

유우의 과배란 처리에 있어서 산유량, 분만 후 처리시기 및 계절이 체내수정란 생산에 미치는 영향

임 광 택

서울대학교 수의과대학 수의산과학 · 생물공학

Effects of Milk Production, Postpartient Days or Seasons on *In Vivo* Embryo Production by Superovulation in Holstein Cows

Kwang Taek Lim

Department of Theriogenology and Biotechnology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Republic of Korea

ABSTRACT

Multiple ovulation and embryo transfer (MOET) has the potential to increase the rates of genetic improvement in cattle. Thus this study was performed to investigate several factors influencing *in vivo* embryo production in Holstein cattle under field conditions. The donors were superovulated with Folltropin-V and PGF₂α combination method. From Day 10 onward, donors were superovulated by i.m., twice daily, administration of 400 mg Folltropin-V given in a series of decreasing doses over a 4-day period: on the first day, 3.5 ml; on the second day, 3.0 ml; on the third day, 2.0 ml; and on the fourth day, 1.5 ml (20 ml in total, equivalent to 400 mg of NIH-FSH-P1). Estrus was induced by i.m. administration of 25 mg prostaglandin F₂α on the sixth and seventh of FSH treatment. Estrus detection was performed twice daily beginning 24 h after the first prostaglandin F₂α injection. Donor cows were artificially inseminated 12 and 24 h after first standing estrus with semen from a proven Holstein sire. Embryos used in this study were recovered Day 7.5 of the cycle (Day 0: first standing estrus).

From 195 superovulated dairy cows, 2,104 eggs were recovered, of which 1,172 were classified as transferable embryos based on morphological evaluation of quality.

The results are summarized as follows:

1. The numbers of recovered and transferable embryos did not significantly differ among the capacity of milk production that were < 10,000 kg/305 days (group 1), 10,000~12,000 kg/305 days (group 2) or > 12,000 kg/305 days (group 3) ($p>0.05$, Table 1).
2. No differences in the numbers of recovered and transferable embryos were found among the donor's postpartient days ($p>0.05$, Table 2).
3. Also, the numbers of recovered and transferable embryos of each superovulation seasons did not significantly differ among the four groups ($p>0.05$, Table 3).

(Key words : superovulation, *in vivo* embryo, postpartient)

서 론

가축 개량을 위한 방법으로 현재까지 널리 보급되어 있는 인공수정 방법이 일반적인 기술이었으나, 이 방법은 우수한 종모우의 능력은 충분히 활용할 수 있지만 우수한 종빈우의 유전적 가치는 효율적으로 활용하지 못하는 단점이 있다. 암소에서 평균적인 원시 난모세포의 수는 50,000~75,000개로 유전적인 개량을 할 수 있는 충분히 많은 수의 난자를 가지고

있지만 실제로 발정 주기 중에 배란이나 임신으로 이어져서 산자 생산으로 이용되는 수는 극히 일부에 그친다. 그러므로 종빈우의 능력이 아무리 우수하여도 인공수정에 의한 자연 분만 시 암소의 경제 수명 안에 생산할 수 있는 송아지의 수는 제한적이어서 공태기 사이에 다배란 처리를 하여 다수의 수정란을 확보할 수 있는 체란 방법이 암소의 유전 가치를 효율적으로 이용하는 측면에서도 매우 중요한 개량 방법으로 인정되고 있다. 국내에서도 1980년대 초에 수정란 이식 기술

* Correspondence : E-mail : tigerleopard@naver.com

이 도입된 이래 수정란 이식 기술의 효율이 크게 향상되었으며, 다수의 고능력 수정란을 안정적으로 확보하기 위한 다배란 처리 방법이 다양하게 시도되었다. 그러나 다배란 처리와 수정란 이식 기술이 산업적으로 이용되기에는 아직 해결해야 할 문제점이 많이 남아 있으며, 육우와는 달리 유우에서는 분만 후 유생산과 관련된 다양한 생리적 변화로 인하여 많은 연구가 이루어지지 못하였다.

