韓國受精卵移植學會誌(2005) 第 20 卷 第 2 號
Korean J. Emb. Trans. (2005) Vol. 20, No. 2, pp. 185~190

한우의 반복 과배란 및 산차가 수정란 생산에 미치는 영향

최선호† · 류일선 · 손동수 · 조상래 · 한만희 · 김현종 · 최창용 · 김영근
농촌진흥청 축산연구소 가축유전자원시험장

Effects of Multiple Superovulation and Parity on Embryo Production in Hanwoo

S. H. Choi†, I. S. Ryu, D. S. Son, S. R. Cho, M. H. Han, H. J. Kim, C. Y. Choe and Y. K. Kim

Animal Genetic Resources Station, NLRI, RDA

SUMMARY

This study was performed to investigate the effects of multiple superovulation and parity on embryo production in Hanwoo cows. Donors were superovulate 4 times 1~2 months interval and inserted CIDR plus (with the capsule of estradiol benzoate 10 mg) on Day 10 from standing heat for 9 days and injected 2.5 ml FSH (Antorin R-10) 2 times in a day on 6th day to 10th day from insertion of CIDR and the doses of FSH were decreasing 0.5 ml on every 2 times. On 3th day of FSH injection, 25 ml $PGF_2\alpha$ were injected i.m. and on 4th day, CIDR was removed. After 2 days from removing CIDR, AI was performed 2 times 12 hour apart with 2 straws of Korean Proved frozen Semen and simultaneously 200 ug/ml GnRH was injected and embryos were recovered on 7th day from AI. The response rates of superovulated donors were 85.7%, 90.5%, 62.5%, 100% from 1 to 4 times of superovulation, respectively. There were significant differences among No. of superovulation times (P<0.05). The results of transferable embryos were 3.7, 3.4, 3.4, 5.7 from 1 to 4 times of superovualtion, respectively. There were no differences among No. of superovulation times. The results of transferable embryos were 2.5, 3.0, 5.3, 3.0, 3.4 form heifer, first born to 4 the born, respectively. There were significant differences among the parities of donors (P<0.05). These results suggested that even 4 times of superovulations of Hanwoo donors could be able to recover transferable embryos, it might be used the donors maximally and improved the adaptation of embryo transfer to farms safely.

(Key words : multiple superovulation, parity, embryo, Hanwoo)

서 론

수정란 이식 기술은 고능력의 암컷으로부터 많은 양의 수정란을 생산하는 것이 기본이며, 그를 위해서는 공란우를 효율적으로 이용하는 것이 주요 관건이라 하겠다. 현재까지의 연구 결과로는 정상적인 발정주기를 가진 분만의 경력이 있는 경산우의 경우가 미경산우에 비하여 더욱 질 좋은 수정란의 생산성을 가지고 있다고 보고되고 있으며, 대개 공란우의 경제 수명은 3산차를 전후하여 최성기를 갖게 되며, 그 이후에는 난소 기능의 저하 등이 원인이 되어 공란우로서의 기능을 잃게 되는

† Correspondence : E-mail : sunho@rda.go.kr

경향이 많았다. 또한 공란우를 얼마간의 간격으로 수정란을 회수하여야 하는 것에 대한 연구가 많이 수행되어 왔으나, 연구자들에 따라 그 결과에 있어서 많은 차이를 보이는 것으로 나타나고 있다. 공란우로부터 안정적으로 많은 수정란을 생산하기 위해서는 유우나 육우 등에 따른 공란우의 축종(Alvarez 등, 2005; Leroy 등, 2005), 공란우의 사양관리(Nolan 등, 1998; Bader 등, 2005), 투여 호르몬의 종류 및 투여량(Martinez 등, 2004; Moreira 등, 2002; Milalot 등, 2003; Pawlyshyn 등, 1986; 김 등, 1997; 임 등, 1997), 과배란 반응의 차이(Adams 등, 1992; Guibault 등, 1991; Onuma와 Foote, 1970), 수정란 생산량의 차이(Greve 등, 1995; Merton 등, 2003), 그리고 채취 방법 (Satori 등, 2003) 등 여러 조건을 적절하게 이용하여야 하며, 이러한 조건을 잘 이용한다고 하여도 커다란 차이를 보이고 있어 산업적인 이용은 요원한 실정이다. 또한 멸종 위기의 동물(Wildt 등, 1992)들로부터 유전자원의 보존을 위하여 수정란의 안정적인 생산은 필수적이라 하겠다. 따라서 본 연구는 한우에 있어서 효율적인 수정란 생산을 위하여 반복 과배란을 유도하고, 미경산 및 1~4산차의 경산우를 과배란 처리하여 수정란의 생산성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 공시축

공란우는 축산연구소 가축유전자원시험장에서 사육하고 있는 정상적인 발정주기를 나타낸 한우 미경산 및 경산우 42두를 공시축으로 이용하여 과배란 처리에 이용하였으며, 사육은 한우 사양표준(2002)에 준하여 사료를 급이하였고, 미네랄 블록 등은 자유 급이하였다.

