

N-Methylacetamide 동결 보호제의 농도가 오계 동결 정액의 수정 및 부화율에 미치는 영향

김성우^{†1} · 최진석¹ · 고응규¹ · 도윤정¹ · 변미정¹ · 박수봉² · 성환후¹ · 김종대³

¹농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원시험장, ²농촌진흥청 국립축산과학원 개량평가과,
³농촌진흥청 국립축산과학원 가금과

Effect of N-Methylacetamide Concentration on the Fertility and Hatchability of Cryopreserved Ogye Rooster Semen

Sung Woo Kim^{†1}, Jin Seok Choi¹, Yeoung-Gyu Ko¹, Yoon-Jung Do¹, Mijeong Byun¹, Soo-Bong Park²,
Hwan-Hoo Seong¹ and Chong-Dae Kim³

¹Animal Genetic Resources Station, National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, Korea,

²Animal Breeding and Genetics Division, National Institute of Animal Science, RDA, Seonghwan 330-801, Korea,

³Poultry Science Division, National Institute of Animal Science, RDA, Seonghwan 330-801, Korea

ABSTRACT To preserve chicken genetic materials like cryopreserved spermatozoa, various kinds of freezing agents like glycerol, dimethylsuloxide, dimethylformamide or dimethylacetamide have been used for rooster semen preparation. Recently, the usage of N-methylacetamide (MA) for Ogye rooster semen preservation resulted in hatched chicken successfully. In this study, we investigated the effects of 7, 9 and 11% of MA on the viability, fertility and hatchability of frozen-thawed rooster semen using artificial insemination. The results of viability, fertility and hatchability in frozen semen with 7%, 9% or 11% MA were $35.16 \pm 6.12\%$, $67.83 \pm 15.3\%$ and $66.2 \pm 16.3\%$ of motile sperm rate, 21.5%, 34.7% and 25% of fertility rate, and 100%, 89.5% and 87.5% of hatchability rate. The results of control group with frozen semen were 96.0% of fertility rate and 92.2% of hatchability rate. With these results, the concentration range of MA as a freezing agent of rooster semen could be 7~9% of media. The higher concentration of 9 % MA could decrease the fertility rate of thawed semen not the rate of hatchability rate. So the use of MA without affecting fertility rate would be a key point of freezing method of rooster semen for poultry genetic resource preservation.

(Key words : Ogye, cryopreservation, N-methylacetamide, semen)

서 론

가금 산업에 있어서 닭 유전자원을 보존하는 연구는 후대에 유전자원을 제공하여 육종 소재를 제공할 수 있으며, 닭 육종에 있어서 확립된 계통을 영구 보존함으로써 국가의 자산을 보호하는데 있어서 매우 중요한 수단으로 판단된다. 그러나 닭의 동결 정자에 관한 연구 영역은 기술적인 요인과 경제적 비용에 관한 요인에 의하여 실험적 수준에 머무르고 있는 것이 현실이며, 생물 이용권의 권리 다툼이 시작되는 시점에, 동결 보존 기술에 의하여 보존된 유전자원은 미래에 고유종과 외래종을 구별하는 수단을 제공할 수 있다

는 점에 있어서 매우 중요하다. 그럼에도 불구하고 닭을 포함한 가금류에 있어서 정액을 영구 보존하는 것은 비교적 최근의 일이며, 이는 기술적 한계성이 분명히 있는 닭 정자 동결 연구에 대한 관심이 비교적 적기 때문이라고 이야기할 수 있다. 특히 조류의 경우, 조류인플루엔자와 같은 악성 질병과 기후의 변화에 따라 지역 적응종과 재래종이 소실될 수 있는 위험성에 취약한 축종으로 알려져 있어서 이러한 국가적 재난에 대한 경제적 손실을 방지하기 위하여 가금 유전자원의 보존을 실시하고 있다. 그러나 아직까지 소와 같은 경제동물처럼 닭 동결 정자의 기술 수준은 산업화에 이르지 못하고 있어, 살아 있는 축군을 중복 보존하는 수준

[†]To whom correspondence should be addressed : sungwoo@korea.kr

에 머무르고 있기에 가금의 정액을 안전하게 영구 보존하는 기술은 국가적으로 매우 중요한 기술로 판단된다.

