

한우에 있어서 FSH-P 투여량과 에너지수준이 정상수정란의 생산에 미치는 영향

임석기 · 전기준 · 우제석 · 장선식 · 박준철 · 정종원 · 윤상보
축산기술연구소

Effect of FSH-P Dose and Energy Level on Normal Embryo Production in Hanwoo

S. K. Im, G. J. Jeon, J. S. Woo, S. S. Jang, J. C. Park, C. W. Chung and S. B. Yoon

National Livestock Research Institute, R.D.A

SUMMARY

The present study was carried out to investigate effect of FSH-P dose and energy level on normal embryo production after superovulation in Hanwoo.

The results obtained were as follows:

1. There was a significant effect of dose of FSH-P on normal embryo production in Hanwoo($P < 0.05$). At doses of 32mg(8.2 ± 5.7), number of normal embryo were higher than 28(6.6 ± 5.9), 40(4.9 ± 5.7), 50mg(2.2 ± 2.6).
2. The plasma P_4 levels on the first treatment day were higher group($> 4\text{ng/ml}$) than lower group($\leq 4\text{ng/ml}$), produced significantly($P < 0.05$) higher number of normal embryos.
3. There was a significant effect of energy level on normal embryo production in Hanwoo($P < 0.05$). At energy level of TDN 100%(8.6 ± 6.0), number of normal embryos were higher than TDN 70%(5.1 ± 6.5) and TDN 130%(4.4 ± 2.6)
4. The donor returned to normal estrus after superovulation were 44.8, 28.4 and 29.9 days by TDN 70, 100 and 130%, respectively.

(Key words : superovulation, FSH-P, energy level, normal embryo)

서 론

다배란 처리법은 소 수정란이식에 있어서 가장 중요한 기초 기술로서 Casida(1943)가 처음으로 소에서 과배란처리에 관한 연구를 시작한 이후 부단히 개선되어 수정란이식의 기술적인 진보는 상당히 이루어졌으나 정상 수정란 생산의 안정적인 체계는 거의 개선되지 못하고 있는 실정이다(Armstrong, 1993). 이유는 다배란처리에 사용되는 호르몬은 임

마혈청성성선자극호르몬(PMSG: pregnancy mare serum gonadotropin)이 사용되어 왔으나 PMSG에 함유되어 있는 sialic acid가 반감기를 길게 하여 estrogen을 분비하므로써 수정란의 질을 저하(Monnaux 등, 1983)시키기 때문에 현재는 난포자극호르몬(FSH: follicle stimulating hormone)을 사용한다. 이 FSH는 1일 2회 4일간 24~50mg을 동량 또는 감량방식으로 투여하는 방법(Chupin과 Procureur, 1983)이 일반적으로 실시되고 있으나 개체에 대한 hormone의 감수성이 대단히 차이가

있어 난소반응이 동일하지 않으며 성숙난포수, 배란수 및 정상수정란수가 개체마다 차이가 크다는데 있다. 또한 공란우의 사양조건에 대해서는 에너지 수준(Stagmiller 등, 1979)과 proteine수준(Garcia-Bajalil 등, 1994)을 중심으로 연구가 수행되고 있으나 국내에서는 거의 이루어지지 않는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 다수의 정상수정란을 안정적으로 확보하기 위하여 다배란처리시 사용되는 FSH의 투여량과 공란우의 사양시 급여사료의 에너지수준을 구명코자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공시축

본 실험에 공시된 공란우는 축산기술연구소 대관령지소에서 사육중인 한우성빈우중 상태가 양호하고 정상 발정주기를 갖는 96두를 선발하여 사용하였다.

2. 공란우 사양관리

공란우의 사양관리는 대관령지소에서 관리하는 방법인 8:00~9:00사와 17:00~18:00시 사이에 시험기간동안 동일한 사료인 혼합목건초와 농후사료를 TDN 70%구는 두당 4.3kg 및 1.7kg, TDN 100%구는 두당 6.5kg 및 2.5kg, TDN 130%구는 두당 8.7kg 및 3.3kg을 1일 2회 혼합급여하였으며 물은 자유음수시켰고 개방식 축사에서 각 구별로 집단 사육하였다.

시험기간에 급여한 사료의 영양가와 화학적 조성은 Table 1과 같다.

