

다배란 처리에 따른 한우 체내 수정란 생산 효율과 수정란이식

조상래, 최신희, 최창용, 손준규, 최수호¹, 김영주², 이풍연, 연성흠, 김현종, 손동수*
농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원시험장, ¹경상북도 축산기술연구소, ²영주시 농업기술센터

Effect of *In Vivo* Embryo Production and Embryo Transfer Following Superovulation in Hanwoo

Sang-Rae Cho*, Sun-Ho Choi, ChangYong Choe, Jun-Kyu Son, Soo-Ho Choi, Young-joo Kim, Poongyeon Lee, Sung-Heum Yeon, Hyun-Jong Kim and Dong-Soo Son*

Animal Genetic Resources Station, National Institute of Animal Science, RDA, Namwon 590-832, Korea

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

²Yeongju Agricultural Technology Extension Center, Yeongju 750-873, Korea

ABSTRACT

In vivo embryo produced from Hanwoo donor cows were collected and transferred to Hanwoo recipients. Cows, at random stages of the estrous cycle, received Progesterone Releasing Intravaginal Device (CIDR-plus, InterAg, New Zealand) together with injection of 1 mg estradiol benzoate and 50 mg progesterone, and gonadotropin treatment began 4 day later. For superovulation, a total of 28 mg FSH was intramuscularly injected twice a day in the way of decreasing doses 4 day (5, 5, 4, 4, 3, 3, 2 and 2 mg). Twenty one Hanwoo donor cows were flushed on day 7 of estrus cycle with same FSH and artificial insemination by the same technicians. Embryos were recovered 7 days after the second insemination by flushing the uterus with Embryo Collection Medium. The results obtained were as follows: The rates of transferable embryos were 50.3%, and 78 fresh embryos at morulae and blastocysts stage were transferred into Hanwoo recipients on day 7 of estrus cycle. The pregnancy rates were first embryo transfer 55.6%, 2nd 62.9% and 3rd 57.9%, respectively. In conclusion, These results suggest that CIDR-based superovulation protocol may be effectively used for production of superior Hanwoo embryos. Also, since it seems the condition of recipient cows greatly affect pregnancy rate, it is very important to evaluate recipient for effective cattle production.

(Key words : bovine, embryos transfer donor, recipient, super-ovulation)

서론

소에서 수정란이식은 유전적으로 우수한 형질을 지닌 암소를 선발하여 이 개체에 시스템화된 호르몬 처리 방법으로 다수의 난자 배란을 유도한 다음 종모우 정액으로 인공수정을 실시하여 수정란이 형성되어 자궁으로 내려와 착상이 일어나기 전에 수정란 회수용 기구를 이용하여 수정란을 채란한 후 수란우 즉 대리모를 선정, 수정란이식으로 산자를 생산케 하는 일련의 기술적 과정을 말한다. 이러한 기술은 가축의 능력 개량을 위해서 사용되고 있으며(Christensen, 1991; Smith, 1984), 최근에는 재래 품종 또는 희소 품종의 유전 자원 보존을 위한 하나의 수단으로도 활용되고 있으며, 수정란이식을 성공적으로 수행하기 위해서는 많은 요인들의 제한을 받는 것으로 보고되고 있다. 그 중에서 과배란을 유기하기 위해 투여하는 성선자극 호르몬의 종류(Boland 등, 1991), 투여량(Lerner 등, 1986), 투여 방법

(Donaldson, 1984) 및 발정 주기 중 투여 시기(Bellows 등, 1991) 등이 중요한 역할을 한다. 그리고, 수정란이식 후 수태율과 직접으로 연관이 있는 중대한 요인으로서 수정란의 선택에 따른 수정란의 발육 단계와 질(Linder and Wright, 1983) 수란우의 신체 충실도, 수정란이식 시술자의 기술적 숙련도 등에 따라서도 많이 좌우된다. 상업적인 소 수정란이식 확대는 1970년 초기에 시작하였으며, 수정란이식은 체외수정란을 이용한 비외과적인 방법으로 시작되었다(Mapletoft 등, 2002). 따라서 본 연구는 한우의 다배란 처리로 생산된 소 수정란을 회수하여 이식 가능 수정란과 이식한 결과를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 공시축