닭 정액의 동결 보존은 매우 초창기 연구 영역에 등장하고 있으나(Polge, 1949), 그 당시 흔히 이용하고 있던 glycerol은 용해 후 닭 정자의 생존성에는 탁월한 효과가 있으나, 적절한 방법으로 제거하지 않으면 용해 후 동결 정액의 생존성이 우수하더라도, 수정율을 저해하는 것으로 밝혀져 있다(Allen와 Bobr; 1955; Clark와 Shaffner, 1960; Neville 등, 1971; Sexton, 1973; Gill 등, 1996). 그 후, glycerol을 동결 보호제로 이용하여 보존된 동결 정액은 용해 후 다양한 방법에 의하여 glycerol을 제거하는 기술에 관하여 연구가 진행되었으며(McLean 등, 1998; Long과 Kulkarni 2004; Purdy 등, 2009), 이러한 시도는 accudenz와 같이 비이온성 친수성 화학 물질을 이용한 농도 구배를 이용하는 원심분리 처리법(Froman과 McLean, 1996; Donaghue 등, 1998; Long과 Kulkarni, 2004)과 용해 후 glycerol을 함유하고 있는 정액을 반투막 안에 가두고 투석을 실시하여 glycerol을 0.1 M이하로 제거하는 투석 처리 방법으로 크게 나누어 살펴볼 수 있다(Hammerstedt와 Graham, 1992). 닭의 정자를 과도하게 원심분리 처리할 경우, 수정율은 glycerol의 농도와 무관하게 낮아지는 현상이 나타나며(미 발표 자료), 이는 원심분리 처리 방법에서 매우 세심한 주의를 기울여야 함을 의미한다. 그러므로 이러한 닭 정자의 특징은 glycerol 희석제의 실용화에 대한 걸림돌로 작용할 가능성이 존재한다. 후자와 같은 투석 처리법은 효율적인 제거 방법이 될 수 있으나, 투석에 필요한 최소 시간 자체가 용해 후 닭의 생존 능력을 저해하는 요인으로 작용할 가능성이 있어, 이 방법 또한 실용화를 어렵게 만드는 원인으로 작용한다. 그러므로 최소한 닭의 경우, glycerol 이외의 동결 보호제인 dimethylformamide(DMF), dimethylacetamide(DMA), dimethylsulfoxide(DMSO) 등을 이용하는 시도가 많이 연구되었으며, 이에 따르는 동결용 닭 정액 희석액의 조합에 대한 연구가 시도되었다(Lake와 Ravie, 1984; Schramm, 1991; Tereshchenko, 1985; Tselutin 등, 1999; 박 등, 1987; 최 등 2013). 특히, 7.5%의 N-methylacetamide를 이용할 때, 닭 용해된 동결 정자의 수정율이 90% 이상으로 비교적 높게 보고하고 있으며, 성공적인 후대의 생산이 가능하다고 보고하고 있다(Hanzawa 등, 2010; Sasaki 등, 2010; 최 등, 2012). 그러나 MA 자체의 독성은 glycerol보다 높은 것으로 알려져 있으며, 다른 아마이드 계열의 동결 보호제와 달리 녹는점이 26~28℃로써 상온에서 고체로 유지되고 있어 희석액을 제조할 때마다 가온 처리를 해야 하는 번거로운 점이 있다. 닭 정자의 동결 보존의 실용화가 되기 위해

