들보다 좋은 것으로 보고하였고, Hollinshead 등(2003)은 유세포 분리기를 이용하여 암수 정자를 분리한 후 6일간 5°C로 액상 보존했을 때 고온 열처리된 우유가 Tris에 난황을 첨가한 희석액이나, Androhep나 TEST buffer에 난황을 첨가한 희석액보다 정자 보존 활력이 좋았다고 보고하였다. 우유나 난황에는 인지질들을 함유되어 있는데, 이 물질은 저온 충격에 정자 세포막을 보호하는 역할을 한다고 알려져 있다. 정장에는 난황을 응결시키는 효소가 있어 정액의 동결 보존을 위해서는 반드시 정장을 제거하여야 염소의 경우는 난황이 응결되어 정자 생존성의 저하를 막을 수 있다고 알려져 있고(Roca 등, 1997), 양의 경우에는 정액을 액상 보존한 연구들에서는 정장을 제거하지 않고 사용하고 있으며, 흑우에 있어서도 Andromed를 이용하여 정액 동결보존을 실시한 결과, 생존율은 기존의 80% 내외보다 낮아지나, 운동성은 차이를 보이지 않아, 봉입 정자수를 높인다면 생물체제를 사용하지 않고 장기간 유전자원으로 보존이 가능함을 확인하였다.

## 요 약

본 연구는 제주흑우의 정액의 동결과 보존기술 개발을 위해 AndroMed와 Triladyl를 사용하여 보다 우수한 희석제와 우수 종모우 선정을 위해 실시되었다. 종모우 1번부터 4번까지 개체 정자의 성장비교에서 수정능 획득과 침체반응의 비율은 36.8%, 26.8%, 37.8% 그리고 38%의 결과를 나타내었다. 2번 개체 정자에서 수정능 획득과 침체반응의 비율이 유의적으로( $p<0.05$ ) 낮은 결과를 보였다. 제주흑우 정액을 동결하기 전 정자의 생존율은 약 93.27±1.62, 동결·융해 후 생존율은 73.34±3.27%로 나타나 동결 전 정액의 생존율이 유의적으로( $p<0.05$ ) 높은 결과를 나타내었으나, 사멸 정자의 비율은 약 7.35±2.63%와 13.71±2.85%의 결과를 나타내었다. 그리고 Triladyl<sup>®</sup> 동해 방지제를 사용하였을 때, 정자의 운동성은 72.86±2.83%, AndorMed<sup>®</sup>를 사용하였을 때 운동성은 81.47±2.48%로 AndorMed<sup>®</sup> 동해방지제를 사용하였을 때 운동성이 다소 높은 경향을 보였으나, 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 마찬가지로 정자의 사멸율에서도 Triladyl<sup>®</sup> 동해 방지제는 18.41±3.42%, AndorMed<sup>®</sup> 동해방지제는 17.26±4.25%의 결과를 보여 AndroMed를 사용한 동해방지제가 정자의 생존율을 향상시키는 것으로 나타났다. 결론적으로 제주흑우 정액의 동결 보존을 위해 보다 향상된 동결보호제 선정과 동결보존 기술 개발이 필요할 것으로 사료된다.