다배란 처리의 목적은 유전적으로 능력이 우수한 공란우로부터 이식 가능한 정상 수정란을 최대한 많이 생산하는 것인데, 다배란 처리에 대한 난소 반응은 개체에 따라 투여 호르몬에 대한 차이가 크며, 수정란 생산에 영향을 미치는 여러 가지 요인들이 복합적으로 작용하기 때문에 정상 수정란 생산을 위한 안정적인 체계는 연구자들의 노력에도 불구하고 크게 개선되지 못하고 있는 실정이다(Armstrong, 1993). 다배란 처리에 영향을 미치는 요인에는 공란우 개체에 따른 사양 관리 수준(Bader 등, 2005; Nolan 등, 1998; Yaakub 등, 1999), 우세난포의 조절(Shaw와 Good, 2000), 성선자극호르몬의 종류(Martinez 등, 2004; Staigmiller 등, 1992), 호르몬 개시일(Nasser 등, 1993)과 투여량(Hossein 등, 2002; Pawlyshyn 등, 1986), FSH 제제에 함유되어 있는 LH의 성분 비율(Gonzalez 등, 1990; Tribulo 등, 1993), 공란우의 연령(Lerner 등, 1986; Donaldson, 1984), 번식 경력(Isogai 등, 1993), 반복 처리(Almeida, 1987), 계절(Bastidas와 Randel, 1987) 등이 다양하게 관계된다고 하였다. 그러므로 고능력 공란우의 효율적인 이용을 위해서는 유생산량, 분만 후 체란 시기 혹은 다배란 처리 계절 등을 고려하여 이식 가능한 수정란을 최대한 많이 확보할 수 있는 방법을 찾는 것이 선결 과제이다.

국내에서는 체외 수정란 생산을 위한 배양 기술의 발달로 매년 많은 두수의 수정란 이식이 이루어지고 있다. 특히 최근 몇 년 동안 낙농가에서는 우유 파동을 겪으면서 젖소 가격은 하락하고 있는 반면에 한우 송아지 가격의 상승으로 젖소를 대리모로 활용한 한우 송아지 생산이 보편화되고 있다. 그러나 체외수정란 이식의 주 목적은 낙농가의 소득 보전에 도움이 되는 한우 송아지를 대량으로 생산하기 위한 수단으로 이용된 것으로 개량을 위한 목적과는 차이가 있으며, 체내수정란 이식시와 비교하여도 수태율에서 많은 차이를 나타내므로 수란우로 사용된 비수태우의 손실로 인하여 오히려 체내수정란에 대한 관심이 더 높아지고 있는 실정이다. 체내수정란 생산을 위한 과배란 처리와 체란 기술에 관하여 국내외적으로 많은 연구가 수행되고 있지만, 아직까지 기술 체계가 확립되었다고는 볼 수 없으며, 특히 고능력 유우는 우유 생산과 관련된 여러 가지 제약 조건이 있어 연구 성과가 제한적이다. 이에 본 연구는 고능력 유우 공란우의 다배란 처리 및 수정란 회수에 영향을 미치는 요인을 검토하고 체내수정란 생산을 위한 효율적인 다배란 처리 방법을 제시하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공란우 선발

본 시험에 공시된 공란우는 경기도 지역에서 사육중인 임상 검사상 질병이 없는 유우 중 외모심사 점수가 78점 이상이며, 유생산 능력이 우수한 개체를 선발하여 정상 발정 주기가 확인된 개체를 선택하였다. 전체 195두 중에서 305일 성년형 보정 유량이 확인된 103두에서 유량에 따른 체란 성적을 비교하였고, 분만 일자가 명확한 82두에서 분만 후 체란 일자에 따른 영향을 조사하였다. 계절에 따른 효과는 체란 일자를 기준으로 168두에서 수정란 회수 결과를 비교하였다.

2. 공란우의 다배란 처리

공란우의 다배란 처리는 발정으로부터 6일째 직장 검사를 실시하여 생식기 및 황체가 정상적으로 확인된 개체를 대상으로 발정 주기 10~13일째 FOLLTROPIN-V(Vetrepharm, Canada) 400 mg NIH-FSH-P를 4일간 12시간 간격으로 감량법에 따라서 주사를 하였다. 호르몬 주사 6, 7회째 황체 용해 및 발정 유도를 위하여 PGF₂ α(Estron, Czech Republic)를 근육주사 하였다. 승가 허용 발정을 보인 공란우는 발정으로부터 12 h, 24 h에 2회 인공수정을 실시하였다.