서는 상용화 기술이 확립된 소의 경우와는 달리 더 많은 요인들을 고려하여야 한다. 이러한 요인들은 다음과 같이 나열할 수 있다. 첫째, 닭 동결 정자의 용해 후 정자의 생존율이 가장 기본적으로 높아야 한다. 둘째, 인공수정 이후에 정자가 암컷의 자성 생식도관에서 정자가 저장되는 효율성, 즉 암탉의 자궁과 질의 경계부에 존재하는 정자 저장 기관(semen storage tubules, SST)에 동결 용해된 정자가 최대한 장기간 보존될 수 있는 효율이 높아야 한다(Blesbois와 Brillard, 2007). 닭의 번식학적 특성에 따라 매일 배란되는 시점에 있어 SST에 저장된 정자가 다시 활력을 회복하고 배란된 알을 수정시킬 수 있는 능력이 획득되어야 동결 유전자원 복원의 효율성을 높일 수 있기 때문이다. 특히 닭은 암컷의 난자가 매우 크고, 다정자가 동시에 수정이 되는 특징이 있으므로 많은 수의 활력 있는 정자를 필요로 하는 특징이 있다. 셋째, 동결 보호제로 이용되는 시약은 수정 후 부화율에 영향을 주지 않아야 정액 희석액에 이용될 수 있다. 그러므로 닭의 동결 정액의 연구는 동일한 조건으로 반복하는 실험이 매우 어려운 편이며 세심한 주의가 필요하다. 상용화 기술로 확립된 소의 동결 정액에 비하여, 닭의 경우 실험자의 경험과 계통 및 개체의 차이에 따라 시험 결과의 변이가 많이 나타나는 편이다. 본 연구에서는 glycerol이 가진 수정 능력 억제 효과를 회피하고, 직접 암탉의 자성 생식 도관에 직접 수정할 수 있도록 아마이드 계열의 동결 보호제 중 MA를 오계의 정액을 희석하는데 사용하였다. 또한, MA 동결 보호제의 농도에 따른 동결 정자의 생존성, 인공수정으로 생산된 수정란의 수정율과 부화율을 조사하였고, 이를 이용하여 MA 동결 보호제를 이용하는 방법을 확립하는 기초 자료에 응용하고자 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 공시축

공시축은 국립축산과학원 가축유전자원시험장에서 보존 중인 연산 오계 수탉 20수를 정액 채취용으로 공시하였다. 사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 관리하였으며, 40주령 이상의 건강한 수탉을 선발하여 개체 관리를 실시하였다.

2. 정액 채취

정액 채취는 마사지 채취법(Burrows와 Quinn, 1935)의 변형인 횡취법(side collection)으로 주 2회 채취하였으며, 눈금이 있는 15 mL 튜브(Becton Dickinson, USA)를 이용하여 정

액의 부피를 정량하였다. 채취된 정액은 5°C 보온병에 담아 신속하게 실험실로 운반하였다.

3. 정액의 처리 및 제조

본 실험에서는 닭 정액은 HS-1 희석액을 제조하여 희석하였으며(Sasaki 등, 2010), 그 조성은 Table 1과 같다. 운반된 정액은 5°C 하에서 동결 보호제가 첨가되지 않은 HS-1 희석액으로 1:1 비율로 희석 후 30분간 평형 시간을 가졌다. 희석된 정액은 1:1의 비율로 희석할 경우, MA 동결 보호제(Sigma, USA)의 최종 농도가 7%, 9% 및 11%가 되도록 조정된 MA를 포함하는 HS-1 희석액으로 다시 희석하였다. 동결 보호제가 들어간 희석액으로 희석된 정액은 평형 시간 없이 0.5 mL straw(FHK, Japan)에 충전하고, 끝 부위를 파우더를 이용하여 밀봉하였다. 작업 과정에서 동일한 온도를 유지하기 위하여 5°C로 조정된 저온 정액 처리장치(FHK, Japan) 안에서 희석, 충전 및 밀봉 작업을 실시하였다. 희석 정액이 충전된 스트로의 동결 방법은 스티로폼 박스 안 액체 질소 상면 4 cm에서 30분간 정지하여 예비 동결을 실시하고, 액체 질소에 침지하는 간이 동결법을 이용하였다.

4. 정자의 생존율 검사

5°C 저온 수조에서 2분간 용해 후 가운데판에 미리 준비된 슬라이드에 약 3~4 μ L를 점적하고, 커버 글라스를 직립 현미경으로 20배율로 관찰하였다. 액체 질소에서 최소 2~3주간 보존하고, 용해된 정자는 37°C로 조정된 가운데판 위에서 3분 이상 충분히 가온된 후에 관찰되었으며, SAIS 자동 정자 측정기에 연결된 CASA 프로그램에서 나타나는 동영상 화면상에서 디지털 이미지 형태로 동영상상을 저장하였다. 저장된 동영상은 영상 분석 장치 프로그램으로 1초간 반복

재생하였으며, 움직이지 않은 정자는 동결 및 용해 과정에서 생존하지 못한 정자로 간주되었으며, 총 200개 이상의 정자를 3곳 이상의 위치에서 얻어 생존율을 판정하였다.