3. 공란우의 다배란 처리 및 인공수정

다배란 처리는 발정주기 10~13일째에 FSH-P (Ahtech, Schering, U.S.A)를 총 28, 32, 40 및 50mg을 4일간 12시간 간격으로 감량방식에 의하여 (28mg:5, 5, 4, 4, 3, 3, 2, 2mg)을 근육주사하였으

며 발정을 유도하기 위하여 PGF₂α 유사제인 lutalyse (Upjohn, U.S.A) 25mg을 FSH-P 처리개시 3일째 오전에 근육주사하였다.

인공수정은 lutalyse 주사후 48시간에 발정을 확인한 후 12시간 간격으로 2 straw씩 2회 실시하였으며 동결정액은 축협중앙회 개량사업본부 한우개량부에서 생산된 보증종모우 동결정액을 이용하였다.

4. 수정란 회수

다배란 처리된 공란우의 발정발현 7~8일째에 lidocaine hydrochloride (2% Lidocaine, Jeil Pharm. Co., Korea) 8ml로 경막외 마취를 실시하여 속분을 제거한 다음 난소를 검사하여 황체의 수를 조사하였다. 수정란회수는 Foley catheter (Agtech, Risch, U.S.A)를 경관경유법으로 자궁체에 고정한다음 Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco. BRL Life Technologies, U.S.A)이 1% 첨가된 Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS, Gibco. BRL Life Technologies, U.S.A) 용액을 사용하여 비외과적 방법으로 관류액을 수정란회수기 (Embryo collector, Fujihira Industry Co., Japan)로 회수하였다.

5. 수정란 평가

관류된 채란액을 87×15mm 멸균 petri dish (녹십자, 한국)에 옮겨 11~64배율의 실체현미경 (Olympus, Japan)으로 수정란을 회수한 다음 20%의 FBS가 첨가된 D-PBS 용액이 들어있는 35×10mm tissue culture dish (Falcon, Becton Dickinson Co., U.S.A)로 옮겨 Linder와 Wright (1983)의 기준에 따라 수정란을 발육단계와 질을 형태학적으로 평가하였다. 수정란의 발육단계는 상실배기 (morula), 배반포기 (blastocyst) 및 확장배반포기 (expanded blastocyst)로 구분하였으며, 수정란의 질은 우수 (excellent), 우량 (good), 보통 (fair) 및 불량 (변성란 및 미수정란)으로 구분하였고 이중 우

Table 1. Chemical composition and nutritive value of experimental diets

(Unit : %)

Feeds	DM	CP	EE	NFE	C. Fiber	C. Ash	TDN
Mixed grasshay	81.30	10.30	2.80	40.60	22.00	5.60	51.29
Concentrate	88.00	10.44	4.45	55.97	8.59	8.55	66.04

수, 우량 및 보통을 나타내는 수정란을 정상수정란으로 선정하였다.

6. 혈액채취 및 혈청분리

공란우의 혈액은 발정일, 다배란처리전일, 다배란처리일, 채란일에 각각 경정맥으로부터 채취하여 실온에서 2시간 보관후 원심분리(2,500rpm, 15분)하여 혈청을 분리한 후 호르몬분석시까지 -20℃이하에서 보존하였다.

7. 혈중 progesterone농도 분석

혈청중 progesterone농도는 Immuchen direct progesterone RIA kit(ICN Biomedicals, Inc. U.S.A)를 이용한 radioimmunoassay(RIA)법으로 반응시킨 다음 γ -counter(Cobra, U.S.A)에 측정하여 계산하였다.

8. 통계분석

본 실험결과와 통계분석을 Chi-square검정에 의하여 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. FSH-P투여량

정상수정란의 생산에 대한 FSH-P투여량의 영향

은 Table 2에서 보는 바와 같이 FSH를 총 28, 32, 40 및 50mg 투여했을 경우 황체수는 각각 12.0±7.5, 12.9±7.4, 8.3±6.6, 6.2±5.7개였다. 회수수정란수는 각각 8.2±6.4, 9.8±6.6, 6.3±6.4 및 2.2±2.6개였으며 정상수정란수는 각각 6.6±5.9, 8.2±5.7, 4.9±5.7 및 2.2±2.6개로 28mg구와 32mg구에서는 유의차가 인정되지 않았으나 32mg구가 좋은 경향을 나타냈으며 32mg 이상 투여할 경우 점차 성적이 떨어지는 경향을 나타냈고 50mg구와는 유의차가 인정되었다(P<0.05).