3. 수정란 회수

다배란 처리된 공란우의 발정발현 7.5일째에 lidocaine hydrochloride(2% Lidocaine, Jeil Pharm, Korea) 6 ml로 경막의 마취를 실시하고 난소를 검사하여 황체의 수를 조사하였다. 수정란 회수는 3-way catheter(IMV, France)를 경관 경유법으로 자궁체의 대만부에 고정된 다음 soft inner tube를 자궁각 선단부위까지 진행시켰다. 수정란 회수를 위한 관류액은 하트만액(대한약품공업, Korea)에 Fetal calf serum을 1%가 되도록 첨가하고 삼투압을 290 mOsm로 pH를 7.4로 교정한 후 사용하였으며 관류액을 일방향 밸브를 통하여 주입 및 회수하였다. 자궁내 수정란의 관류 방법은 50 ml 주사기를 이용하여 한 자궁각에 5~6회 자궁내의 충만도에 따라서 주입을 하여 회수되는 관류액이 멈추지 않도록 하였으며, 체란용 필터는 EM CON filter(Minitub, Spring valley, USA)를 사용하였다.

4. 수정란 평가

관류된 체란액을 눈금 표시를 한 Petri dish 100 mm에 옮겨 실체현미경(Olympus, Japan)으로 관찰하였으며, 수정란의 발육 단계와 질은 형태학적으로 IETS(International Embryo Transfer Society) Manual 3rd Edition(1998)의 평가 방법에 따라서 평가하였다. 수정란의 발육 단계는 상실배(Stage code 3), 치밀화 상실배(Stage code 4), 초기 배반포(Stage code 5), 배반포(Stage code 6), 확장 배반포(Stage code 7)로 구분하였고,

수정란의 질은 우수(excellent), 우량(good), 보통(fair) 및 불량(poor), 변성란 및 미수정란으로 구분하였으며, 이 중 우수 및 우량을 나타내는 수정란(Quality code 1)을 이식 가능 수정란으로 간주하였다.

5. 통계처리

본 실험에서 저반응한 개체와 과반응한 개체의 결과는 실험에 대한 명확한 판독을 위하여 제외하였다. 저반응 개체는 황체수의 합이 3개 이하인 경우이며, 과반응 개체는 황체수의 합이 30개 이상의 결과를 보인 경우이다. 결과에 대한 통계학적 분석은 general linear models procedure(SAS, 1996)을 이용하여 최소자승평균(least square means)을 구하고, 요인간의 유의차를 검정하였다.

결과 및 고찰

유우의 다배란 처리시 산유량에 따른 수정란 회수 성적은 Table 1과 같다. 보정산유량이 12,000 kg/305 days를 초과한 경우에서 회수된 수정란의 수와 이식 가능 수정란의 수가 유생산량이 이보다 낮은 다른 군에 비하여 다소 작은 경향을 나타내었으나 군 간에 유의적인 차이는 없었다. Grave 등(1979)이 분만 후 초기에 과배란시 수정란수가 적고 유생산량이 높을수록 회수 수정란의 수가 적었다는 보고를 참고할 때, 유생산량이 많은 고능력우일수록 체내의 생리 상태가 모두 비유를 위하여 최대한 맞추어져 있으며, 기본적인 에너지원이나 비타민, 무기이온 등도 일차적으로 유생산을 위하여 모두 사용되므로 난소의 기능은 정상적인 상태를 기대할 수 없으며, 유생산에 비하여 사료 섭취량이 따라 주지 못하여 에너지 밸런스가 마이너스인 상태로 존재하기 때문에 이에 따라서 다배란 처리에 대한 반응도 낮은 것으로 추정된다. 본 실험의 결과에서는 유생산량에 따른 실험 군간의 유의적인 차이는 없었지만 12,000 kg/305 days를 초과하는 군에서 회수 수정란의 수와 이식 가능 수정란의 수가 낮아진 것은 상기한 내용과