5. 인공수정, 집란 및 부화

신선정액을 이용하여 인공수정을 실시할 경우, 동일한 농도의 희석 정액을 동량의 MA 동결 보호제 들어 있는 HS-1 희석액을 이용하였다. 제조된 동결 정액의 경우, 5°C 저온 수조에서 2분간 용해 후 최대한 5°C를 유지한 상태에서 각각 총 정자 수 200×10^6 의 0.2 mL 정액을 1 mL 주사기를 이용하여 암탉의 질 속 2~3 cm에 주입하는 심부 주입법을 이용하였다. 인공수정은 오후에 이틀 연속으로 실시 후, 3일 후에 2차 수정을 실시하였다. 집란은 첫 수정 후 48시간째부터 7일간, 3주 동안 종란을 수집하였으며, 훈증 소독을 거쳐 종란 보관실에 저장하였다. 1주일 간격으로 집란된 수정란은 부화실에서 발생을 실시하였으며, 배양 7일째 검란을 실시하여 수정율을 조사하였고, 배양 21일째 생산되는 병아리의 수를 세어 부화율을 조사하였다.

6. 주요 조사 항목

희석 정액과 동결 정액의 생존율 및 인공수정을 실시하여 수집된 종란에서 각각 무정란, 발생중지란 및 부화란 수를 조사하였다.

7. 통계 처리

통계 분석은 통계 분석 프로그램(SPSS version 18.0)을 이용하여 일원 분산 분석(ANOVA) 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test 방법을 이용하여 검정하였다.

결 과

1. MA 동결 보호제가 미치는 오계 정자 생존성에 미치는 영향

오계 정자는 위상차 현미경으로 관찰하면서 디지털 영상 프로그램으로 동영상을 촬영하고, 1초간의 움직임으로 판정하였으며, 그 결과는 Table 2와 같다. 용해 후 현미경 아래에서 3분 이상 37°C에서 노출되어도 움직이지 않은 정자는 생존하지 못한 정자로 판정하였다. MA를 7%, 9% 및 11%를 이용하여 동결 용해한 정자를 37도에서의 생존율은 $35.16 \pm 6.12\%$, $67.83 \pm 15.3\%$ 및 $66.2 \pm 16.3\%$ 로 관찰되었다. 9% 및 11% MA가 존재하는 조건에서 생존된 정자 비율에서 유의적인 차이는 관찰하지 못하였으며, 7% MA의 처리는 다

Table 1. Composition of HS-1 extender

Components	Amount(g)
L-glutamic acid monosodium salt	1.2
Potassium acetate	0.3
D(+) Glucose	0.2
D(+) Trehalose	3.8
BES	0.5
Bis-Tris	0.5
Distilled water	Up to 100 mL

The chemicals used for diluents were purchased from Sigma-Aldrich Korea Corp.

Table 2. Effects of MA concentration on Ogye rooster sperm viability

% of MA	% of motile sperm after thawing
7	35.16 ± 6.12 ^a
9	67.83 ± 15.3 ^b
11	66.20 ± 16.3 ^b

^a Means with different superscripts were significantly different ($p < 0.05$).

른 처리군보다 유의적 수준으로 낮게 관찰되었다($p < 0.05$).

2. MA 동결 보호제가 오계 희석 동결 정액의 인공수정에서 수정란의 수정율에 미치는 영향

용해된 오계 동결 정자를 7일 동안 수정란을 집란하여 배양하고, 농도별 MA 동결 보호제가 수정율에 미치는 영향을 관찰하였을 때, 그 결과는 Table 3과 같다. 동결 보호제로 MA를 HS-1 희석액에 최종 농도가 7%, 9% 및 11%가 되도록 조절하여 동결 용해한 정자에서 유래된 수정란의 수정율은 농도가 높아짐에 따라 20.4%, 31.7% 및 20.7%로 관찰되었다. 7% 농도 MA 희석액으로 동결된 정자 처리군보다 수정율이 낮았으며, 9% MA 처리군이 유의적 높았다($p < 0.05$). 7% 농도 MA 희석액으로 동결된 정자는 9% 및 11% MA 희석액으로 동결된 정자 처리군보다 부화율이 높았으며, 9%와 11%의 MA 처리군의 부화율은 차이를 보이지 않았다($p < 0.05$).