2. 공란우의 과배란 처리 및 인공수정

공란우는 직장 검사로 생식기 상태를 검사하여 양호한 개체를 선정하여 1~2개월의 간격으로 4회까지 과배란을 유도하였다. 발정 발현 10일째에 9일간 CIDR를 질내에 삽입하였으며, CIDR는 estradiol benzoate 10mg(0.5ml)의 캡슐이 부착된 것이었으며, CIDR 삽입 6일째에 FSH(Antorin R10, Kawasaki Pharm, Japan)를 2.5ml (2AU=1.0ml)) 2회를 주입하고, 0.5 ml 감량으로 12시간 간격으로 4일간 반복 투여하였으며, 5회째에 $PGF_2\alpha$ 25mg (Lutalyse, Upjohn, USA)을 주사하였고, 7회째에 CIDR를 제거하였다. 공란우 발정발현 12시간 후 KPN 정액 2straw를 인공수정 및 GnRH(Conceral, Upjohn, USA) 200 μg을 근육주사하였으며, 12시간 후 정액 2straw를 재차 인공수정하였다.

3. 수정란 회수

공란우를 인공수정 후 6~8일에 2% lidocaine 5 ml로 경막외마취 후 FBS 2%가 함유된 D-PBS 용액으로 Foley catherter를 이용하여 자궁경관경유법으로 수정란을 회수하였다. 자궁으로부터 관류된 배양액은 embryo collector(FHK, Japan)로 수정란이 회수되도록 하였으며, 실체현미경 하에서 수정란을 관찰 및 채취하였다.

4. 수정란의 평가

회수된 채란액을 실체현미경 하에서 수정란을 회수하여 IETS(International Embryo Transfer Society) Manual(Stringfellow와 Seidel, 1990)의 평가방법에 따라 수정란의 등급과 발육단계를 구분하였다. 회수된 수정란 중 미세한 결함을 가진 수정란(1등급)과 소수의 돌출된 할구와 변성세포가 존재하는 수정란(2등급)을 동결가능 수정란으로 분류하였다.

5. 통계처리

시험결과는 과배란처리 횟수에 따른 수정란의 회수율 및 이식가능 수정란의 회수율에 대한 결과는 SAS 프로그램을 이용한 Duncan의 다중검정법을 이용하여 실시하였고, 산차별 회수수정란은 LSD를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 한우에 있어서 과배란처리 횟수에 따른 반응율

한우에 있어서 과배란 처리 횟수에 따른 공란우의 반응율과 처리 후의 수정란 회수율은 Table 1과 같다. 공란우 반응율에 있어서 1회 처리시 회수가

Table 1. The results of donor response on numbers of repeat superovulation

No. of superovulation	No. of cows treated	No. of cows for		
		Embryo recovered(%)	Non-recovered	Non-response
1	42	36 (85.7)[a]	5	1
2	21	19 (90.5)[a]	0	2
3	8	5 (62.5)[b]	1	2
4	3	3 (100.0)[a]	0	0

[a,b] Different superscripts within the column mean significant difference ($P<0.05$).