유사하게 고비유로 인한 작용으로 판단된다. 그러므로 유생산 능력이 높은 고능력우에서는 다배란 처리시 이러한 점을 유념하여 사료 급여시 부족되는 부분이 없도록 비타민이나 미네랄을 보충 급여해야 할 것이며, 공란우로 선택할 때에도 유생산 능력에만 치우치지 말고 체형이나 번식 능력을 종합적으로 고려하여야 한다. 특히 예상 유전 능력을 판단하여 유량과 같은 당대의 표현형에 지나치게 의존하지 않는 것이 중요할 것이다. 개량의 진행 속도는 과거에 비하여 더욱 가속화되고 있는 실정으므로 12,000 kg/305 days보다 더 높은 유생산 능력을 가지는 고능력우에서의 과배란 처리에 관한 반응을 추가적으로 연구하는 것이 필요하다고 사료된다.

공란우의 분만 후 경과일수에 따른 수정란 회수 성적은 Table 2에서 보는 바와 같다. 이식 가능 수정란 수는 분만 후 61~90일, 121~150일에 채란한 군(10.7개, 9.8개)이 분만 후 91~120일에 채란을 실시한 군(6.8개)과 151일 이상에 채란을 실시한 군(5.7개)에 비하여 다소 높게 나타났으나, 실험군 간의 유의적인 차이는 없었다. 분만 후 60일 이내에 정상적으로 첫 발정을 보인 개체에서 두 번째 발정을 기준으로 채란을 실시한 경우는 일반적으로 90일 이전에 채란을 실시할 수 있으며, 이식 가능 수정란수가 10개 정도로 다수의 수정란을 확보할 수 있으나, 분만 후 다양한 원인으로 인하여 첫 발정을 보이는 시기가 늦어져서 채란 실시일이 91~120일인 군은 6.8개로 채란 실시일이 빠른 군에 비하여는 낮은 것으로 나타났다. 또한, 채란 실시일이 151일 이상인 공란우들의 이식 가능 수정란 수는 5.7개로 다른 군에 비하여 가장 낮았으므로 다배란 처리시 공란우는 분만 후 150일을 경과하지 않는 것이 편차를 줄이는데 도움이 된다고 추정된다. Isogai 등(1993)이 70~130일, 131~190일, 191~250일 사이보다는 461일 이상에서 회수된 정상 수정란수가 현저하게 감소하였다($p < 0.05$)는 보고를 참조할 때, 본 실험에서 유의적인 차이는 없었으나 이와 비슷한 원리가 적용될 수 있을 것으로 판단되며, 분만 후 150일이 경과한 경우에는 체점수(BCS:body condition score)는 회

Table 1. Effect of milk production on embryo production in Holstein cows

Milk production (kg/305 days)	No. of cows	No. of embryos recovered (Mean±SD)	No. of embryos transferrable (Mean±SD)
< 10,000	23	12.3±9.1	7.8±6.5
10,000~12,000	38	13.0±6.7	7.9±6.0
> 12,000	42	9.5±5.4	5.9±4.1

Within a column, no significant differences were observed ($p > 0.05$).

Table 2. Effect of postparturient days on embryo production in Holstein cows

Postparturient days	No. of cows	No. of embryos recovered (Mean±SD)	No. of embryos transferrable (Mean±SD)
61~90	16	15.6±12.2	10.7±9.0
91~120	21	10.2± 5.1	6.8±4.0
121~150	12	13.4± 7.6	9.8±7.2
≥ 151	33	9.9± 5.2	5.7±4.2

Within a column, no significant differences were observed ($p > 0.05$).

복이 되지만 난소의 기능은 오히려 낮아지므로 유생산 피크기를 지나서 난소의 기능이 정상적인 상태에서는 가능한 한 체란시기를 앞당기는 것이 효율적인 것으로 사료된다.