3. 9% MA 동결 보호제가 동결 및 용해 오계 정자의 수정율과 부화율에 미치는 영향

수정율이 높게 관찰되는 처리군인 9% MA를 함유하는

Table 3. Effects of MA concentration on the fertility and hatchability of Ogye rooster semen

% of MA	% of fertility (fertile/total eggs)	% of hatchability (hatched/fertilized eggs)
0	95 (57/60) ^a	89.5(51/57) ^a
7	20.4(11/54) ^b	100 (11/11) ^b
9	31.7(19/60) ^c	84.2(16/19) ^a
11	20.7(12/58) ^b	83.3(10/12) ^a

^{a,b} Means with different superscripts were significantly different ($p < 0.05$).

Table 4. Effects of 9% MA concentration on the fertility of Ogye rooster semen for three weeks

Treatment of semen	% of fertility (fertile/total eggs)			Means of fertility
	1 st	2 nd	3 rd	
Fresh	98.3 (114/116)	94.8 (91/96)	95.0 (95/100)	96.0 ± 1.13 ^a
MA	34.7 (41/118)	35.5 (38/107)	35.8 (38/106)	35.3 ± 0.33 ^b

^{a,b} Means with different superscripts were significantly different ($p < 0.05$).

Table 5. Effects of 9% MA concentration on hatchability of fertilized eggs with Ogye frozen semen

Treatment of semen	% of hatchability (hatched/fertilized eggs)			Means of hatchability
	1 st	2 nd	3 rd	
Fresh	88.6 (101/114)	93.4 (85/91)	94.7 (90/95)	92.2 ± 1.96 ^a
MA	90.2 (37/41)	92.1 (35/38)	89.5 (34/38)	90.6 ± 1.35 ^a

^a Means with different superscripts were significantly different ($p < 0.05$).

HS-1 희석액으로 동결된 오계 동결 정자를 인공수정하고, 7일 간격으로 3주간 수정란을 집란하여 배양하였다. 9% MA 동결 보호제가 수정율과 부화율에 미치는 영향을 관찰하였을 때, 그 결과는 Table 4 및 5와 같다. 9% MA 동결 정액을 이용한 처리군에서 수정율을 1주, 2주 및 3주로 나누어 관찰하였을 때 34.7%, 35.5% 및 35.8%로 관찰되었으며, 대조군으로 동일한 희석액으로 동결하지 않은 처리 정자군의 수정율이 98.3%, 94.8% 및 95.0%로 관찰되어 유의적으로 높았다($p < 0.05$). 3주간의 평균 수정율의 성적은 동결 처리군에서는 35.3 ± 0.13%로 관찰되었으며, 동결하지 않은 정자 처리군은 96.0 ± 1.13%로 유의적으로 높았다(Table 4). 9% MA 동결 보호제 처리군의 부화율을 1주, 2주 및 3주로 나누어 관찰하였을 때 90.2%, 92.1% 및 89.5%로 관찰되었으며, 대조군으로 동일한 희석액으로 동결하지 않은 처리 정자군의 부화율은 88.6%, 93.4% 및 94.7%로 관찰되었다. 3주간의 부화율의 평균 성적은 동결 처리군에서는 90.6 ± 1.35%로 관찰되었고, 동결하지 않은 정자는 92.2 ± 1.96%로 관찰되었으며, 유의적 차이가 관찰되지 않았다(Table 5).