## 인용문헌

1. Adeoya-Osiguwa SA, Fraser LR (2004): Environmen-

- tal estrogens and sperm function. *Hum Reprod* 19: 216-217.
2. Bolten M, Weissbach L, Kaden R (2005): Cryopreserved human sperm deposits: Usability after decades of storage. *Urologe A* 44:904-908.
  3. De Pauw IMC, Van Soom A, Maes D, Verberckmoes S, de Kruif A (2003): Effect of sperm coating on the survival and penetrating ability of *in vitro* stored bovine spermatozoa. *Theriogenology* 59:1109-1122.
  4. Estes MC, Fernandez-Santos MR, Soler AJ, Garde JJ (2003): Head dimensions of cryopreserved red deer spermatozoa are affected by thawing procedure. *Cryo Letters* 24:261-268.
  5. Fraser LR, Abeydeera LR, Niwa K (1995):  $Ca^{2+}$ -regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Mol Reprod Dev* 40: 233-241.
  6. Garde JJ, Soler AJ, Cassinello J, Crespo C, Malo AF, Espeso G, Gomendio M, Roldan ERS (2003): Sperm cryopreservation in three species of endangered gazelles (*Gazella cuvieri*, *G. dama mhorr* and *G. dorcas neglecta*): *Biol Reprod* 69:602-611.
  7. Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC (2000): Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci* 62: 143-172.
  8. Kasimanickam R, Kasimanickam V, Pelzer KD, Dascanio JJ (2006): Effect of breed and sperm concentration on the changes in structural, functional and motility parameters of ram-lamb spermatozoa during storage at 4°C. *Anim Reprod Sci* doi:10.1016/j.anireprosci.2006.09.001.
  9. Kommisrud E, Paulenz H, Sehested E, Greule IS (2002): Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for 5 days. *Acta Veterinaria Scandinavia* 43: 49-55.
  10. Leibo SP, Bradley L (1999): Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. In: Gagnon. C. (Ed.), *The Male Gamete: Basic Science to Clinical Applications*, Cache Raven Press Vienna, pp. 501-516.
  11. Oh SA, Park YJ, You YA, Mohamed EA, Pang MG (2010): Capacitation status of stored boar spermatozoa is related litter size of sows. *Anim Reprod Sci* 121:131-138.
  12. Park SR, Hong MW, Kim H, Lee SK, Lee YS, Kim JW, Lee HK, Jeong DK, Kim JB, Song YH, Lee SJ (2012): Analysis on artificial insemination failure and characteristics of frozen semen used for reproduction of Hanwoo cow in Gangwon east area. *Reprod Dev Biol* 36(1):27-32.
  13. Paulenz H, Soltun K, Adnoy T, Berg KA, Soderquist L (2005): Effect of different extender on sperm viability of buck semen stored at room temperature. *Small Ruminant Research* 59:89-94.
  14. Perez-Garnelo SS, Borque C, Madrid-Bury N, Delclaux M, Talavera C, Martinez E, Palasz AT, De La Fuente J (2005): Basic characteristics and cryobanking of barbary sheep (*Ammotragus lervia*) semen. *Reprod. Fertil Dev* 17:249-250.
  15. Perez-Garnelo SS, Oter M, Borque C, Talavera C, Delclaux M, Martinez-Nevaldo E, Palasz AT, De la Fuente J (2006): Post-thaw viability of European bison (*Bison bonasus*) semen frozen with extenders containing egg yolk or lipids of plant origin and examined with a heterologous *in vitro* fertilization assay. *J Zoo Wildl Med* 37:116-125.
  16. Peterson K, Kappen MAPM, Ursem PJJ, Nothling Jo, Colenbrander B, Gadella B (2007): Microscopic and flow cytometric semen assessment of Dutch AI-bucks: Effect of semen processing procedures and their correlation to fertility. *Theriogenology* 67:863-871.
  17. Roca J, Carrizosa JA, Campos I, Laufuente A, Vazquez JM, Martinez E (1997): Viability and fertility of unwashed Murciano-Granadina goat spermatozoa diluted in Tris-egg yolk extender and stored at 5°C. *Small Ruminant Research* 25:147-153.
  18. Salamon S, Maxwell WM (2000): Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 62:77-111.
  19. Sukhato P, Thongsodseang S, Utha A, Songsasen N (2001): Effect of cooling and warming condition on post-thawed motility and fertility of cryopreserved buffalo spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 67:69-77.
  20. Verberckmoes S, Van Soom A, Dewulf J., de Kruif A (2005): Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen. *Theriogenology* 63:912-922.
  21. Yamashiro H, Wang H, Yamashita Y, Kumamoto K, Terada T (2006): Enhanced freezability of goat spermatozoa collected into tubes containing extender supplemented with bovine serum albumin (BSA). *J Reprod Dev* 52:407-414.
  22. Yanagimachi R (1994): Mammalian fertilization. In: Knobil E and Neil JD (Ed.), *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, pp. 189-317.

(Received: 14 September 2013/ Accepted: 25 September 2013)