이와 같은 결과는 Donaldson(1984)이 FSH-P를 24~40mg 투여한 경우 이식가능 수정란이 5.1~5.9개가 회수되었으나 50~60mg을 투여하였을 때는 2.7~3.8개로 감소했다는 보고와 일치하는 경향이었으나 28mg투여가 가장 좋은 결과를 나타내 본 실험의 32mg이 가장 좋은 결과를 나타낸 것과는 일치하지 않았으나 Pawlshyn 등(1986)이 육우에서 FSH-P를 60mg투여하였을 때 회수된 이식가능 수정란수가 감소하였으며 30mg투여시 이식가능 수정란의 수가 6.4개였다고 보고한 결과와는 일치하는 경향이였으며 Lerner 등(1986)은 유우에 있어서 공란우의 연령이 많은 개체에서는 FSH의 양이 증가할수록 이식가능 수정란이 증가하였으나 연령이 적은 개체에서는 FSH의 양이 증가할수록 감소하였고 보고하였고 김 등(1997 a)은 공란우의 체중이

Table 2. Effect of FSH-P dose on normal embryo production

FSH-P dose	No. of cow	No. of CL*	No. of EC*	No. of NE*
28mg	12	12.0±7.5 ^a	8.2±6.4 ^a	6.6±5.9 ^a
32mg	12	12.9±7.4 ^a	9.8±6.6 ^a	8.2±5.7 ^a
40mg	12	8.3±6.6 ^{ab}	6.3±6.4 ^{ab}	4.9±5.7 ^{ab}
50mg	12	6.2±5.7 ^b	3.2±3.3 ^b	2.2±2.6 ^b

^{ab} Different superscripts with same column denote significant differences(P<0.05)

*CL : Corpus Luteum, EC : Embryo Collection, NE : Normal Embryo

Table 3. Relationships between plasma P4 levels on the number of corpora lutea, total embryos collected, normal embryos and unovulated follicles

	No. of cow	No. of CL	No. of EC	No. of NE	No. of UF*
P ₄ ≤ 4ng/ml	24	8.2±5.3 ^b	5.4±4.2 ^b	4.5±4.2 ^b	2.3±1.9
P ₄ > 4ng/ml	24	12.9±6.4 ^a	9.6±6.7 ^a	7.5±5.9 ^a	2.1±1.7

^{ab} Different superscripts with same column denote significant differences(P<0.05).

* UF : Unovulated Follicle

351~400kg에서는 32mg, 401~450kg의 경우는 30mg, 451kg이상의 경우는 32mg에서 이식 가능한 수정란의 수가 7.0, 10.6 및 11.4개로 FSH-P의 호르몬 투여량은 30~32mg이 적당하였다는 보고와 일치하는 경향을 나타내었다.

Table 3은 혈중 progesterone수준과 정상수정란 생산과의 상관관계를 나타낸 것으로 호르몬 투여전 혈중 progesterone수준이 4ng이상인 개체가 황체수, 회수란수, 정상수정란수에서 4ng이하인 개체보다 유의하게 많이 생산되었다($P < 0.05$).

이와 같은 결과는 Goto 등(1988) 등이 다배란처리된 P4의 수준은 이상적인 다배란 처리의 중요한 요인으로 일반적으로 9개 이상의 정상수정란을 생산하기 위해서는 3ng/ml이상의 수준을 유지해야 한다는 보고와 일치하는 것으로 나타나 소에 있어서 다배란 처리전 난소기능, 특히 황체의 기능이 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다.

2. 급여사료의 에너지수준

공란우의 사양시 급여사료에 대한 에너지수준을 달리하여 FSH-P 32mg을 투여한 후 난소반응 및 수정란회수 성적은 Table 4에 나타내었다.

Table 4에서 보는 바와 같이 TDN 100%구가 황체수, 회수란수 및 정상수정란수는 각각 13.2 ± 7.0 , 10.5 ± 7.0 , 8.6 ± 6.0 개로 TDN 70%, TDN 130%의 8.9 ± 8.2 , 6.5 ± 7.8 , 5.1 ± 6.5 , 및 9.5 ± 4.7 , 5.2 ± 2.9 , 4.4 ± 2.6 개에 비하여 유의차가 인정되었다($P < 0.05$).