본 연구에서 사용된 공란우는 국립축산과학원 가축유전자

* Correspondence : E-mail : sonds@korea.kr

원시험장과 한우시험장의 보유축 중에서 한우 21두를 선발하여 시험에 공시하였다. 수란우는 영주시 한우 번식 농가에서 사육 중인 소로서 직장검사에 의해 건강한 생식기를 갖고 있는 한우를 선발하여 호흡기 질환 혼합 백신(소 전염성비기관염+소 바이러스성 설사병+파라인플루엔자3) 및 아까바네병 등의 예방 접종을 실시한 후 본 시험에 공시하였다.

2. 공란우의 과배란 처리 및 인공수정

공란우는 공란우의 발정 주기와 관계없이 Progesterone Releasing Intravaginal Device(CIDR-plus, InterAg, New Zealand)를 질내 삽입하고 5일째부터 FSH(Antorin[®]R10, Kawasaki, Japan) 28 mg을 5/5, 4/4, 3/3 및 2/2AU씩 나누어 4일간 12시간 간격의 감량법(28 mg group, n=21)으로 근육 주사하였으며, Antorin[®]R10 투여 6회째에 CIDR를 제거하였다. Antorin[®]R10 최종 투여 후 12시간 전후에 발정을 확인하고 Gonadorelin (GnRH, Fertagyl[®], Intervet, Holland) 200 µg을 근육 주사하였으며, 22시간과 34시간에 각각 1스트로씩 2회 인공수정을 실시하였다. 수정란 채란은 공란우 21두를 5회로 나누어 각각 실시하였다.

3. 수정란 회수 및 수정란이식

공란우를 인공수정 후 7일째에 2% lidocaine(리도카인[®], 제일제약) 5 ml로 경막외마취 후 fetal bovine serum(FBS, Gibco)가 2% 또는 polyvinyl alcohol(PVA, Sigma)가 0.1% 첨가된 Dulbecco's Phosphate-Buffered Salines(D-PBS, Gibco)으로 자궁을 관류하여 수정란을 채란하고, 14~84배율의 실체 현미경(Olympus, Japan)하에서 수정란을 회수하였다. 수정란의 평가는 Manual of the International Embryo Transfer Society (Stringfellow과 Seidel, 1998)의 code 1(excellent or good)과 code 2(fair)에 해당하는 수정란은 이식가능 수정란, code 3(poor)과 code 4(dead or degeneration)의 수정란은 이식 불가능 수정란으로 4등급으로 구분하였다. 수정란이식에 사용한 수정란은 주로 1, 2 등급만을 이식에 공시하였다. 수란우는 발정발현 6~8일에 직장 검사를 통하여 뚜렷한 황체가 있는 개체를 선발하고 2% lidocaine 5 ml로 경막외마취를 실시한 후 황체가 있는 자궁각에 이식하였다. 수정란이식 농가는 19개 농가이며, 시술자는 2명이 수행하였다.

4. 통계처리

실험 결과의 통계학적 분석은 SAS package(version 6.12) 이

용과 GLM producer를 사용하여 각 처리구간 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 과배란 처리에 따른 수정란 회수 결과

한우 공란우 21두에서 CIDR 및 FSH 처리로 과배란을 유기한 후 인공수정 실시로 수정란의 회수 결과는 Table 1과 같다. 공란우 21두는 5회에 나누어서 과배란 처리를 실시하였다. 1차, 2차, 3차에서는 5두씩, 4차, 5차는 3두씩 수정란을 채란하였다. 총 회수된 수정란은 155개였다. 수정란이식이 가능한 단계인 상실배와 배반포 그리고 확장 배반포 단계의 수정란은 7.1%와 40.6% 그리고 2.6%의 비율로 나타났다. 전체 이식 가능한 수정란의 수는 78개로 50.3%로 나타났다. 수정란이 회수는 되었으나, 미수정란과 발달이 중지된 수정란은 이식이 불가능한 수정란으로서 회수 수정란은 77개로서, 전체의 49.7%의 비율을 나타내었다. 그리고 수정란이 전혀 회수되지 않은 비율은 21두 중 3두로 나타났다. 손 등(2006)은 자연발정 관찰 후 과배란 처리한 공란우나 발정 주기와는 상관없이 CIDR를 이용한 과배란처리 공란우에서도 유의적인 차이를 보이지 않았다고 보고하였다. 이러한 결과를 토대로 본 연구에서는 CIDR 처리와 FSH 제제를 이용하여 과배란 처리를 실시하여 수정란을 채란하였다.

