

## 육용종용계 정자의 동결보존에 관한 연구<sup>1)</sup>

박창식 · 이봉덕 · 이경우 · 김학규<sup>1</sup>

충남대학교 축산학과, <sup>1</sup>축산기술연구소 가금과

### A Study on Cryopreservation of Semen from Broiler Breeder Males

C. S. Park, B. D. Lee, K. W. Lee, and H. K. Kim<sup>1</sup>

*Department of Animal Science, Chungnam National University, Daejeon, 305-764, South Korea*

*<sup>1</sup>Poultry Division, National Livestock Research Institute, Yuseong-gu, Daejeon, 305-365, South Korea*

**ABSTRACT** : Artificial insemination of cryopreserved semen is not practiced in broiler breeder industry although its benefit has been recognized for years. Thus, the present study explored the possibility of artificial insemination with cryopreserved semen in Ross broiler breeders. Sixty Ross female broiler breeders were artificially inseminated either with fresh or with cryopreserved semen pooled from five male Ross broiler breeders. One hundred eighty eggs were collected from each semen treatment and hatched. Fertility and hatchability of fertilized eggs collected from hens artificially inseminated with cryopreserved semen were 68.0 and 47.1%, respectively, compared to 88.3 and 87.2% with fresh semen. Both unfertilized eggs and dead embryos during hatch were significantly ( $P<0.05$ ) higher in the cryopreserved semen-treated group by approximately 2.7- and 3.2-fold than the fresh semen-treated counterparts. The moderately low fertility and markedly low hatchability of fertilized eggs obtained from cryopreserved semen observed in this study may be of practical interests in broiler breeder industry and deserves further study.

(Key words: broiler breeder, artificial insemination, cryopreservation)

## 서 론

닭의 인공수정은 순계의 유지에 주로 사용되어져 왔으나 (Leeson과 Summers, 2000), 최근에는 실용육계를 생산하는 일부의 농장과 산란계 농장에서 활용되고 있다 (김학규, 2002). 닭의 인공수정은 대부분 원정액을 가지고 실시하는 바, 소량주입에 따른 어려움이 있으며, 보존 시간이 짧아서 인공수정하는 시간이 지체되거나 하는 문제점이 있다. 특히 여름철에는 정자의 정액성상이 빠르게 저하되어 수정율이 더욱 낮아지는 문제점이 있다 (이봉덕, 2003). 이와는 달리, 희석정액은 인공수정시 1회 주입량을 증가시켜 시술이 용이하고, 인공수정에 필요한 적정량의 정자만을 이용할 수 있으나 희석 정액을 일정기간 보존할 수 있는 기술이 확립되어야 한다(김학규, 2002). 앞선 실험결과에 따르면 종용계 정액을 희석하여 5°C에 6시간 저장시 정자의 활력은 82~95%의

범위를 나타냈으며 종란의 수정율은 81.5~94.3%로 조사되었다(이봉덕, 2003).

육용종계에서 동결정액의 사용은 우수 종용계 선발효과를 극대화할 수 있는 잠재성이 이미 알려져 있다. 그러나 이에 대한 연구는 극히 제한되어 있으며, 아직까지 동결정액의 산업화는 아직 미흡한 실정이다. Lake 등 (1981)은 닭 정액을 동결보존하여 장기적인 보관이 가능하다면 우수하고 유용한 유전자를 저렴한 가격으로 지구촌 곳곳에 공급할 수 있다고 하였다. Buss (1993)는 닭 정자의 동결보존을 성공시키기 위한 요건으로 좋은 희석액 선택, 적합한 항동해제의 사용, 동결·용해방법에 대한 기술개발과 항동해제의 제거방법에 있다고 하였다. 지금까지 연구결과에 따르면, 동결정액을 사용할 때 종란의 수정율은 상당한 변이를 나타내고 있다. 즉, Van Voorst와 Leenstra (1995a,b)는 동결정액을 사용하여 80~93%의 높은 수정율을 보고하였으며, Gill 등 (1996)

<sup>1)</sup> 본 연구는 2000년도 농림기술개발 첨단연구과제에 의해 수행되었음.