불가능한 소가 6두였으며, 회수 가능한 소는 85.7%였고, 2회 처리시 무반응두수는 2두였고, 수정란 회수 가능 두수는 90.5%를 나타냈다. 3회 처리시 무반응 및 회수 불능 소는 3두였으며, 회수 가능 두수는 62.5%를 보여 다소 떨어지는 경향을 나타내었고, 4회 처리에서는 무반응 두수가 없었고, 모두 수정란 회수가 가능함을 나타내었다. 처리횟수를 3회 처리시 다소 떨어지는 경향을 보였으며, 4회 처리시에는 100%를 나타냈으나, 처리두수가 적어서 유의적인 차이를 확인할 수 없었다. Costa 등(2001)은 경산우에 FSH를 투여한 결과 80%의 과배란 반응율을 나타냈으며, 동량의 FSH만을 3일 투여하였을 경우는 FSH를 감량법으로 4일간 투여한 경우가 더 좋은 반응율을 보였으며, 수정란의 회수에 있어서도 더 좋은 것으로 나타났다. 또한 Satori 등(2003)은 FSH 단독으로는 반응율에 좋은 효과를 낼 수 없으므로, FSH 투여 개시 후 2~3일째에 $PGF_2\alpha$를 투여함으로써 반응율이 높다고 한 보고도 있었다. 이는 본 실험에서 FSH 투여 3일째에 $PGF_2\alpha$를 투여한 것과 같은 결과로서 FSH를 이용한 난포 형성뿐만 아니라 부황체가 형성되었을 가능성을 미리 제거함으로써 난포 형성에 좋은 환경을 만들게 될 것이다. 그 밖에 Lindsell 등(1986)은 FSH와 LH의 비율에 따른 반응율도 다르게 보고한 바 있으며, Mapletoft 등(1988)에 의하면 FSH도 제조회사에 따라 제조방법 및 호르몬의 출처에 따라서 많은 차이를 보이므로 FSH에 대한 근본적인 기능에 대하여 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

2. 반복과배란 처리 한우의 수정란 회수

한우 경산우 및 미경산우를 반복 과배란 처리에 의해 채취한 수정란의 회수율은 Table 2와 같다. 1회 처리시에는 9.2개의 수정란을 회수하여 이식가능 수정란은 3.7개를 회수하였고, 2회 처리시에는 9.9개의 수정란을 회수하여 이식가능 수정란은 3.4개를 회수하였으며, 3회 처리시에는 7.0개를 회수하여 이식 가능 수정란은 3.4개를, 4회 처리시에는 10.7개를 회수하여 5.7개의 이식 가능 수정란을 채취할 수 있었다. 과배란 처리에 따른 수정란의 회

Table 2. The results of embryo recovery on numbers of repeat superovulation

No. of superovulation	No. of cows treated	No. of embryos			
		Transferable	Degenerated	Unfertilized	Total
1	36	3.7±3.9	2.4±3.3	3.1±4.5	9.2±4.5
2	19	3.4±4.5	1.3±2.0	5.3±7.5	9.9±8.3
3	5	3.4±2.3	3.0±4.0	1.6±1.5	7.0±4.5
4	3	5.7±8.1	1.0±1.0	4.0±4.0	10.7±4.6

수율 및 이식 가능 수정란의 회수율에 있어서 유의적인 차이를 확인할 수 없었으며, 4회 처리시 약간 회수 수정란 및 이식 가능 수정란이 증가하는 경향을 보였으나, 역시 유의적인 차이를 인정할 수 없었다. Ax 등(2005)은 미경산우를 이용하여서도 미수정란의 발생은 연령에는 많은 영향을 받지는 않으나, 10개월령 이하의 것이 14개월령 이상의 것보다는 많았다고 한 것과 같이 이식 가능 수정란의 생산은 10개월령부터 횟수를 늘려가면서 이용하여도 가능함을 알 수 있다. Satori 등(2003)에 의하면, 홀스타인 미경산에서 본 연구와 동일한 방법으로 과배란처리한 결과 수정란의 회수는 7.1~8.2개였으며, 이식 가능 수정란은 2.7~3.6개 정도를 본 연구의 결과와 유사한 결과를 보였으며, estradiol을 처리한 것이 처리하지 않은 것보다 회수율이 높게 나타났다. 수정란의 회수에 있어서도 총 회수 수정란의 수에 있어서도 커다란 차이가 없었으며, 공란우 두수를 더욱 더 확보하여 더 많은 연구가 필요하다고 하겠다. 이러한 결과는 기존에 3회/년의 과배란 횟수보다 더 많은 처리에 의해서도 공란우를 유용하게 사용하면서 수정란을 정상적으로 생산할 수 있음을 시사한다.

