

한우 체외수정란을 이용한 쌍자생산에 관한 연구

송상현[†] · 조성근 · 조상래 · 심보웅 · 감다원^{****} · 정기화^{**} · 손동수^{***}

이효종^{*} · 박충생 · 최상용^{*}

경상대학교 축산과학부

Production of Twin Calves Following Transfer of Hanwoo Embryos Produced *In Vitro*

S. H. Song[†], S. K. Cho, S. R. Cho, B. W. Sim, D. W. Kang^{****},

K. H. Chung^{**}, D. S. Son^{***}, H. J. Lee^{*}, C. S. Park and S. Y. Choe^{*}

Department of Animal Science, Gyeongsang National University, 660-701, Republic of Korea

SUMMARY

This study was carried out to improve a technique of embryo transfer for twin calves production in Hanwoo cattle. Blastocysts for the donor of embryo transfer were classified into three criteria by assessment of morphology; early blastocyst, blastocyst and expanded blastocyst. Two embryos were introduced transcervically into uterine horn either of Hanwoo or Holstein by ipsilaterally or contralaterally to the corpus luteum. Thirty-six out of 57 recipients cows were inseminated by artificially on the next day of estrus, and followed by transfer of embryos into contralaterally.

The pregnancy rates of recipients following transfer of bovine embryos of day 7, 8 and 9 was 43.5, 18.2 and 8.3%, respectively. These results appeared that there was a significant ($P < 0.05$) difference between on day-7 embryos and day-9 embryos, but not between on day-8 and day-9 embryos. Although there was not significant ($P < 0.05$) difference in the pregnancy rates between the blastocysts (11/25, 44%) and expanded blastocysts (2/19, 10.5%) and between the blastocysts and early blastocysts (2/13, 15.4%), the embryos at blastocyst stage are more suitable than others for obtaining higher rate of pregnancy. There was no significant difference on pregnancy of the embryos transferred prior to presence (6/21, 29%) or absence (9/36, 25%) of artificial insemination. On pregnancy of Holstein, 2 (15.4%) out of 13 recipients were pregnant in heifer. Similar Pregnancy rates were obtained between 1~2 parities and 3~4 parities by 30% (6/20) and 27.3%(3/11), respectively. Taken together, there was not significant difference in pregnancy rate due to small number of recipients used for this experiment. Both of Hanwoo and Holstein

* 경상대학교 동물의학연구소(Institute of Animal Medicine, Gyeongsang National University)

** 경상대학교 축산진흥연구소(Institute for Development of Livestock Production, Gyeongsang National University)

*** 축산기술연구소 종축개발부(National Livestock Research Institute, R.D.A)

**** 경상대학교 의과대학 생리학교실(Department of Physiology, Gyeongsang National University)

† Correspondence

introduced the embryos by contralaterally to the corpus luteum were slightly higher pregnancy rate compare to by ipsilaterally (12/41, 29.3% vs. 3/16, 18.8%). The ratio of production of twin and single calves in Holstein was 20% (9/45) and 2.2% (1/45), respectively. However, in Hanwoo cows both of production of twin and single were similar as 8%. This result suggests that Holstein as recipients was superior to Hanwoo cows for production of twin calves. Out of all 15 pregnant, 12 (80%) were produced a total of 22 normal calves in which the others composed of abnormal, as judging as 2 (13.3%) for abortion and 1 (6.6%) for stillbirth during the pregnant period.

(Key words : embryo transfer, bovine, IVF, twin calves)

서 론

현재의 우리 나라 축산업은 IMF의 한파로 인하여 사료비 상승 및 소값 하락 등으로 어려운 상황에 직면해 있어 품질개선과 생산비 절감을 통하여 난관을 극복해야 할 것이다. 생산비 절감을 위하여는 체외수정란을 이용하여 쌍자를 생산하는 것이 농가의 대외경쟁력을 제고할 수 있는 한 방법이라고 할 수 있다.

쌍자 생산방법에는 성선자극호르몬에 의한 방법(Isogai 등, 1991), 호르몬 면역법에 의한 방법(Reeves 등, 1989), 수정 후 6~8일에 수정란을 추가적으로 이식하는 방법(Boland 등, 1976; Boland 와 Gordon, 1978; Sreenan 등, 1981; Sreenan과 Diskin, 1989), 수정란 2개를 동시에 주입하는 방법(Rowson 등, 1971; Suzuki 등, 1989; Anderson 등, 1978) 등이 보고되었다. Rowson 등(1971)은 미경산우가 쌍태 유기의 수란우로 적당하지 못한 것은 미경산우의 태반영역이 일정한 임신기간 동안에 태아를 유지하는데 많은 문제가 있다고 하였다. Broadbent와 Dolamn(1989)은 311두의 수란우에 인공수정 후 반대측 자궁각에 수정란을 이식한 결과, 64%가 수태되었으며 이 중 45%가 쌍태라고 하였다. 인공수정을 한 다음 수정란을 이식하는 방법이 수정란만 이식하는 방법보다 쌍자를 효율적으로 생산한다는 보고도 있다(Suzuki 등, 1994). 쌍자생산에서 문제가 되는 것이 유산과 사산인데, 쌍태우의 유산율은 단태우에 비하여 높지 않다는 주장도 있다(O'Farrell 등, 1990). Farin 등(1994)은 체내 수정란 이식에 의해 생산된 송아지와 비교하여 체외성숙, 수정 및 배양된 수정란을 이식하여 임신된

소에 있어서 7개월된 상태의 변형된 태아발달을 보고하였다.