유우의 다배란 처리에 있어서 계절적인 요인이 수정란 생산에 미치는 영향은 Table 3과 같다. 계절별 수정란 생산성을 보면 봄, 가을 및 겨울이 각각 7.7, 8.5 및 7.3개의 이식 가능 수정란을 생산하여 양호한 결과를 보였고, 여름이 5.2개로 다른 계절에 비하여 가장 낮은 성적을 나타내었지만 실험을 실시한 군 간의 유의적인 차이는 없었다. Shea 등(1984)은 겨울철에 난자 회수율과 이식 가능 수정란의 비율이 가장 낮았다고 하였으며, Hasler 등(1983)은 회수란수가 겨울에 가장 많았고, 여름에 적었다고 하여 본 연구와는 차이가 있었다. 계절에 따른 공란우의 다배란 처리에 대한 반응은 실험에 영향을 미친다는 보고(Almeida, 1987; 손 등, 2000)와 영향을 미치지 않는다는 보고(Massey와 Oden, 1984)로 연구자들 간에 차이가 있다. 본 연구에서 여름에 회수된 수정란 수와 이식 가능 수정란의 수가 가장 낮은 것은 계절적으로 공란우가 여름철 장기간 폭염에 의한 스트레스를 받아 난소 상태가 나빠졌기 때문인 것으로 판단된다. 특히 국내 유우의 대부분을 차지하는 Holstein종은 저온에 대한 저항성은 큰 편이나, 30도 이상의 고온에 대한 저항성은 매우 낮은 특성으로 육우와는 다른 종의 특이성 때문인 것으로 추정된다. 또한, 보고자들 간에도 상이한 결과를 보이는 것은 계절에 따른 온도 상한이 지역마다 다르며, 사양 관리와 개체간의 영양 수준도 실험자에 따라 차이가 크기 때문인 것으로 사료된다.

적 요

본 연구는 고능력 유우 공란우의 이용 효율을 극대화하기 위하여 체내 수정란 생산을 위한 다배란 처리의 결과에 미치는 요인을 분석하여 안정적이고 효율적인 다배란 처리 방법을 제시하기 위한 목적으로 실시하였다. 공란우의 다배란 처

Table 3. Effect of seasons on embryo production in Holstein cows

Seasons	No. of cows	No. of embryos recovered (Mean±SD)	No. of embryos transferrable (Mean±SD)
Spring(MAR-MAY)	60	11.7±7.5	7.5±5.9
Summer(JUN-AUG)	51	11.0±7.3	5.2±4.6
Autumn(SEP-NOV)	30	13.7±8.2	8.8±6.2
Winter(DEC-FEB)	27	11.1±6.7	7.3±4.5

Within a column, no significant differences were observed ($p>0.05$).

리는 발정 주기 10~13일째 FOLLTROPIN-V(Vetrepharm, Canada) 400 mg NIH-FSH-P를 4일간 12시간 간격으로 감량법에 따라서 주사를 하였다. 호르몬 주사 6, 7회째 황체 용해 및 발정 유도를 위하여 $PGF_2\alpha$ (Estron, Czech Republic)를 근육 주사하였으며, 증가 허용 발정을 보인 공란우는 발정으로부터 12 h, 24 h에 2회 인공수정을 실시하였다. 수정란 회수는 발정으로부터 7.5일에 실시하여 전체 회수 수정란 중에서 이식 가능 수정란을 구별하였다.

실험의 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 유생산량에 따른 회수 수정란 수와 이식 가능 수정란 수는 각 군간의 유의적인 차이는 없었다($p>0.05$).
2. 분만 후 경과 일수에 따른 회수 수정란 수와 이식 가능 수정란 수는 분만 후 61~90일이나 121~150일 사이에 체란을 실시한 경우가 분만 후 91~120일 혹은 151일 이상에서 체란한 경우보다 낮았으나 군간의 유의적인 차이는 없었다($p>0.05$).
3. 계절에 따른 회수 수정란 수와 이식 가능 수정란 수는 다른 계절과 비교하여 여름철에 가장 낮았으나 계절에 따른 유의적인 차이는 없었다($p>0.05$).

이상의 결과로 보아 고능력 유우 공란우를 다배란 처리 할 때는 유생산량이나 분만 후 경과 일수 혹은 계절에 관계없이 체란을 실시할 수 있는 것으로 판단된다.