3. 한우 공란우의 산차에 따른 수정란의 회수율

한우 미경산우 및 경산우를 공란우로 산차별 과배란 처리에 의한 수정란의 회수율은 Table 3과 같다. 미경산우를 처리시 6.0개의 수정란을 회수하여, 이식 가능 수정란은 2.5개를 회수하였고, 1산차의 경산우의 처리시 8.7개를 회수하였고, 이식 가능 수정란은 3.0개를 회수하였고, 2산차의 경산우의 처리시 11.4개를 회수하여 5.3개의 이식 가능 수정란을 채취하였고, 3산차의 경우는 9.9개를 회수하여 3.0개의 이식가능 수정란을 회수하였으며, 4산차 이상은 7.6개의 수정란을 회수하여 3.4개의 이식가능 수정란을 회수하였다. 산차별 수정란의 회수율은 6.0~11.4개를 회수하였으나, 2산차의 경우가 유의적으로 높은 회수율을 보였고, 산차에 관계없이 회수 수정란의 약 반 정도가 이식 가능 수정란으로 나타났으나, 1산차 및 3산차에서 약간의 차이를 보였다. Lafri 등(2002)은 젖소 경산우를 이용하여 본 연구와 동일한 과배란처리에 의해 5.6개의 이식가능 수정란을 얻어 본 연구 결과의 2산차와 비슷하거나 약간 높은 결과를 보였으며, 과배란처리시 $PGF_2\alpha$의 투여와 CIDR의 처리에서 차이를 보이지 않는다고 하였다. 이는 $PGF_2\alpha$의 주사 후 42시간에, CIDR의 제거후 32시간에 LH의 peak가 나타나며, 이는 미경산우의 경우가 경산우에 비하여 반응율이 적게 나타나며, 이러한 결과는 경산우에 황체 퇴행을 유도하는 것이 LH surge의 동기화를 원활하게 한다고 하였다(Greve 등, 1995). 따라서 과배란처리시 CIDR 및 $PGF_2\alpha$의 병용처리시 경산우의 경우가 미경산우에 비하여 수정란의 생산율도 높음을 본 연구 결과가 증명한다고 하겠다.

적 요

본 연구는 소에 있어서 다량의 수정란을 생산하여, 고능력의 유전인자를 조기에 확산할 수 있도

Table 3. The results of embryo recovery on parities in Hanwoo cows superovulated

No. of parity	No. of cows treated	No. of embryos			
		Transferable	Degenerated	Unfertilized	Total
0	2	2.5±1.5[a]	2.0±1.0	1.5±1.5	6.0±1.0
1	9	3.0±3.2[b]	2.6±3.2	3.1±3.8	8.7±4.3
2	10	5.3±5.2[a]	0.8±1.9	5.3±6.7	11.4±7.8
3	6	3.0±2.5[b]	3.7±5.8	3.2±3.9	9.9±8.4
4	9	3.4±4.1[a]	3.1±2.7	1.1±2.0	7.6±5.4

[a,b] Different superscripts within the column mean significant difference ($P<0.05$).

록, 한우 공란우의 반복 과배란을 유도하여 안정적이고 효율적인 수정란 생산을 목적으로 실시하였으며, 그 결과는 다음과 같다.

1. 한우 경산우 및 미경산우를 4회 반복적으로 과배란 처리하였을 때, 수정란 채란이 가능한 공란우는 85.7%, 90.5%, 62.5%, 100%였으며, 3회 처리시 다소 낮아, 약간의 유의차가 인정되었다($P< 0.05$).
2. 한우 경산우 및 미경산우를 4회 반복적으로 과배란 처리하였을 때, 수정란 회수는 각각 9.2개, 9.9개, 7.0개, 10.7개였으며, 이식 가능 수정란은 3.7개, 3.4개, 3.4개, 5.7개였다. 반복 과배란 처리에 의한 이식 가능 수정란의 회수율은 유의차가 인정되지 않았다.
3. 한우 공란우의 산차에 따른 수정란의 회수는 미경산우 6.0개였으며, 1~4산까지는 각각 8.7개, 11.4개, 9.9개, 7.6개였으며, 이식 가능 수정란은 2.5개, 3.0개, 5.3개, 3.0개, 3.4개로 나타났으며, 미경산 및 1산차에서 약간 낮은 수준이었다($P<0.05$).

이상의 결과로 한우 공란우는 경산우 및 미경산우를 4회 연속 과배란 처리하여 수정란을 채취하여도 적정량의 수정란을 생산할 수 있었으며, 산차에 의한 수정란회수율에 있어서도 적정량의 수정란을 회수할 수 있으므로, 고능력의 한우 공란우를 알맞은 번식 및 사양관리를 통하여 유전능력을 최대한 이용할 수 있어, 수정란 이식 기술의 산업화를 안정적으로 시행할 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JC and Ginther OJ. 1992. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular wave in heifers. J. Reprod. Fertil., 94:177-188.

Alvarez RH, Gualberto MV, Silva BD, Carvalho JBP and Binelli M. 2005. Effects of inbreeding on ovarian responses and embryo production from superovulated Mantiqueira breed cow. Theriogenology, In Press.