이와 같은 결과는 Hill 등(1970)은 육우 처녀우에 있어서 저영양시 일시적으로 난포발육이 감소한다고 하여 본 실험과 일치하였으며 Staigmiller 등(1979)이 TDN 130%로 공란우를 사양한 후 FSH투여에 따른 배란된 개체수 및 난소낭종을 나타내는 개체수에 있어서 그룹간 유의차가 없다고 보고하여

본 실험과 일치하는 경향을 나타내었다. 또한 Garcia-Bojalil 등(1994)은 CP 12.3% 및 CP 27.4%로 급여후 FSH투여에 따른 황체수, 회수난자수 및 이식가능 수정란수가 CP 12.3%구는 각각 15.6, 7.4 및 4.0개였으며 CP 27.4%는 15.9, 8.7 및 4.9개로 유의차가 인정되지 않았다고 보고하였다.

본 실험에서 TDN 70%구와 TDN 130%구에서는 유의차가 인정되지 않았다는 결과와 일치한다. 또한 Blancharde 등(1990)은 반추위내 가용단백질수준을 64%와 73%로 나누어 사양후 다배란처리시 이식가능 수정란수는 5.5 및 4.5개로 나타났다. 즉 반추위내에서 이용할 수 있는 단백질 함량이 높을수록 이식가능 수정란수가 많이 생산되는 것으로 보고하였다. 따라서 공란우 사양시 저영양 및 고영양수준보다는 적정사양수준을 유지하며 반추위내 가용단백질수준을 높일 필요가 있다고 사료된다. 한편 혈중 progesterone수준에 대한 급여사료에너지 수준의 영향은 Table 5에 나타난 바와 같이 에너지 수준에 따른 progesterone 수준의 차이는 없었으나 TDN 100%구에서 채란일에 35.84ng/ml 로 TDN 70% 및 TDN 130%구의 14.31ng/ml 및 14.61ng/ml 보다 높은 수준을 유지하여 Table 4의 성적을 뒷받침하여 주었으며 이와 같은 결과는 Staigmiller 등(1979)이 황체수가 11~12개월 때 $21.7 \sim 37.8 \text{ng/ml}$ 의 수준을 유지한다는 보고와 일치하는 경향을 나타내었다.

3. 채란후 발정재귀일수

수정란 채란후 공란우의 에너지 수준에 따른 발정재귀 일수를 조사한 결과는 Fig. 1과 같다.

Fig 1.에서 보는 바와 같이 TDN 70%, TDN 100% 및 TDN 130%구에서 각각 44.8일, 28.4일, 29.9일로 급여사료의 에너지수준이 낮았을 때 공란우의 발정재귀가 늦게 나타났다. 이와 같은 결과는

Table 4. Effect of energy level on normal embryo production

Energy level	No. of cow	No. of CL	No. of EC	No. of NE
TDN 70%	16	8.9 ± 8.2^b	6.5 ± 7.8^b	5.1 ± 6.5^b
TDN 100%	16	13.2 ± 7.0^a	10.5 ± 7.0^a	8.6 ± 6.0^a
TDN 130%	16	9.5 ± 4.7^{ab}	5.2 ± 2.9^b	4.4 ± 2.6^b

^{a,b} Different superscripts with same column denote significant difference ($P < 0.05$).

Table 5. Effect of energy level on circulating levels of progesterone (Unit : ng/ ml)

Item	Energy level		
	TDN 70%	TDN 100%	TDN 130%
Estrus day	1.20	0.25	0.30
Prior to superovulation	2.54	4.44	3.44
Superovulation day	3.14	4.25	2.90
Embryo collection day	14.31	35.84	14.61

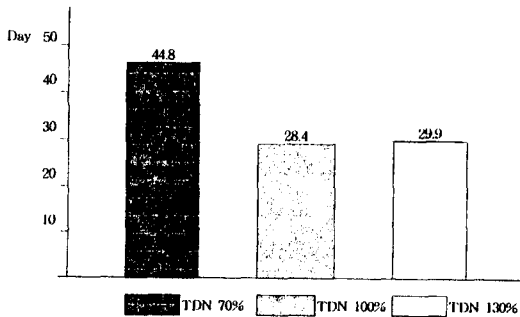


Fig. 1. Effect of return normal estrus day of donors after collecting embryo by energy level

급여에너지수준이 명확하지 않아 직접적인 비교는 할 수 없으나 김 등(1997b)은 1주기와 2주기에 73.5%가 발정을 재귀한다고하여 본 실험의 결과와 비슷한 경향을 나타냈다. 따라서 본 실험결과 FSH-P투여량은 32mg, 공란우 급여사료의 에너지수준은 100%가 정상수정란을 생산하는데 가장 효과적인 것으로 사료된다.