본 연구에서 회수한 수정란의 회수 비율은 85.7%의 결과를 보여 김 등(2004)이 보고한 83.3%와는 비슷한 결과를 보였으며, 손 등(2006)은 73~75% 수준으로 보고하여 본 연구보다는 다소 낮은 회수율을 보였다. 그러나 이식가능 수정란은 과배란 처리 21두에서 회수 수정란은 평균 3.6 ± 1.9 개로 나타났다. 이러한 결과는 손 등(2006)이 보고한 CIDR 처리 그룹의 6.5 ± 5.4 개, Conventional 처리 그룹에서 5.8 ± 2.2 개를 회수한 결과보다는 다소 낮은 회수율을 보였다. 이러한 회수 결과의 차이는 많은 공란우의 사양 조건과 영양 수준의 차이, 사용한 성선 호르몬의 종류, 투여 용량 및 공란우 사용 횟수 등 많은 요인에 따라서 이식 가능 수정란의 회수 효율에 영향을 미치는 것으로 사료된다. 호르몬의 투여 용량에 따른 회수 결과를 살펴보면 일본 淺田 등(2004)은 흑모 화우종 경산우에 Antorin[®]R10을 20 AU와 28 AU로 과배란 처리한 결과, 회수 난자 수는 각각 8.8개와 6.9개였으며, 이식가능 수정란은 각각 4.4개와 3.7개였으나, 투여량에 따른 유의적인 차이는 나타나지 않았

Table 1. Ratio of different developmental stage bovine embryos produced with super-ovulation

No. of total embryos	No. of unfertilized	No. of 2 to 12 cell	No. of transferable embryos		
			Morula	Blastocysts	Expansion-BL
155	73 (47.1)	4 (2.6)	11 (7.1)	63 (40.6)	4 (2.6)

으나, 미수정란 회수율은 20 AU에서 유의적으로($P<0.05$) 많았다고 보고하였다. 수정란 회수 중에서 미수정란의 회수 비율이 47.1%로 가장 높은 결과를 보였다. 수정란의 형태는 세포질의 수축과 함께 다양한 세포질의 형태를 띄고 있었으며, 2-12 세포 단계의 수정란은 세포의 발달중지란과 fragmented 형상을 띤 것과 구별되어 회수하였다. 이러한 미수정란이 많이 회수되는 원인을 다양한 방법으로 연구를 수행해야 할 것으로 사료된다.

2. 수정란이식에 따른 수태율 조사

Fig. 1, 2, 3은 과배란 처리된 공란우로부터 수정란을 회수하여 농가에 수정란이식을 3차에 나누어 실시한 결과이다. Fig. 1은 1차 수정란이식의 결과로서 5농가 수란우 27두에 이식을 실시하여 그 중 15두가 임신이 확인되어 수태율은 55.6%의 결과를 얻었으며, Fig. 2에서는 2차 수정란이식의 결과로서 10농가에 수란우 27두에 수정란이식을 실시한 결과, 17두에서 임신을 확인하여 62.9%의 수태율 결과를 나타내었다. 2차 수정란이식에서는 수란우 2두에 이식하여 2두 모두 임신

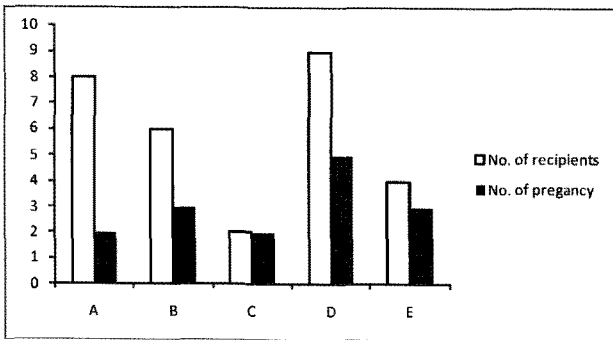


Fig. 1. Pregnancy rates after first embryo transfer. A~E: Farms/open square is No. of recipients, closed square is No. of pregnancy cows.