최근 국내에도 육류 소비량의 증가에 따라 육우의 증식대책으로 쌍태유기 기술이 주목받고, 이에 관한 연구가 활발히 진행된 적도 있으나, 결과는 미미한 상태이다. 쌍태유기는 가축의 개량적인 측면보다는 증식에 목적이 있으므로 육우산업에서 1회에 2두의 송아지 생산이 가능하게 되므로 육우의 생산성을 높여 한우 및 육우 사육농가의 소득향상에 도 기여할 수 있을 것이다.

본 연구에서는 최적의 배양조건하에서 생산된 한우 체외수정란을 한우 또는 Holstein 암소에 각각 이식하여 수태율에 미치는 영향을 조사하여 수정란 이식기법을 확립하고 수정란이식 기술의 보급을 활성화함으로써, 다수의 쌍자를 생산하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 난포란의 채란

본 실험에 공시된 난소는 도축장에서 도살된 한우의 암소에서 30분 이내에 적출하여 penicillin G (100 units/ml)와 streptomycin(100 µg/ml)이 함유된 생리식염수(28~30℃)가 들어 있는 보온병에 담아 2 시간내에 실험실로 운반하였다. 미성숙 난포란을 채취하기 전 난소 주위의 불필요한 조직을 제거한 후 penicillin G(100 units/ml)와 streptomycin(100 µg/ml)이 함유된 생리식염수(28~30℃)로 3~4회 세척하였다. 18 gauge의 주사침이 부착된 10 ml 주사기를 이용하여 난포란을 채취하였으며, 난포(직경:2~7 mm)에서 난포액과 난포란을 동시에 흡입하여 채란하였다. 난포란의 채취시

사용한 배양액은 38~39℃의 bovine serum albumin(BSA)이 첨가된 Tyrode's-Hepes를 사용하였다. 흡입된 난포액은 15 ml의 centrifuge tube에 담아 10~15 분간 정치시킨 후, 침전된 하층액을 5 ml의 피펫으로 흡입하여 배양접시에 옮기고 40 배 배율의 도립현미경(Olympus, Japan)에서 난포란을 수집한 후, Tyrode's-Hepes로 3~4회 세척하면서 난포란을 선별하였다. 4~5 층의 난구세포층으로 되어 있고, 세포질이 충실한 것을 grade I, 2~3 층의 난구세포층을 가진 것을 grade II, 부분적으로 나화된 것을 grade III로 구분하였으며, grade I, II 난포란만을 본 실험에 공시하였다.

2. 난포란의 체외성숙

난포란의 체외성숙에 사용한 배양액은 25 mM Hepes가 첨가된 TCM-199(Earle's salt, Sigma, USA)의 기본배양액을 초 순수장치(Barnstead, USA)에서 생산된 3차 증류수를 이용하여 pH 7.2, 삼투압은 290 mOsm/kg으로 조정하여 제조하였다. 배양액은 0.2 µm filter(Gelman Sci., USA)로 여과하여 15 ml centrifuge tube(Corning, USA)에 9 ml씩 분주하여 4℃의 냉장고에 보관하면서 약 2 주간 사용하였다. 체외성숙 배양액은 TCM-199 배양액에 sodium pyruvate(56 µg/ml), streptomycin(100 µg/ml), penicillin G(100 units/ml)와 LH(10 µg/ml), FSH(35 µg/ml), estradiol-17β(1 µg/ml)를 첨가하였으며, 혈청으로 10% fetal bovine serum(FBS)를 첨가하였다. 이와 같이 준비된 배양액은 50 µl의 소적을 만들어 5% CO₂, 98~99% 습도, 39℃ incubator에서 4시간 이상 전 배양을 실시하여 평형을 유도하였다. FBS는 56℃에서 30 분간 비동화시켜 0.2 µm membrane filter(Gelman Sci., USA)로 여과한 후 1 ml씩 Eppendorf tube에 분주하여 -20℃에서 냉동보관하면서 사용하였다.

체외성숙은 50 µl의 체외성숙 배양액에 등급별로 20~25 개의 난포란을 넣고 5% CO₂, 98~99% 습도, 39℃ CO₂ incubator에서 24 시간 동안 체외성숙을 유도하였다. 난구세포의 팽창 정도와 세포질의 충실도 등으로 체외성숙도를 판정하여 체외수정에 공시할 난포란을 결정하였다.