참고문헌

- Almeida AP. 1987. Superovulatory response in dairy cows repeatedly treated with PMSG. *Theriogenology* 27:205.
- Armstrong DT. 1993. Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenology* 39:7-24.
- 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 multimarous beef cows. *Anim. Reprod. Sci.* 85:61-70.
- Bastidas P and Randel RD. 1987. Seasonal effects on embryo transfer results in Brahman cows. *Theriogenology* 28:531-540.
- Donaldson LE. 1984. Effect of age of donor cows on embryo production. *Theriogenology* 21:963-967.
- Gonzalez A, Lussier JG, Caruthers TD, Murphy BD and Mapletoft RJ. 1990. Superovulation of beef heifer with Folltropin-V: a new FSH preparation containing reduced LH activity. *Theriogenology* 33:519.
- Grave T, Lehn-Jensen H and Rasbech ND. 1979. Morphological evaluation of bovine embryos recovered non-surgi-

- cally from superovulated dairy cows on day 6.5 to 7.5: A field study. *Anim. Biochem. Biophys.* 19:1599-1611.
- Hasler JF, McCauley AD, Schermerhorn EC and Foote RH. 1983. Superovulatory response of Holstein cows. *Theriogenology* 19:83-99.
- Hossein MS, Shamsuddin M, Bhuiyan MMU, Khan AH and Bari FY. 2002. Dose-related effect of follicle stimulating hormone on superovulation in indigenous cows of Bangladesh. *Korean J. Emb. Trans.* 17:123-128.
- IETS. 1998. Manual of the international embryo transfer society. In: Stringfellow DA, Seidel SM, editors. Savoy, Illinois, USA: International Embryo Transfer Society.
- Isogai T, Shimohira I and Kimura K. 1993. Factors affecting embryo production following repeated superovulation treatment in Holstein donors. *J. Reprod. Dev.* 39:79-84.
- Lerner SP, Thayne WV, Baker RD, Hensche T, Meredith S, Inskeep EK, Dailey RA, Lewis PE, Butcher RL. 1986. Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows. *J. Anim. Sci.* 63:176-183.
- 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.
- Massey JM and Oden AJ. 1984. No seasonal effect on embryo donor performance in the southeast region of the USA. *Theriogenology* 21:196-217.
- Nasser LF, Adams GP, Bo GA and Mapletoft RJ. 1993. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology* 40:713-724.
- 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.
- Pawlyshyn V, Lindsell CE, Braithwaite M and Mapletoft RJ. 1986. Superovulation of beef cows with FSH-P : A dose-response trial. *Theriogenology* 25:179.
- SAS. 1996. SAS System, Release 6.1, SAS Inst Inc, Cary, NC, USA.
- Shaw DW and Good TE. 2000. Recovery rates and embryo quality following dominant follicle ablation in superovulated cattle. *Theriogenology* 53:1521-1528.
- Shea BF, Janzen RE and McDermand DP. 1984. Seasonal variation in response to stimulation and related embryo transfer procedures in Alberta over a nine year period. *Theriogenology* 21:186-195.
- Staigmiller RB, Bellows RA, Anderson GB, Seidel GE, Foot WD, Menino AR and Wright RW. 1992. Superovulation of cattle with equine pituitary extract and porcine FSH. *Theriogenology* 37:1091-1099.
- Tribulo H, Jofre F, Carcedo J, Alonso A, Tribulo R and Bo GA. 1993. Superovulation in *Bos-indicus* cattle with a single subcutaneous injection of commercial pituitary extracts. *Theriogenology* 39:331.
- Yaakub H, O'Callaghan D and Boland MP. 1999. Effect of type and quantity of concentrations of superovulation and embryo yield in beef heifers. *Theriogenology* 51:1259-1266.
- 손동수, 김일화, 류일선, 연성흡, 서국현, 이동원, 최선호, 박수봉, 이충섭, 최유림, 안병석, 김준석. 2000. 젓소 MOET scheme의 추진을 위한 수정란 생산 및 이식. *한국수정란이식학회지* 15:57-65.