\* To whom correspondence should be addressed : parkcs@cnu.ac.kr

은 62~65% 수정율을 나타내었다. 이와는 반면 20~30% 미만의 수정율도 보고된 바 있으며 (Kurbatov 등, 1976, 1979), 김학규 (2002)는 정액의 동결보존이 재래닭의 번식능력에 미치는 시험에서 동결보존정액을 사용하여 10% 정도의 수정율을 보고하였다.

따라서 본 연구는 원정액과 동결정액을 이용하여 인공수정시 육용종계의 수정율에 미치는 영향을 비교·조사하여 동결정액의 산업화 적용 가능성에 대한 기초자료를 제공하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시종계의 확보 및 실험구 배치

(주)삼화농원으로부터 공급받은 로스(Ross) 종용계(40주령) 5수와 종빈계(40주령) 60수를 케이지에 사육하였다. 정액채취는 1주일에 2회씩 실시하였으며 채취된 정액은 각각 원정액 및 동결정액으로 처리하여 인공수정에 사용하였다. 본 실험은 2처리(원정액 및 동결정액)로 하여 처리당 6반복, 반복당 5수의 종빈계를 공시하여 각각 인공수정을 실시하였다.

인공수정을 2회 실시후 24시간 후부터 종란을 수집하였으며, 수집된 종란은 훈증소독을 거쳐 종란 보관실에 저장하였다. 생산된 종란중 반복당 30개를 선발하여, 처리당 180개의 종란을 부화에 공시하였다. 입란후 10일째에 검란을 하여서 수정율 및 발육중지율을 조사하였고, 21일째 부화율을 조사하였다.

### 2. 인공수정 방법

인공수정은 원정액의 경우 1억의 정자가 포함된 0.02 mL 정액을 1주일에 2회, 동결정액의 경우 2억의 정자가 포함된 0.1 mL 정액을 1주일에 2회 실시하였다.

### 3. 동결-융해 희석액 성분

동결-융해 희석액의 성분은 Table 1에 나타나 있다.

### 4. 동결-융해방법 및 정액의 평가

#### 1) 정액의 평가

정액량은 눈금이 있는 5 mL 정액관으로 정액을 채취하여 육안관찰로 결정하였다. 정자의 운동은 현미경배율을 100으로 하여 검경하고 이를 녹화한 다음 모니터를 통하여 반복

**Table 1.** Compositions of freezing and thawing diluents

Ingredients	Prefreezing	Freezing	Thawing
	Lake's diluent	Lake's diluent	Lake's diluent
Magnesium acetate	0.070g	0.070g	0.080g
Sodium glutamate	1.920g	1.920g	1.520g
Potassium acetate	0.500g	0.500g	-
D-fructose	0.800g	0.800g	-
Polyvinyl pyrrolidone	0.300g	0.300g	-
Glycerol	-	22.0 ml	-
Tripotassium citrate	-	-	0.128g
Glucose	-	-	0.600g
Bes N, N-bis[2-hydroxyethyl] -2-aminoethanesulfonic acid	-	-	3.050g
NaOH	-	-	5.80 ml
Distilled water	100 ml	100 ml	100 ml

하여 운동성을 관찰하였다. 정자농도는 채취된 정액을 2% 식염수에 500배 희석 후 스펙트로포토메타 (Spectronic 20D<sup>+</sup>, Spectronic Instruments, Inc., USA)로 흡광도를 조사한 다음 미리 계산된 조사표에 의하여 산출하였다. 시험기간동안 육용종계로부터 채취한 수당 평균 정액량, 정액농도 및 정자운동성은 Table 2에 제시하였다.

#### 2) 정액의 동결방법

동결전 희석배율은 정액과 희석액의 비율이 1 : 1~1 : 5 범위를 넘지 않도록 하였다. 정액과 희석액을 20°C 온도에서 원정액 1 또는 2 mL을 prefreezing Lake's diluent(Table 1) 1 또는 2 mL로 1차 희석하였다. 상온에서 1차 희석된 정액을 30분 이내에 5분간에 걸쳐 5°C로 빠르게 냉각하고, 2 또는 4 mL 1차 희석액에 2 또는 4 mL의 freezing Lake's diluent(2차 희석액)를 첨가하여 5°C에서 희석하였다. 동결정액의 포장용기로는 0.5 mL 스트로(FHK, Japan)를 사용하였다. 동결방법으로는 액체질소 상단 5cm에서 20분간 동결후 -196°C의 액체질소에 보관하였다(김학규 등, 1989).