3. 정자의 준비 및 체외수정

동결정액은 37℃의 온수에서 15초 동안 용해한 후, 활력이 높은 정자를 채취하기 위하여 Percoll density gradient법으로 정자를 분리·사용하였다. 15 ml의 원심분리관의 아래층에는 90% Percoll 2 ml을 넣고 그 위층에는 45%의 Percoll 2 ml을 조심스럽게 두 층이 섞이지 않도록 처리한 다음, 용해된 정액을 그 위층에 올려 놓는다. 500 g에서 20분 동안 원심분리한 후, 상층액은 버리고 2 ml의 Sp-TALP를 첨가하여 350 g에서 5분 동안 원심분리를 하였다. Sp-TALP로 정자를 세척한 다음, 수정능 획득을 유도하기 위하여 BSA(6 mg/ml), caffeine(5 mM) 및 heparin(10 µg/ml)이 첨가되어 있는 체외수정용 배양액(Fert-TALP)을 첨가하여 39℃, 5% CO₂ incubator에서 10~15분 동안 정치하였다.

24시간 동안 체외성숙 배양액에서 난구세포가 확장된 체외성숙된 난자는 pipette으로 난구세포를 부분적으로 제거하였다. 난구세포가 부분적으로 제거된 난자는 체외수정용 배양액으로 옮기기 전 체외수정용 배양액(Fert-TALP)로 3~4회 세척하였으며, 체외성숙된 난포란을 20~25개가 들어 있는 체외수정용 배양액 소적(50 µl)에 정자를 분주하였다. 정자의 최종농도가 1~2 × 10⁶ sperms/ml이 되도록 농도를 조절하여 22~24시간 동안 39℃, 5% CO₂ incubator에서 체외수정을 유도하였다.

4. 수정란의 체외배양

체외수정 22~24시간 후 zygote를 회수하여 BS-A가 첨가된 TL-Hepes 배양액으로 3~4회 세척한 후, 50 µl의 TCM-199 소적에 25~30개의 수정란을 난구세포와 공동배양 또는 체외수정 후 7~9일 동안 배양하여 배반포 수정란으로 발달을 유도하였다. 난구세포의 단층형성은 수정후 22~24시간째 난자를 세척할 때, 난구세포를 미세소적에서 pipette으로 난구세포를 제거하여 petri dish 바닥에서 단층형 형성하도록 유도하여 체외배양에 이용하였다. 배양액은 48시간마다 신선한 배양액으로 교환하였다.

결과 및 고찰

5. 수정란의 이식 및 임신감정

수정란의 수송은 선발된 수정란을 10% FBS가 첨가된 D-PBS가 들어 있는 0.25 ml의 straw에 장착하여 풀이 straw내에 들어가지 않도록 20 ml의 시험관에 담아서 운반하였다. 수정란은 온도충격을 줄이기 위하여 37~39℃가 유지될 수 있는 보온병에 담아 2~3 시간 이내의 거리에 있는 이식지역으로 수송·이식하였다.

수정란은 발달단계와 일령을 구분한 다음, 2개의 수정란을 비외과적 방법으로 이식하였다. 수란우의 제 1,2 미추사이에 2% lidocain 5 ml를 주사후 마취가 확인된 다음, 수정란이식 주입기에 straw를 장착하고 주입기의 오염을 방지하기 위하여 sheath를 씌웠다. 질을 통과한 다음 자궁경관 입구에서 비닐 커버를 질 방향으로 후퇴시키고 sheath와 주입기만을 자궁경관으로 통과시켰다. 황체축 또는 황체반대측 자궁각 상단에 수정란을 이식하였다. 수정란의 이식은 7~8일전 인공수정 후 한우 체외수정란을 이식을 하거나, 발정 후 7~8일째에 2개의 수정란을 이식하는 두 가지 방법을 이용하였다.

임신 여부는 수정란이식 후 21일경에 발정이 재귀되지 않는 개체를 1차적으로 확인한 다음, 약 60~90일경에 직장점사법으로 확인하였다.

6. 분만관리 및 산자 조사

임신이 확인된 소는 수정에 의한 임신우와 동일한 방법으로 관리를 하였다. 수정란이식우는 일반소와 함께 사육하면 유산 등의 원인이 될 수 있으므로 구분·격리하여 사육하면서 관찰하였다. 분만일이 가까워 오면 축사를 깨끗이 정리 정돈하고 쾌적한 환경에서 분만할 수 있도록 하였다. 분만된 송아지는 암·수를 확인한 다음, 저울로 송아지의 체중을 측정하였다.

7. 통계학적 분석

실험결과와 통계적 분석은 SAS package를 이용하여 실시하였으며, GLM(General Linear Model) Procedure를 적용하여 각 요인의 Least square means를 구하여 요인간의 유의성을 검정하였다.

1. 한우 체외수정란 이식에 따른 수태율

체외수정 후 난구세포와 공배양하여 배반포로 발달한 7, 8, 9일째의 한우 체외수정란을 Holstein과 한우에 이식 또는 인공수정 후 수정란을 이식한 결과, 수태율은 Table 1에서 보는 바와 같다. 8, 9일째의 배반포 수정란을 이식한 수태율은 각각 18.2와 8.3%로서 7일째의 수정란에 비해 수태율 43.5%보다는 낮았으며, 7, 8 일째의 수정란과 8, 9 일째의 수정란은 유의적인 차이가 인정되지 않았다.