고 찰

가금류에 있어서 동결 보존된 정자를 이용하는 연구 분야는 약 100여 년 전부터 관심을 받아 왔으나, 실용적인 면과 효율성에 있어서 비판을 받아온 연구 영역으로 알려져 있다 (Blesbois와 Brillard, 2007). 그 이유는 가금의 동결 정액을 제조하는데 비용과 정자의 생존성과 수정 능력이 산업화에 필요한 기술 수준을 제공하지 못함에 그 원인이 있다. 그럼에도 불구하고 닭 정액의 동결 보존은 유전자원을 안전하게 보존하는 수단을 제공할 뿐 아니라, 생축의 중복 보존에 대한 비용을 영구적으로 절감할 수 있는 기술을 제공할 수 있으므로 효율성 증진에 관한 연구가 계속되고 있다. 서론에서 언급되었듯 가금류의 정자는 포유류와는 다르게 자성 생식도관에서 난자와 수정되기 전에 난관 내에서 매우 긴 시간 동안 생존하여야 하는 특성을 가지고 있다. 특히 동결 과정 중에서 정자의 막이 손상을 받게 되면, 정자가 난관의 SST에 안착하기 전 정자 거부 반응이 급격히 증가하는 것으로 알려져 있으며(Wishart, 1985; Chalah 등, 1999), 이러한 특성은 닭 동결 정액을 제조할 때, 원 정액의 희석 비율을 최소한 낮추어 동결하여야만 하고, 최대한 높은 농도의 정자를 확보하여 인공수정을 하더라도 매우 다양한 성적(10~90%)의 부화율이 다양한 연구자에 의하여 보고되고 있는 현상의 직접적인 원인이 될 것으로 추정된다.

본 연구에서는 MA 동결 보호제를 이용하여 정자의 생존성과 동결 정자를 이용하여 생산된 수정란의 수정율과 부화율을 조사하였다. 최 등(2013)에 의하면, MA 동결 보호제는 다른 amide 계열의 동결 보호제인 DMA와 DMF보다 오계 정자를 동결 보존하였을 때, 상대적으로 낮은 정자의 생존성을 나타낸다고 보고하였으며, 이러한 결과는 아직까지 MA 동결 보호제를 활용한 닭 정자의 생존성을 증진시켜야 할 필요성을 강조하고 있다. 닭 정자의 동결을 위하여 MA 동결 보호제의 농도를 7%에서 9%로 증가시켰을 때, 정자 자체의 생존율은 35.16%에서 67.83%로 유의적으로 증가한 것으로 관찰되었다. 이는 MA 동결 보호제의 성적 자체가 7%에 가까울수록 생존성에 대한 성적이 낮아지고 있음을 의미하며, 70%의 생존율을 얻기 위해서 9%에 가까워야 함을 의미한다. 정자 자체의 생존율과는 다르게 수정율은 9% MA 처리 동결 정액에서 높게 나타났으며(20.4%에서 31.7%로 증가), 부화율은 7% MA 처리군이 9% MA 처리군보다 높게 나타는 경향성을 보여주었다(84.2%에서 100%로 증가). 닭의 동결 정액의 성적에서 9% 이상의 MA 농도는 부화율에 영향을 줄 가능성이 있지만, 7%로 농도를 낮추었을

때 부화율에는 전혀 상관이 없음을 추정하게 한다. 특히 9% MA 처리 동결 정자를 이용하여 3주간 주 2일 연속 인공수정을 실시하게 되면 3주간 동안 수정율이 $35.3 \pm 0.33\%$ 로 성적이 비교적 균일하게 반복되는 현상을 관찰할 수 있었으며, 부화율도 평균 $90.6 \pm 1.35\%$ 로 균일하게 반복됨을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 일본의 재래닭으로 알려진 야키도(Yakido) 투계 품종의 정액을 7.5% MA 동결 보호제로 보호하였을 때 수정율이 90%로 유지되는 것과는 많은 차이를 보이며(Sasaki 등, 2010), 폴리머스 록 품종의 정액을 동일한 방법으로 동결 보존하였을 때 보고된 70.1%와도 차이가 나타난다(Hanzawa 등, 2010). 닭의 동결 정액에 있어서 중요하게 인식되고 있는 수정율은 동일한 동결 보호제를 이용함에 있어서도 서로 다른 결과가 나타나고 있음(Kirby 등, 1998)을 본 연구에서도 확인할 수 있었다. 이러한 문제는 Donoghue와 Wishart의 총설 논문(2000)에도 언급하였으며, 그 원인은 연구자의 숙련도에 따른 차이일 수도 있으며, MA 동결 보호제가 보여주고 있는 물리적 특성 자체가 희석제를 조제함에 있어 매우 세심한 주의를 요구하기 때문에 2차 희석액 자체의 균일성을 저하시키는 원인에 기인할 수도 있다. 특히 MA의 물리적 성격은 상온에서 고체상을 유지하기 때문에 반복적인 열처리에 의한 화학적 안정성은 잘 알려져 있지 않아 더욱 주의가 필요한 시약으로 추정된다. 본 연구 결과에 따르면, 7% MA 함유 희석제와 9% MA 함유 희석제 간의 정자의 생존성이 차이가 매우 크게 나는 것으로 나타나며, 이는 수정율을 결정하는 원인일 가능성도 배제하지 못한다. 그러므로 MA가 가지고 있는 독성보다 동결 보호 효과가 7%에 가까울수록 낮아지는 것을 유추할 수 있고, 9% 농도로 증가시킨 희석액을 이용할 경우, 수정율이 증가하고 있음을 보아 이는 생존한 정자의 비율에 의한 효과로 유추되나, 생존한 정자가 암탉 자성 생식도관의 SST에 정착한 수를 충분히 공급할 수 있는 효과 또한 배제하기 어렵다. 암탉의 SST에서 손상 받은 정자는 안착이 거부 당하는 것으로 알려져 있으므로, 9% 농도로 증가시킨 희석액에서 살아 있더라도 막 손상이 전혀 없는 정자군의 SST 안착에 효과가 나타났음을 간접적으로 추정할 수 있다. 그러므로 MA 동결 보호제를 닭 동결 정자의 생존성을 극대화할 수 있는 기술적인 한계를 극복하는 연구는 수정율과 부화율을 동시에 고려하는 종합적인 연구가 지속적으로 필요하다.