#### 3) 동결정액 융해방법

액체질소에 보관된 정액을 4°C 수조에서 3분간 융해하고 융해된 정액은 Thawing Lake's solution으로 서서히 희석하였다(정액 1: 희석액 20). 4°C에서 1500 rpm으로 15분간 원심분

리하여 글리세롤을 제거한 후, pellet을 100  $\mu$ L의 thawing Lake's solution으로 희석하여 4°C에서 운동성 관찰하였다. 인공수정 주입정액량은 0.1 mL로 주입정자수는 2억으로 하였다.

### 5. 주요조사항목

원정액과 동결정액을 인공수정하여 얻어진 종란에서 각각 수정율, 무정란수, 발생중지란수 및 부화율을 조사하였다.

### 6. 통계처리

실험에서 얻어진 자료는 T-검정법을 이용하여 5% 수준에서 유의성 검정을 하였다.

## 결과 및 고찰

종용계의 정액특성은 Table 2에 나타난 바와 같이 개체간에 정액량, mL당 정자농도에 있어서 차이를 나타내었으나 운동성에서는 차이가 없었다. 이러한 결과는 Benoff 등 (1981)이 닭 정액은 개체간에 많은 차이가 난다고 보고한 것과 일치하는 것이다. 원래는 종용계 10수를 사용하고자 하였으나, 5수는 정액채취가 불량하여 성적에서 제외하였다.

원정액 또는 동결정액을 사용하여 육용종계 암컷에 인공수정시 종란의 수정율, 무정란수, 발생중지란수 및 부화율에 미치는 영향을 Table 3에 제시하였다. 동결정액에 의한 수정율 및 부화율은 68.0 및 47.1%로 이는 원정액의 77 및 54%에 해당하였다( $P<0.05$ ). 그리고 동결정액을 이용한 인공수정시 무수정란수는 원정액에서 보다 2.7배 유의적으로 높았으

**Table 2.** Semen characteristics of Ross male broiler breeders

Individual <sup>1</sup>	Semen (ml)	Sperm concentration ( $\times 10^8$ /ml)	Motility (%)
1	0.31 $\pm$ 0.11	26.4 $\pm$ 3.78	93.3 $\pm$ 0.95
2	0.50 $\pm$ 0.13	25.6 $\pm$ 4.06	91.7 $\pm$ 1.36
3	0.28 $\pm$ 0.10	28.9 $\pm$ 3.98	91.7 $\pm$ 1.36
4	0.26 $\pm$ 0.10	13.7 $\pm$ 4.15	88.6 $\pm$ 2.67
5	0.48 $\pm$ 0.12	21.3 $\pm$ 3.51	93.3 $\pm$ 0.95
Average	0.37 $\pm$ 0.12	23.2 $\pm$ 3.90	91.7 $\pm$ 1.46

<sup>1</sup> Data on five male broiler breeders were omitted due to a low production of semen.

**Table 3.** Effects of artificial insemination using either fresh or frozen semen on subsequent fertility and hatchability of Ross broiler breeder eggs

Semen	No. of eggs	No. of unfertilized eggs	Fertility (%)	No. of dead eggs during hatch	Hatchability of fertile eggs(%)
Fresh	180	3.5 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>	88.3 $\pm$ 3.21 <sup>a</sup>	3.4 $\pm$ 0.85 <sup>b</sup>	87.2 $\pm$ 2.36 <sup>a</sup>
Frozen	180	9.6 $\pm$ 2.45 <sup>a</sup>	68.0 $\pm$ 4.25 <sup>b</sup>	10.8 $\pm$ 1.26 <sup>a</sup>	47.1 $\pm$ 3.24 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> No. of eggs per replicate was 30 with 6 replicates per treatment. Values are expressed as mean $\pm$ SE.

<sup>ab</sup> Means in a same column with different superscripts differ significantly ( $P<0.05$ ).

며 발생중지란수도 3.2배 높았다( $P<0.05$ ). 동결정액을 이용한 인공수정시 보여준 낮은 수정율과 부화율은 높은 무정란수와 발생중지란수 발생인 것으로 나타났다 (Table 3).