적 요

본 연구는 한우에서 다배란처리시 사용되는 FSH-P의 투여량과 공란우의 사양시 급여사료의 에너지 수준을 구명하여 다수의 정상수정란을 안정적으로 생산할 수 있는 방법을 모색코자 실시한 결과는 다음과 같다.

1. 한우에 있어서 정상수정란 생산에 대한 FSH-P의 투여량은 유의차가 인정되었다 $P < 0.05$. 32mg 투여시 정상수정란의 수(8.2 ± 5.7)가 28(6.6 ± 5.9), 40(4.9 ± 5.7) 및 50 mg(2.2 ± 2.6) 투여시보다 높았다.

2. 호르몬 투여전 혈중 progesterone수준이 높은 구에서 많은 정상수정란을 생산하였다($P < 0.05$).
3. 정상수정란 생산에 대한 에너지수준은 유의차가 인정되었다($P < 0.05$). TDN 100% 급여시 정상수정란의 수(8.6 ± 6.0)가 TDN 70%(5.1 ± 6.5) 및 TDN 130%(4.4 ± 2.6)급여시 보다 높았다.
4. 다배란 처리후 공란우의 발정재귀일수는 TDN 70, 100 및 130%에서 각각 44.8, 28.4 및 29.9 일이었다.

참고문헌

- Armstrong DT, 1993. Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenology*, 39:7-24.
- Blanchard T, Ferguson J, Love L, Takeda T, Henderson B, Hasler J and Chalupa W. 1990. Effect of dietary crude-protein type on fertilization and embryo quality in dairy cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 51:905-908.
- Casida LE, Meyer RK, Mcshan WH and Wisnicky W. 1943. Effect of pituitary gonadotropins on the ovaries and the induction of superfecundity in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 4:76-79.
- Chupin D and Procureur R. 1982. Use of pituitary FSH to induce superovulation in cattle : Effect of injection regime. *Theriogenology*, 17:81(Abstr.).
- Donaldson LE. 1984. Dose of FSH-P as a source of variation in embryo production from superovulated cows. *Theriogenology*, 22:205-212.
- Garcia-Bojalil CM, Staples CR, Thatcher WW and Drost M. 1994. Protein intake and development ovarian follicles and embryos of superovulated nonlactating dairy cow. *J. Dairy Sci.*, 77:2537-2548.
- Goto K, Ohkutsu S, Nakanishi Y, Ogawa K,

- Tasaki M, Ohta H, Inohae S, Tateyama S, Kawabata T, Ishii S, Miyamoto A, Furusawa T, Umezumi M and Masaki J. 1988. Endocrine profiles and embryo quality in superovulated Japanese black cattle. *Theriogenology*, 29:615-629.
- Hill JR, Lamond DR, Hendricks DM, Dickey JF and Niswender GD. 1970. The effects of undernutrition on ovarian function and fertility in beef heifers. *Biol. Reprod.*, 2:78-84.
- Lerner SP, Thayne WV, Baker RD, Henscher T, Meredith S, Inskoop EK, Dailey RA, Lewis PE and Butcher RL. 1986. Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows. *J. Anim. Sci.*, 63:176-183.
- Lindner GM and Wright RW, Jr. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, 20:407-416.
- Monniaux D, Chupin D and Saumarde J. 1983. Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology*, 19:55-64.
- Pawlyshyn V, Lindsell CE, Braithwaite M and Mapletoft RJ. 1986. Superovulation of beef cows with FSH-P : A dose-response trial. *Theriogenology*, 25:179(Abstr.).
- Seidle GE Jr. 1981. Superovulation and embryo transfer in cattle. *Science*, 211:351-358.
- Staigmiller RB, Short RE, Bellows RA and Carr JB. 1979. Effect of nutrition on response to exogenous FSH in beef cattle. *J. Anim. Sci.*, 48:1182-1190.
- 김홍률, 김덕임, 박노형, 김창근, 정영채, 윤종택, 전광주. 1997a. 한우에서 FSH-P와 super-ov에 의한 체내수정란 생산에 관한 연구 II. 공란우의 조건에 따른 체내수정란 생산에 영향을 미치는 요인. *한국수정란이식학회지*, 12:49-56.
- 김홍률, 김덕임, 박철진, 김창근, 정영채, 이종완. 1997b. 한우에서 FSH-P와 super-ov에 의한 체내수정란 생산에 관한 연구 III. 계절 및 체란일에 따른 체내수정란 생산에 영향을 미치는 요인. *한국수정란이식학회지*, 12:57-66.

(접수일자 : 1997. 11. 10 / 채택일자 : 1997. 12. 15)