Ax RL, Armbrust S, Tappan R, Gilbert G, Oyarzo JN, Bellin ME, Selner D and McCauley TC. 2005. Superovulation and embryo recovery from peripubertal Holstein heifer. Anim. Reprod. Sci., 85:71-80.

Bader JF, Kojima FN, Wehrman ME, Lidsey BR, Kerley MS and Patterson DJ. 2005. Effects of prepartum lipid supplementation on FSH superstimulation and transferable embryo recovery in multiparous beef cows. Anim. Reprod. Sci., 85:61-70.

Costa LLD, Silva JCE and Silva JR. 2001. Superovulatory response, embryo quality and fertility after treatment with different gonadotrophins in native cattle. Theriogenology, 56:65-77.

Guilbault LA, Grasso F, Lussier JC, Rouillier P and Maton P. 1991. Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of dominant follicle. J. Reprod. Fertil., 9:81-89.

Greve T, Callesen H, Hyttel R and Assey R. 1995. The effects of exogenous gonadotropins. Theriogenology, 43:41-50.

Lafri M, Ponsart C, Nibart M, Durand M, Morel A, Jeanguyot N, Badinant F, De Mari K and Humblot P. 2002. Influence of CIDR treatment during superovulation on embryo production and hormonal patterns in cattle. Theriogenology, 58:1141-1151.

Leroy JLMR, Opsomer G, Vliegher SD, Vanholder T, Goossens L, Geldhof D, Bols PEJ, Kruif AD and Soom AV. 2005. Comparison of embryo quality in high-yielding dairy cows, in dairy heifers and beef cows. Theriogenology, In Press.

Lindsell CE, Rajkumar K, Manning AW, Emery SK, Mapletoft RJ and Murphy BD. 1986. Variability in FSH:LH ratios among batches of commercially available gonadotrophins. Theriogenology Abstr., 25:167.

Mapletoft RJ, Gonzalez A and Lussier JG. 1988.

Superovulation of beef heifers with Folltropin or FSH-P. Theriogenology Abstr., 29:274.

Martinez MF, Kastelic JP and Mapletoft RJ. 2004. The use of estradiol and/or GnRH in a two-dose PGF protocol for breeding management of beef heifers. Theriogenology, 62:363-372.

Molalot JP, Constant F, Dezaux P, Grimard B, Delatang F and Ponter AA. 2003. Estrus synchronization in beef cows: comparison between GnRH+PGF$_2\alpha$+GnRH and PRID+PGF$_2\alpha$+eCG. Theriogenology, 60:319-330.

Merton JS, de Roos APW, Mullaart E, de Ruigh L, Kaal L, Vos PLAM and Dielman SJ, 2003 Factors affecting oocytes quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. Theriogenology, 59:553-597.

Moreira F, Badingga L, Burnley C and Thatcher WW. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. Theriogenology, 57: 1371-1387.

Nolan R, O'Callaghan D, Duby RT, Lonergan P and Boland MP. 1998. The influence of short-term nutrient changes on follicle growth and embryo production following superovulation in beef heifer. Theriogenology, 50:1263-1274.

Onuma H, Hahn J and Foote RH. 1970. Factors affecting superovulation, fertilization and recovery of superovulated ova in prepubertal cattle. J. Reprod. Fertil., 21:119-126.

Pawlyshyn V, Lindsell CE, Braithwaite M and Mapletoft RJ. 1986. Superovualtion of beef cows with FSH-P : A dose response trial. Theriogenology Abstr., 25:179.

Sartori R, Suarez-Fernandez CA, Monson RL, Guenther JN, Rosa GJM and Wiltbank MC, 2003. Improvement in recovery of embryos/ova using a shallow uterine horn flushing technique in superovulated Holstein heifers. Theriogenology, 60:1319-1330.

Wildt DE, Monfort ST, Donoghue AM, Johnston LA and Howard J. 1992. Embryogenesis in conservation biology-or, how to make an endangered species embryo. Theriogenology, 37: 161-184.

김흥률, 김덕임, 박노형, 김창근, 정영채, 윤종택, 전광주. 1997. 한우에서 FSH-P와 super-Ov에 의한 체내수정란 생산에 관한 연구 Ⅱ. 공란우의 조건에 따른 체내수정란 생산에 영향을 미치는 요인. 한국수정란이식학회지, 12:49-56.

임석기, 전기준, 우제석, 장선식, 박준철, 정종원, 윤상보. 1997. 한우에 있어서 FSH-P 투여량과 에너지 수준이 정상수정란의 생산에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지, 12:301-306.

(접수일: 2005. 7. 3 / 채택일: 2005. 8. 12)