Hasler 등(1995)은 체외수정 후 6, 7일째의 배반포 수정란을 이식한 결과, 임신 40일령에 각각 48, 42%의 수태율을 얻었으며, 임신 120 일령에는 각각 52, 60%의 높은 쌍태율을 보고하였다. Moson 등(1992)은 CR1aa 배양액 또는 CR1aa 배양액과 난관상피세포에서 체외수정란을 배양하여 7, 8일째의 배반포 수정란을 이식했을 때 수태율이 각각 41와 66%로서 7일째의 배반포 수정란이 높은 수태율을 나타내었다고 하였다. 본 연구의 결과에서 7 일째의 배반포 수정란보다 8, 9 일째의 배반포 수정란이 수태율이 낮은 것은 다른 보고자들과 동일하였으나(Hasler 등, 1995; Monson, 등, 1992), 수태율은 낮은 경향이 있었다.

Hasler 등(1995)은 1, 2등급의 신선 수정란(수정 후 7일)에서 수태율이 59와 45%였으며, 8 일째의 1, 2등급 배반포 수정란은 각각 48, 30%의 수태율을 보고하였으며, Agca 등(1998)은 체외수정 후 7, 8, 9일째의 배반포 수정란을 초기 배반포 중기 배반포, 확장 배반포로 구분하여 수란우에 이식 또는 인공수정 후 이식한 결과, 수태율은 각각 15.4, 44.0 및 10.5%로서 중기 배반포는 확장 배반포보다 유의적으로 높은 수태율을 보였다($P < 0.05$).

Hasler 등(1995)은 수정 후 7일과 8일째의 수정란 발달이 초기 배반포일 경우 56과 33%, 중기 배반포일 경우 41과 31%의 수태율을 얻어, 수정란의 질이 수태율에 중요한 영향을 미친다고 하였다. 체내수정란의 경우에도 확장·부화 배반포보다 초기·중기 배반포 수정란을 이식했을 때 높은 수태율을 나타내었다.

수란우에 인공수정 후 수정란이식을 하거나, 발

Table 1. Comparison of pregnancy rate by factors following transfer of *in vitro* produced embryos of Han-woo

Items	No. of recipients	
	Transferred	Pregnant(%)
Age of embryo*(day)		
7	23	10(43.5) ^a
8	22	4(18.2) ^{ab}
9	12	1(8.3) ^b
Classification of blastocysts **		
EB	13	2(15.4) ^{ab}
B	25	11(44.0) ^a
ExB	19	2(10.5) ^b
Presence / Absence of AI prior to ET		
ET [†]	21	6(28.6)
AI+ET [‡]	36	9(25.0)
Total	57	15(26.3)

^{a,b}Values with different superscripts in the same column were significantly different($P < 0.05$).

*IVP embryos were transferred after estrus or artificial insemination.

**EB: early blastocyst; B: blastocyst; ExB: expanded blastocyst

[†]ET : recipients transferred 2 embryos into uterine ipsilateral horn.

[‡]AI+ET : recipients previously inseminated on the next day of estrus and transferred 2 embryos into uterine contralateral horn to the CL on day 7~8 days.

정 7~8일 이후에 수정란 2개를 이식한 결과, 발정 7~8일 이후에 수란우의 황체축 자궁각에 2개의 수정란을 이식했을 때 수태율은 28.6%였으며, 인공수정 7~8일 이후에 수정란 2개를 추가적으로 이식한 경우의 수태율은 25.0%로 나타났다.

체외수정란만을 수란우에 이식했을 때의 수태율은 52.6%(10/19) 이었으며, 인공수정 후 수정란을 이식했을 경우에는 수태율이 69.6%로서 단순히 수정란만을 이식하는 것보다 인공수정으로 임신한 수란우에 이식하는 것이 수태율이 높았다고 하였다 (Suzuki 등, 1994). Broadbent와 Dolman (1989)은 수란우에 인공수정 후 1개의 육우 수정란을 추가로 이식하여 64%의 수태율을 얻었으며, 임신우중 45%가 쌍태였다고 하였다.

본 연구의 결과는 인공수정 후 수정란을 추가적으로 이식하거나, 발정 후 수정란을 이식했을 때 수태율에는 유의적인 차이가 없었으며, 다른 연구자들에 비해 수태율이 낮게 나타났다(Suzuki 등, 1994).

Table 2. Effect of parity of recipients on pregnancy following transfer of IVP bovine embryos

Parity of recipients	No. of recipients	
	Transferred	Pregnant(%)
Heifer	13	2(15.4)
Cow		
1~2	20	6(30.0)
3~4	11	3(27.3)
5≤	1	0(0)
Total	45	11(24.4)

2. 수란우의 산차가 수태율에 미치는 영향

체외수정란을 수란우에 이식하거나 인공수정 후 이식하였을 때, 수란우의 산차에 따른 임신 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. 체외수정란 이식시 수란우의 산차가 1~2산일 때 30.0%의 수태율로 가장 높았으며, 미경산우에서는 15.4%, 3~4산에서는 27.3%의 수태율을 나타내었다.

Putney 등(1988)은 육우에서는 경산우가 높은 수태율을 얻는데 유리하며, 유우의 경우에는 미경

산우가 수태율이 다소 높았다고 한다.