Van Voorst와 Leenstra (1995a,b)는 동결정액을 사용하여 80~93%의 높은 수정율을 보고하였으며 Gill 등 (1996)도 동결보존 정액을 인공수정하여 62~65% 수정율을 보고하였다. 이와는 반면 20~30% 미만의 수정율도 보고되었으며 (Kurbatov 등, 1976, 1979), 김학규 (2002)는 정액의 동결보존이 재래닭의 번식능력에 미치는 시험에서 동결보존정액을 사용하여 10% 정도의 수정율을 보고하였다. 본 실험에서 동결정액을 인공수정하여 68%의 수정율을 나타내었는데 이는 기존에 보고된 결과들(Kurbatov 등, 1976, 1979; 김학규, 2002)과 비교하여 우수한 것으로 향후 육용종계 동결정액의 실용화 가능성을 제시하였다.

## 적 요

본 시험은 육용종용계의 원정액과 동결정액을 이용하여 인공수정시 종란의 수정율에 미치는 영향을 비교·조사하여 동결정액의 산업화 적용 가능성에 대한 기초자료를 제공하고자 실시하였다. 5수의 로스 육용종용계에서 얻어진 정액을 원정액 및 동결정액으로 처리하여 각각 30수 씩의 육용종빈계에 인공수정하였다. 종란은 정액처리당 총 180개를 입란하였으며, 입란 후 10일째에 검란하여 수정율 및 발육중지율을, 21일째 부화율을 조사하였다. 동결정액에 의한 수정율 및 부화율은 68.0 및 47.1%로 이는 원정액처리구의 88.3 및 87.2% 보다 유의하게 낮았다. 또한 동결정액을 이용하여 인공수정을 시켰을 때에 무수정란수는 원정액을 사용하여

을 때 보다 2.7배 유의적으로 높았으며 발생중지란수도 3.2배 높았다( $P<0.05$ ). 원정액과 비교하여 동결정액을 이용한 인공수정시 보여준 높은 무정란수와 발생중지란수를 개선하기 위한 더 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

(색인: 육용종계, 인공수정, 동결정액)

## 사 사

본 시험을 위하여 육용종계를 제공하여 주신 (주)삼화원 종 제위께 심심한 감사를 드립니다.

## 인용문헌

- Benoff FH, Rowe KE, Fuguay JI, Renden JA, Arscott GH 1981 Effect of semen collector in semen volume and sperm concentration in broiler breeder males. *Poultry Sci* 60:1062-1065.
- Buss EG 1993 Cryopreservation of rooster sperm. *Poultry Sci* 72:944-954.
- Gill SPS, Buss EG, Mallis RJ 1996 Cryopreservation of rooster semen in thirteen and sixteen percent glycerol. *Poultry Sci* 75:254-256.
- Kurbatov AD, Narubina LE, Bubliayeva GB, Moskalenko LI 1979 Testing diluents used for cock sperm dilution, storage and deep freezing. *Sbornick Nauchnikh Trudove VNIRGJ* 28:9-103.
- Kurbatov AD, Narubina LE, Ivanov BI, Bubliayeva GB 1976 Cryopreservation of cock sperm with glycerol. *Bulletin VNIRGJ* 18:26-28.
- Lake PE, Ravie O, McAdam J 1981 Preservation of fowl semen in liquid nitrogen: Application to breeding programmes. *Brit Poultry Sci* 22:71-77
- Leeson S, Summers JD 2000 Broiler breeder production. University books. Guelph, Ontario, Canada.
- Van Voorst A, Leenstra FR 1995a Fertility rate of daily collected and cryopreserved fowl semen. *Poultry Sci* 74:136-140.
- Van Voorst A, Leenstra FR 1995b Effect of dialysis before storage or cryopreservation on fertilizing ability of fowl semen. *Poultry Sci* 74:141-146.
- 김학규 고문석 김인철 정행기 이광원 손동수 김현 지철하 박창식 1989 액체질소 콘테이너를 이용한 돼지정액의 동결. *한국축산학회지* 31:155-157.
- 김학규 2002 정액의 액상 및 동결보존이 닭의 번식능력에 미치는 영향. 충남대학교 박사학위논문.
- 이봉덕 2003 육용종계의 수정율·부화율 향상 방안 연구. *한국가금학회 춘계심포지움 '종계의 생산성 향상을 위한 기술개발'* 37-48.