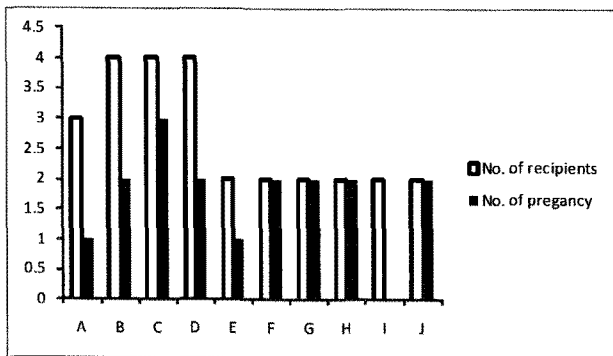


Fig. 2. Pregnancy rates following 2nd embryo transfer. A~J: Farms/open square is No. of recipients, closed square is No. of pregnancy cows.

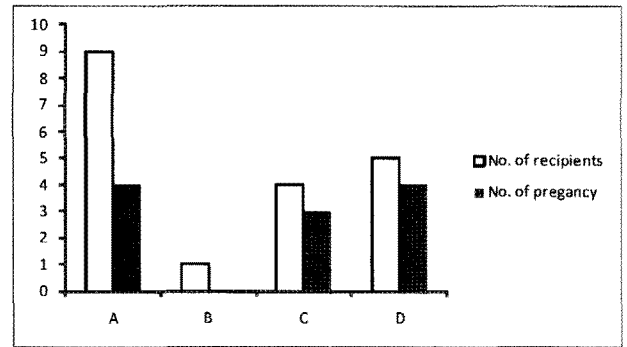


Fig. 3. Pregnancy rates following 3rd embryo transfer. A~D: Farms/ open square is No. of recipients, closed square is No. of pregnancy cows.

한 농가가 4농가가 있었으나, 수란우 2두에 이식하여 임신이 되지 않은 농가(I)도 있었다. 수정란이식 결과, 수태율이 제일 높은 농가는 C농가로서 수란우 4두에 이식하여 3두가 임신하여 75% 수태율을 보였다. 그리고, Fig. 3에서는 3차 수정란이식의 결과를 나타내었다. 수정란이식 농가는 4농가에서 실시하였다. 수란우 19두에 수정란이식을 실시한 결과, 11두가 임신되어 57.9%의 수태율을 보였다. B농가의 경우는 1두에 이식하였으나 임신이 확인되지 않았다.

일반적으로 수정란이식용 수란우로서는 미경산우를 주로 사용을 한다(Callesen 등, 1996). 미경산우를 사용하면 임신 말기까지 이르러 태아의 생존율을 높일 수 있는 장점이 있기 때문에 미경산우를 많이 사용한다(Callesen 등, 1994). 본 연구에서도 사용한 수란우는 경산우와 미경산우를 사용하였으나, 자료를 나타내지는 않았다. 그리고 수란우의 임신에 주된 영향을 미치는 원인으로서 낮은 황체의 반응과 동결 융해된 수정란의 사용, 영양 물질의 불균형한 공급 그리고 대사 장애 등을 꼽을 수 있다(Chagas e Silva 등, 2002). 현장에 수정란이식을 위해서는 수란의 선발과 관리에 대하여 전반적인 교육을 사전에 실시하는 것이 수태율 향상을 유도하는데 도움이 될 것으로 본다. 성공적인 수정란이식을 위해서는 수정란이식의 수태율에 영향을 주는 다양한 원인들에 대해서 좀 더 다양한 방법으로 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