미경산우가 쌍태아를 임신하는데 불리하다는 많은 보고가 있는데 이것은 미경산우의 태반영역이 일정한 임신기간 이상 태아를 유지시키지 못하기 때문이라고 한다(Rowson 등, 1971). Broadbent 등(1991)은 수란우의 산차에 따른 수태율은 경산우보다 미경산우가 다소 높았다고 하였다. 그러나, 미경산우는 같은 종의 경산우 보다 쌍태아를 유지할 능력이 현저히 낮다고 한다(Vandeplasseche 등, 1979).

본 연구결과 미경산우보다 1~2산의 경산우를 수란우로 선발하여 수정란이식을 하는 것이 높은 수태율을 얻을 수 있을 것으로 본다. 이러한 결과는 Vandeplasseche 등(1979)과 유사한 경향을 보였으며, Broadbent 등(1991)과는 상반되는 결과를 나타내었다.

3. 수정란 이식 위치에 따른 수태율

수란우의 난소에 황체가 존재하는 자궁각 또는 존재하지 않는 자궁각에 2개의 수정란을 이식하거나 인공수정 후 수정란을 이식한 결과는 Table 3과 같다. 황체가 존재하는 자궁각에서의 수태율은 18.8%였으며, 황체가 존재하지 않는 반대측 자궁각에서의 수태율은 29.3%였다.

Lu와 Polge(1991)는 20℃에서 저장한 체외수정란을 수정 후 황체 반대측 자궁각에 이식했을 때 수태율과 쌍태율이 각각 75와 65%라고 보고했다. Del Campo 등(1983)은 황체측 자궁각과 황체 반대측 자궁각에서 각각 67 및 33%의 수태율을 얻었는데, 황체측 자궁각의 수정란에 의해 황체반대측 자궁각의 수정란이 보호된다고 추정하였다. 이것은 황체측 자궁각에 있는 수정란이 황체퇴행을 방지함으로써 반대측 자궁각의 수정란도 임신이 유지된다고 하였다. Suzuki 등(1994)은 인공수정 후 황체 반대측 자궁각에 2개의 체외 수정란을 이식하여 69.6%,

Table 3. Preganacy rate following embryo transfer into uterine horne ipsilateral or contralateral to the corpus luterum

ET site of uterine horns	No. of recipients	
	Transferred	Pregnant(%)
Ipsilateral	16	3(18.8)
Contralateral	41	12(29.3)

2개의 수정란만을 황체반대측 자궁각에 이식하여 52.6%의 수태율을 얻었다고 하였다. 수정 후 7일령에 황체가 존재하는 자궁각에 1개 혹은 2개의 수정란을 이식하였을 때 각각 49%와 47%의 수태율을 얻었으며 양측 자궁각에 각각 1개의 수정란을 이식했을 경우에는 53%가 수태되었다고 하였다(Reichenbach 등, 1992).

본 연구에서는 황체가 존재하는 자궁각과 황체 반대측 자궁각에 수정란을 이식한 결과, 황체가 존재하는 자궁각(18.8%)보다 반대측 자궁각(29.3%)에서 높은 수태율을 얻어 여러 연구자들(Suzuki 등, 1994)과 유사한 경향을 보였으나, 수태율은 낮게 나타났다.

4. 쌍태 발생율

한우 체외수정란을 Holstein과 한우 암소에 이식했을 때 쌍태 발생율은 Table 4에서 보는 바와 같다. 45두의 유우에서 단태율과 쌍태율은 각각 2.2와 20.0%였으며, 12두의 한우에서는 각각 8.3%의 쌍태율과 단태율을 나타내었다.

Agca 등(1998)은 7일체의 배반포 수정란을 이식하여 이식후 40일경에 단태율 및 쌍태율이 각각 42, 60%라고 보고하였으며, Massip 등(1996)은 42%의 쌍태율을 보고하였다. Lu와 Polge(1991)는 비외과적으로 수정란을 이식하여 77%의 수태율을 얻었으며, 이중 65%가 쌍태였다고 하였다.

Sakakibara 등(1996)은 Holstein과 Japanese

Table 4. Twinning rate of Holstein and Hanwoo cows transferred with two IVP embryos followed by insemination

Recipient	No. of recipients transferred	No. (%) of single	No. (%) of twin
Holstein	45	1(2.2)	9(20.0)
Hanwoo	12	1(8.3)	1(8.3)

black cow에 체내 동결 수정란을 이식한 쌍자 생산 연구에서 각각 41.7, 15.5%로서 Holstein이 쌍태율이 높았다고 하였다. Penny 등(1995)은 2개의 체외 수정란을 비외과적으로 이식하여 분만율이 51.1%였으며, 이중 39.1%가 쌍태라고 보고하였다. 체내와 체외에서 생산한 수정란을 인공수정으로 임신한 수란우에 수정란이식하는 것이 임신하지 않은 수란우에 수정란이식하는 것보다 쌍자를 효율적으로 생산한다고 한다(Suzuki 등, 1994).