적 요

본 연구는 닭 정액의 동결 보존을 위하여 비 클리세롤성

동결 보호제 중 MA 농도가 정자의 생존율과 용해된 동결 정자를 인공수정을 실시하여 생산된 수정란의 수정율, 부화율을 조사하고자 실시하였다. 동결 보조제로써 MA의 효율성은 7%, 9% 및 11% 범위에서 동결을 실시하였을 때, 정자의 생존율은 $35.16 \pm 6.12\%$, $67.83 \pm 15.3\%$ 및 $66.2 \pm 16.3\%$ 로 관찰되었으며, 용해된 정자를 인공수정을 실시하여 생산된 수정란의 수정율은 21.5%, 34.7% 및 25%로 관찰되었으며, 수정된 수정란의 부화율은 100%, 89.5% 및 87.5%로 관찰되었다. 대조군으로써 신선 정액은 수정율이 96.0%로 관찰되었고, 부화율은 92.2%로 관찰되었다. 9% MA를 이용한 간 이 동결법으로 생산된 동결 정자를 이용하여 3주간 수정란을 검사하였을 때, 수정율은 비록 35.3%로 관찰되었으나, 부화율은 90.3%로 관찰되었다. 이러한 결과에 따르면, 9% 농도로 MA 동결 보호제를 이용할 경우, 동결 및 용해된 정자를 이용하여 생산된 수정란에서 수정율을 감소시킬 수 있음을 보여주고 있으며, 부화율에는 영향을 주지 않음을 추정할 수 있다. 그러므로 수정율과 부화율에 나쁜 영향을 미치지 않고 가끔 유전자원의 보존에 중요한 요인이 될 수 있는 적절한 농도의 MA 동결 보호제 범위는 7~9% 농도로 추정된다.

사 사

본 연구는 농림부 Golden Seed Project의 『신품종 육성에 요구되는 계통의 순수화 및 육종전략 수립과제(PJ00991220-13)』와 농촌진흥청 공동연구사업의 『닭 유전자원의 다양성 보존 및 복원기술 개발 과제 (PJ0082402013)』의 지원에 의하여 수행되었습니다.