결 론

한우의 공란우로부터 다배란 처리로 생산된 수정란을 회수하여 영주시 한우 농가 수란우에 이식한 결과는 다음과 같다. 한우 공란우 21두에서 과배란 처리로 인공수정을 실시한 후 7일째 수정란 회수용 카테타를 사용하여 수정란을 회수하였다. 다배란 처리는 5회 실시로 공란우는 각 1회씩 수정란을 회수하였다. 총 회수된 수정란은 155개였으며, 이중 이식이

가능한 수정란은 78개로 50.3%, 미수정란 및 발달중지란은 77개로 회수되었다. 155개 중 이식 가능 수정란 비율은 50.3%로 나타났다. 과배란 처리 후 수정란이 회수된 비율은 수정란은 85.7%로 나타났다. 그리고 수정란이 전혀 회수되지 않은 비율은 21두 중 3두로 나타났다. 미회수 비율은 14.3%였다. 수정란이식을 위해서 수란우는 19농가에서 75두를 선정하고, 수정란을 이식한 결과 수태율은 57.3%(43두)였다. 이상의 결과를 볼 때 수정란이식 후 수태율을 향상을 위해서는 각 농가마다 수란우의 관리를 적절히 수행한다면 보다 향상된 결과를 기대할 수 있을 것이다.

참고문헌

- 김용준, 송재웅, 서세현, 정구남, 김용수, 이해리, 손동수, 조성우, 김수희. 2004. 한우 및 젖소에서 과배란처리를 이용한 체내수정란 생산과 신선 및 동결 수정란이식결과. 한국수정란이식학회지 18:209-218.
- Bellows RA, Staigmiller RB, Wilson JM, Phelps DA and Darling A. 1991. Use of bovine FSH for superovulation and embryo production in beef heifers. *Theriogenology* 35(6): 1069-1082.
- Boland MP, Goulding D and Roche JF. 1991. Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. *Theriogenology* 35(1):5-17.
- Callesen H, Bak A and Greve T. 1994. Embryo recipients: Dairy cows or heifers. In: *Proceedings 10th Meeting European Embryo Transfer Association*. Lyon, pp. 125-135.
- Callesen H, Liboriussen T and Greve T. 1996. Practical aspects of multiple of ovulation-embryo transfer in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 42:215-226.
- Chagas e Silva J, Lopesda Costa L and Robalo Silva J. 2002. Plasma progesterone profiles and factors affecting embryo-fetal mortality following embryos transfer in dairy cattle. *Theriogenology* 58:51-59.
- Christensen LG. 1991. Use of embryo transfer in future cattle breeding schemes. *Theriogenology* 35:141-149.
- Son DS, Han MH, Choe CY, Choi SH, Cho SR, Kim HJ, Ruyl IS, Choi SB, Lee SS, Kim YK, Kim SK, Kim SH, Shin KH and Kim IH. 2006. Embryo production in superior Hanwoo donors and embryos transfer. *Korean. J. Emb. Trans.* 21(2):147-156.
- Donaldson LE. 1984. Dose of FSH-P as a source of variation in embryo production from superovulated cows. *Theriogenology* 22(2):205-212.
- Gordon I. 2003. *Laboratory Production of Cattle Embryos*. Second Edition. 303-304.
- Lerner SP, Thayne WV, Baker RD, Henschen T, Meredith S, Inskip EK, Dailey RA, Lewis PE and Butcher RL. 1986. Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows. *J. Anim. Sci.* 63(1):176-183.
- Lindner GM and Wright RW. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 20:407-416.
- Mapletoft RJ, Steward KB and Adams GP. 2002. Superovulation in perspective. In: *Proceedings 18th Meeting European Embryo Transfer Association*. Rolduc. 119-127.
- 淺田正嗣, 橋谷田豊, 福田淳郎, 千葉治男, 佐々木章彦, 木村博也, 鳥谷部浩康, 山口光明, 水尻貴裕, 久保光章, 西野智廣, 小西一之. 2004. 黒毛和種ドナー牛のFSH投与量および父方の系統が過剰排卵成績におよぼす影響. 北海道牛受精卵移植研究會 會報 22:20-24.

(접수: 2010. 8. 19 / 심사: 2010. 8. 20 / 채택: 2010. 8. 27)