따라서 쌍자생산을 목적으로 수정란을 이식할 경우에는 한우는 자궁의 용적이 적기 때문에 일정기간 동안 임신을 유지하는 데 불리한 것으로 생각되기 때문에 Holstein을 수란우로 이용하여 수정란을 이식하는 것이 바람직할 것으로 사료된다

5. 분만을 및 유산율

한우 체외수정란을 57두의 Holstein과 한우 암소에 각각 수정란 이식 또는 인공수정 후 수정란을 이식한 다음 이들의 분만율과 유산율을 조사한 결과는 Table 5와 같다. 57두의 Holstein과 한우중 15두가 임신하였으며, 이 중에서 유산율은 13.3%(2/15), 6.6%(1/15)는 사산을 하였으며, 80%(12/

Table 5. Calving and abortion rates in pregnant cows following transfer of Hanwoo embryos

Parturition status	No. of cows	Percentage
Aborted	2	13.3
Stillbirth	1	6.6
Normal birth	12	80.0
Total pregnant	15	100

Table 6. Calving performance of Holstein and Hanwoo cows following embryo transfer

Species		Sex of calf	Gestation length (days)	Birth weight (kg)	Parturition
Hanwoo	1	F : M	279	24 : 27	Normal
	2	F	284	25	Normal
Holstein	1	F : F	272	30 : 35*	Normal
	2	F : M	274	31* : 20	Normal
	3	F : F	272	23 : 30*	Normal
	4	F : F	238	15 : 18*	Premature

* Holstein calf originated artificial insemination.

15)는 분만을 하였다.

Penny 등(1995)은 단태에서는 6%와 쌍태에서는 19%가 사산을 하였다고 하였다. Agca 등(1998)은 임신 40일령에 유산율 13%중 신선란 이식에 의한 유산율은 9%인 반면에, 동결수정란을 이식했을 때는 유산율이 28%로서 신선란에 비해 동결수정란의 유산율이 아주 높았다고 하였다. 양쪽 자궁각에 수정란을 이식하는 것보다 한쪽 자궁각에 두 개의 수정란을 이식할 경우 유산율이 높은 것은 동일한 자궁에서 2두의 태아가 서로 경쟁하면서 발육하기 때문이라고 하였다(Massip 등, 1996; Tachikawa 등, 1993). Schmidt 등(1996)은 수정란이식에 의한 사산율이 14%로써 인공수정시 7~8%, 다배란수정란 이식(MOET)에 의한 사산율 2%보다 높다고 하였는데, 이와 같이 수정란이식에 의한 사산율이 높은 원인은 태반분엽의 수가 감소한 것과 관련이 있다고 주장하였다(Farin과 Farin, 1995). 유산율이 한쪽 자궁각(3.0%) 또는 양쪽 자궁각(6.0%)에 1개의 수정란을 이식하는 것보다 한쪽 자궁각에 2개의 수정란을 이식했을 때(20%)가 높았다(Reichenbach 등, 1992). Hasler 등(1995)은 TCM-199 배양액에서 배양한 수정란을 이식한 결과 11%가 유산되었으며, 체내 수정란을 이식한 연구에서는 이식 후 2~7개월 사이에 5.3%(King 등, 1985), 2~6개월 사이에는 4.7%가 유산하였다고 한다(Hasler 등, 1987).

6. 임신기간과 체중

한우와 Holstein에 수정란이식 또는 인공수정후 한우 체외수정란을 이식한 결과는 Table 6과 같다. 한우 쌍태(암:수)와 단태(암) 송아지를 분만한 한

우의 임신기간은 각각 279과 284일이었고, 체중은 쌍태의 경우 24와 27kg, 단태는 25kg이었다. 단태를 분만한 수란우보다 쌍태를 분만한 소의 임신기간이 한우의 경우에 5일 정도 임신기간이 짧은 경향이 나타났다. 단태한우와 Holstein 송아지를 분만한 Holstein의 임신기간은 암송아지를 분만했을 때는 각각 272, 274 및 272일이며 238일경에 조산한 수란우도 있었다. 체중은 각각 30와 35kg, 31와 20kg 및 23와 30kg였으며 조산한 쌍태 송아지의 체중은 15와 18kg였다. 수란우가 한우인 경우, 단태보다 쌍태분만의 경우 임신기간이 5일 정도 짧은 경향을 나타내었으며, Holstein도 정상적인 임신기간보다 쌍태일 경우에 5~7일 정도 짧았다. Holstein에서 쌍태분만의 경우 체중이 한우 송아지는 각각 20와 30kg 였으나, Holstein 송아지는 30, 31 및 35kg 으로서 정상적인 체중에 미달되었다.

Sinclair 등(1994)은 인공수정하여 태어난 송아지보다 체외수정란을 이식하여 태어난 송아지의 체중이 평균적으로 7kg 정도 무겁다고 하였으며, Farin 등(1994)은 체내수정란을 이식하여 태어난 송아지보다 체외수정란을 이식하여 태어난 송아지의 체중이 3kg 정도 무겁다고 한다. 양의 수정란도 소의 경우와 비슷한 경향을 보였는데, 체외수정된 수정란을 양의 난관에서 배양하면 정상적인 임신기간과 체중이 유지되었다고 하였으며, 체외배양액에 BSA를 첨가하여 수정란을 배양하면 정상적인 체중이었으나, HSA가 첨가된 배양액에서 배양하면 과체중의 양이 태어났다고 한다. 이는 수정란의 세포질에 분포되어 있는 다량의 lipid가 체외배양 과정 중에 태아의 발달에 영향을 미치기 때문이라고 한다 (Thompson 등, 1994).