인용문헌

- Allen TE, Bobr LW 1955 The fertility of fowl spermatozoa in glycerol diluent after intrauterine insemination. *Poultry Sci* 34:1167-1169.
- Blesbois E, Brillard JP 2007 Specific features of *in vivo* and *in vitro* sperm storage in birds. *Animal* 1:1477-1481.
- Burrows WH, Quinn JP 1935 A method of obtaining spermatozoa from the domestic fowl. *Poultry Sci* 14:251-254.
- Clark CE, Shaffner CS 1960 The fertilizing capacity of frozen chicken sperm and the influence of related *in vitro* processes. *Poultry Sci* 39:1213-1220.
- Chalah T, Seigneurin F, Blesbois E, Brillard JP 1999 *In vitro* comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility *in vivo*. *Cryobiology* 39:185-191.
- Donoghue AM, Holsberger DR, Evenson DP, Froman DP 1998 Semen donor selection by *in vitro* sperm mobility increases fertility and semen storage in the turkey hen. *J Androl* 19:295-301.
- Donoghue AM, Wishart GJ 2000 Storage of poultry semen. *Animal Reproduction Sci* 62:213-232.
- Froman DP, McLean DJ 1996 Objective measurement of sperm motility based upon sperm penetration of Accudenz. *Poult Sci* 75:776-784.
- Gill SPS, Buss EG, Mallis RJ 1996 Cryopreservation of rooster semen in thirteen and sixteen percent glycerol. *Poultry Sci* 75:254-256.
- Hanzawa S, Niinomi T, Miyata T, Tsutsui M, Tajima A 2010 Cryopreservation of chicken semen using N-methylacetamide as cryoprotectant. *Jp Poult Sci* 47:J27-J32.
- Hammerstedt RH, Graham JK 1992 Cryopreservation of poultry sperm: The enigma of glycerol. *Cryobiology* 29:26-38.
- Kirby JD, Tressler CJ, Kirby YK 1998 Evaluation of the duration of sperm fertilizing ability in five lines of commercial broiler breeder and Delaware cross males. *Poultry Sci* 77:1688-1694.
- Lake PE, Ravie O 1984 An exploration of cryoprotective compounds for fowl spermatozoa. *Br Poult Sci* 25:145-150.
- Long JA, Kulkarni G 2004 An effective method for improving the fertility of glycerol-exposed poultry semen. *Poultry Sci* 83:1594-1601.
- McLean DJ, Feltmann AJ, Froman DP 1998 Transfer of sperm into a chemically defined environment by centrifugation through 12% (wt/vol) Accudenz. *Poult Sci* 77:163-168.
- Neville WJ, Macpherson JW, Reinhart B 1971 The contraceptive action of glycerol in chickens. *Poultry Sci* 50:1411-1415.
- Purdy PH, Song Y, Silversides FG, Blackburn HD 2009 Evaluation of glycerol removal techniques, cryoprotectants, and insemination methods for cryopreserving rooster sperm with implications for breed and/or line regeneration. *Poultry Sci* 88:2184-2191.
- Sasaki K, Tatsumi T, Niinomi T, Imai T, Naito M, Tajima A, Nishi Y 2010 A method for cryopreserving semen from

- Yakido roosters using N-methylacetamide as a cryoprotectant. *Jp Poult Sci* 47:297-310.
- Schramm GP 1991 Eignung verschiedener gefrierschutzstoffe zur kryoprotektion von hahnensperma.(German) *Monatsh Veterinaärmedizin* 46:438-440.
- Sexton TJ 1973 Effect of various cryoprotectants on the viability and reproductive efficiency of chicken spermatozoa. *Poultry Sci* 52:1353-1357.
- Tereshchenko AV 1985 Study of the toxic effects of some cryoprotectants on cock spermatozoa using fluorescent stains. *Nauchno-Tekh Bull Ukr Poult Inst* 19:32-36.
- Tselutin K, Seigneurin F, Blesbois E 1999 Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. *Poultry Sci* 78:586-590.
- Wishart GJ 1985 Quantitation of the fertilizing ability of fresh compared with frozen and thawed fowl spermatozoa. *Br Poultry Sci* 26:375-380.
- 박영식 임경순 이용빈 1987 Dimethylacetamide 첨가와 동결 용해방식이 닭 동결정액의 정자생존성과 수정율에 미치는 영향. *Korean J Anim Sci* 29(9):377-382
- 최진석 김성우 신단비 고응규 도윤정 김동훈 공일근 박수봉 2012 N-methylacetamide 동결 보호제가 오계 동결정액의 생존성, 수정 및 부화율에 미치는 영향. *한국가금학회지* 39(4): 291-295.
- 최진석 신단비 고응규 도윤정 변미정 박수봉 성환후 김현 공일근 김성우 2013 닭 정액 동결 시 동결 보호제가 정액 성상에 미치는 영향. *한국가금학회지* 40(3): 171-178. (접수: 2013. 12. 18, 수정: 2014. 2. 13, 채택: 2013. 2. 19)