본 연구의 결과에 의하면, 7, 8째의 초기 또는 중기 배반포 수정란을 1~2산의 경산우에 이식하는 것이 높은 수태율을 얻을 수 있으며, 쌍태를 유기하기 위해서는 한우보다는 Holstein을 수란우로 이용하여 체외수정란을 이식하는 것이 효과적일 것으로 사료된다.

적 요

본 연구는 수정란이식기법을 개선하여 수정란 이

식을 활성화하고, 한우 수정란의 이식으로 쌍태를 유기하여 송아지 생산비를 절감하고, 농가의 대외 경쟁력을 제고하고자 실시하였다.

도축장에서 채취한 난소에서 미성숙 난자를 채란하여 10% FBS가 첨가된 TCM-199에 LH(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), FSH(35 $\mu\text{g}/\text{ml}$), estradiol-17 β (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)가 첨가된 체외성숙배양액에서 24시간 동안 배양후, 동결정액을 이용하여 체외수정배양액(Fert-TALP)에서 체외수정을 유도하였다. 수정이 확인된 수정란은 50 μl 배양액에 25~30개의 수정란을 난구세포와 9일 동안 공배양하였다. 7, 8, 9일째의 배반포 수정란을 각각 초기 배반포, 중기 배반포, 확장 배반포로 구분하여 한우, Holstein에 수정란을 황체가 존재하는 자궁각이나 반대측 자궁각에 이식하거나, 인공수정 후 수정란을 각각 이식한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 체외수정 후 7, 8, 및 9일째의 수정란(배반포)을 이식하여 각각 43.5, 18.2 및 8.3%의 수태성적을 얻었다. 7일째의 배반포기 수정란은 9일째의 배반포기 수정란보다 유의적으로 높은 수태율을 보였으나($P < 0.05$), 초기 배반포, 배반포, 확장 배반포를 각각 이식했을 때 초기 배반포(15.4%)에 비하면 배반포(44%), 확장 배반포(10.5%)는 수태율의 유의적인 차이는 없었으나, 확장 배반포보다는 배반포의 수태율이 유의적으로 높았다($P < 0.05$).
2. 체외수정 후 7~9일째의 배반포기 수정란을 Holstein에 발정 후 또는 인공수정 후 7~8일째에 이식했을 때 수태율은 각각 28.6 및 25.0%였다.
3. 수정란 이식시 산차에 따른 수태율은 미경산우 15.4%, 1~2산 30%, 3~4산 27.3% 이었다.
4. 한우 체외수정란을 황체가 존재하는 자궁각 또는 반대측 자궁각에 이식했을 경우, 18.8 및 29.3%가 수태되어, 황체가 존재하는 자궁각보다는 반대측 자궁각에서 다소 높은 수태율을 보였다.
5. 쌍태를 유기하기 위하여 한우 체외수정란을 한우 또는 Holstein에 이식하거나 인공수정 후 이식했을 때, 쌍태율은 각각 20.0 및 8.3%로서 한우보다는 Holstein에서 높은 쌍태율을 보였

다. 따라서 쌍태유기를 위한 수란우로는 한우보다는 Holstein이 효과적일 것으로 사료된다.

6. 57두의 한우 및 Holstein에 수정란이식 또는 인공수정 후 수정란을 이식하여 15두가 수태되었다. 15두의 임신우중에서 13.3%가 유산, 6.6%가 사산을 하였으며, 80.0%가 정상적으로 분만하였다.

이상의 결과를 요약하면, 7, 8째의 초기 또는 중기 배반포 수정란을 1~2산의 수란우에 이식하는 것이 높은 수태율 얻을 수 있으며, 쌍태를 유지하기 위해서는 한우보다는 Holstein을 수란우로 이용하여 체외수정란을 이식하는 것이 효과적일 것으로 사료된다.

참고문헌

- Agca Y, Monson RL, Northy, DL, Abas Mazani O, Schaefer, DM and Rutledge JJ. 1998. Transfer of fresh and cryopreserved bovine embryos: normal calving, birth weight and gestation length. *Theriogenology*, 50:147-162.
- Anderson GB, Cupps PT, Drost M, Horton MB and Wright Jr, RW. 1978. Induction of twinning in beef heifers by bilateral embryo transfer. *J. Anim. Sci.*, 46:449-452.
- Boland MP, Crosby TF and Gordon I. 1976. Birth of twin calves following a simple transcervical non-surgical embryo transfer. *Vet. Rec.*, 99:274-275.
- Boland MP and Gordon I. 1978. Twinning in lactating Friesian cows by nonsurgical egg transfer. *Vet. Rec.*, 103:241.
- Broadbent PJ and Dolman DE. 1989. Twinning cattle by embryo transfer. In: Phillips, C.J. C. (ed.). *New techniques in Cattle Production*. Butterworths, London, 238-239.
- Broadbent PJ, Stewart M and Dolman DE. 1991. Recipient management and embryo transfer. *Theriogenology*, 27:125-139.
- Del Campo MR, Rowe RF, Chaicharen D and Ginther OJ. 1983. Effect of the locations of embryo and corpus luteum on embryo survive in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.*, 23:303-308.
- Farin PW and Farin CE and Yang L. 1994. *In vitro* production of bovine embryos is associated with altered fetal development. *Theriogenology*, 41:193(Abstr.).
- Farin PW and Farin CE. 1995. Transfer of bovine embryos produced in vivo and *in vitro*: Survival and fetal development. *Biol. Reprod.*, 52:676-682.
- Hasler JF, McCauley AD, Lathrop WF and Foote RH. 1987. Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryos transfer program. *Theriogenology*, 27:139-168.
- Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, Mower SA, Neely B, Schultey LS, Stockes JE and Trimmer SA. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent results. *Theriogenology*, 43:141-152.
- Isogai T, Nakanoshi T, Sasaki K and Tagami M. 1991. Twin pregnancy and births in cattle induced by FSH and PGF or PGF-analogue treatment. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 37:105-113.
- King KK, Seidel Jr, GE and Elsdon RP. 1985. Bovine embryo transfer pregnancies. I. Abortion rates and characteristics of calves. *J. Anim. Sci.*, 61:747-762.
- Lu KH and Polge C. 1991. Pregnancy and twinning rates after transfer of IVF embryos to the bred recipient. *Proc. 7th Con. European Embryo transfer Association(Cambridge)*, 164.
- Massip A, Mermulod P, Van Langendonck A, Reichenbach HD, Lonergan P, Berg U, Carolan C, De Roover R and Brem G. 1996. Calving outcome following transfer of embryos produced *in vitro* in different conditions. *Theriogenology*, 44:1-10.
- Monson R, Northey DL, Gottfredson R, Peschel

- DR, Rutledge JJ, Schaefer DM. 1992. Pregnancy rates of *in vitro* produced bovine embryos following non-surgical transfer. *Theriogenology*, 37:261(Abstr.).
- O'Farrell K, Mee J, Murphy J and Reitsman P. 1990. Induced twinning in dairy cows. *Farm and Food. Research*, 21:25-27.
- Reevers JJ, Chang CF, Deavila DM, Johnson HE and Roberts AJ. 1989. Vaccines against endogenous hormones: a possible future tool in animal production. *J. Dairy Sci.*, 72: 3363-3371.
- Reichenbach DR, Leibrich J, Breg U and Brem G. 1992. Pregnancy rates births after unilateral or bilateral transfer of bovine embryos produced *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 95:363-370.
- Penny CD, Lowman BG, Scott NA, Voelkel S and Davies DA. 1995. Management aspects of induced twinning in beef suckler cows using *in vitro* fertilised embryos. *Vet. Rec.*, 136:506-510.
- Putney DJ, Thatcher WW, Drost M, Wright JM and De Lorenzo MA. 1988. Influence of environmental temperature on reproductive performance of bovine embryo donors and recipients in the southwest region of the United States. *Theriogenology*, 30:905-922.
- Rowson LEA, Lawson RAS and Moor RM. 1971. Production of twins in cattle by egg transfer. *J. Reprod. Fertil.*, 25:261-268.
- Sakakibara H, Kudo H, Boediono A and Suzuki T. 1996. Induction of twinning in holstein and Japanese black cows by ipsilateral frozen embryo transfer. *Anim. Reprod. Sci.*, 44: 203-210.
- Schmidt M, Greve T, Avery B, Beckers JF, Sulon J and Hansen HB. 1996. Pregnancies, calves and calf viability after transfer of *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology*, 46:527-539.
- Sinclair KD, Bradbent PJ, Dolman DF, Taylor AG and Reaper JF. 1994. *In vitro* produced embryos as a means of achieving pregnancy and improving productivity in beef cow. *Theriogenology*, 41:294(Abstr.).
- Sreenan JM, Diskin MG and McDonagh T. 1981. Induction of twin-calving by non-surgical embryo transfer; A field trial. *Vet. Rec.*, 109:77-80.
- Sreenan JM and Diskin MG. 1989. Effect of unilateral or bilateral twin embryo distribution on twinning and embryo survival rate in the cow. *J. Reprod. Fertil.*, 87:657-664.
- Suzuki T, Sasaki Y, Ishida T, Matsuda S, Miura H and Itoh K. 1989. Induction of twinning in dairy or crossbred heifers by ipsilateral frozen embryo transfer. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 51: 554-559.
- Suzuki T, Geschi M, Yonai M and Sakaguchi M. 1994. Effects of method of embryo production and transfer on pregnancy rate, embryo survival rate, abortion and calf production in beef cows. *Theriogenology*, 41:309(Abstr.).
- Tachikawa S, Otoi T, Kondo S, Machida T and Kasai M. 1993. Successful vitrification of bovine blastocysts, derived from *in vitro* maturation and fertilization. *Mol. Reprod. Dev.*, 34:266-271.
- Thompson JG, Gardner DK, Pugh PA, McMillian WH and Tervit HR. 1994. Lamb birth weight following embryo transfer is affected by the culture system used for pre-elongation development of embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 13:125(Abstr.)
- Vandeplassche M, Bufaye R and Boulters R. 1979. The twin capacity of the uterus in heifers and cows. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 86:470-473.

(접수일 : 2000. 4. 1 / 채택일자 : 2000. 4. 24)