

## 닭의 품종 간 스트레스 반응 정도 비교 분석

손시환<sup>†</sup> · 조은정 · 박단비 · 장인석 · 문양수

경남과학기술대학교 동물생명과학과

### Comparison of Stress Response between Korean Native Chickens and Single Comb White Leghorns subjected to a High Stocking Density

Sea Hwan Sohn<sup>†</sup>, Eun Jung Cho, Dhan Bee Park, In Surk Jang and Yang Soo Moon

Department of Animal Science and Biotechnology, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 660-758, Korea

**ABSTRACT** With Single Comb White Leghorn (WL) and Korean Native Chicken (KNC) breeds, we compared the stress response with chicken breeds that were subjected to a high stocking density. Stress response was analyzed by the quantity of telomeric DNA, the rate of DNA damage and the expression levels of heat shock proteins (HSPs) and hydroxyl-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase (HMGCR) genes on tissues and blood. The telomere length and telomere shortening rates were analyzed by quantitative fluorescence *in situ* hybridization on the nuclei of lymphocytes and tissues. The DNA damage rate of lymphocytes was quantified by the comet assay. The expression levels of HSP70, HSP90- $\alpha$ , HSP90- $\beta$  and HMGCR genes were measured by quantitative real-time polymerase chain reaction in lymphocytes. There was no significant difference between KNC and WL in body weight, weight gain, telomere shortening rate and DNA damage rate. However, the growth rate significantly decreased in chickens raised under high stocking density conditions, as compared to the control group. The telomere-shortening rate, DNA damage and HSPs expression of the lymphocytes were significantly higher in the high stocking density group than the control. The stress condition and breeds had a significant effect on the expressions of HSP70, HSP90- $\alpha$  and HSP90- $\beta$  in lymphocytes, except HMGCR. The stress response of WL was higher than that of KNC, as analyzed to the expression of HSP70 and HSP90- $\alpha$ . Therefore, we concluded that the chickens which were exposed to a high stocking density had increased the individual physiological stress response regardless of breeds, and White Leghorns are more susceptible to stress condition than Korean Native Chickens.

(Key words : stress response, telomere, DNA damage, HSP, Korean Native Chicken, Leghorn)

## 서 론

일반적으로 동물이 지속적 스트레스를 받게 되면, 체내 대사 복합 체계의 균형이 무너지고, 항산화 방어 체계를 잃어 건강 및 생산성의 저하를 초래하게 된다(Puvadolpirod and Thaxton, 2000). 닭은 사육 기간 동안 많은 환경적 스트레스 요인에 노출되어 있는데 특히, 사육 온도, 사육 밀도 및 사육 형태에 따른 스트레스 반응 정도의 차이는 매우 큰 것으로 알려져 있다(Thaxton et al., 2006; Delezie et al., 2007; Tactacan et al., 2009; Beloor et al., 2010; Keles et al., 2010; Sherwin et al., 2010; Lay et al., 2011; Tuytens et al., 2011; Sohn et al., 2012; 손시환 등, 2011). 이러한 환경적 요인과

더불어 유전적 요인에 따른 스트레스 반응 정도도 품종 및 계통 간에 많은 차이가 있는 것으로 보고되고 있다(Yahav et al., 1998; Deeb and Cahaner, 1999; Albentosa et al., 2003; Fraisse and Cockrem, 2006; Cahaner et al., 2008; de Hass et al., 2013).

닭 품종 간 스트레스 반응 정도에 있어 일반적으로 백색계가 유색계에 비해 스트레스에 보다 민감하게 반응하는 것으로 알려져 있다. 닭이 외부 스트레스에 노출되었을 때 백색계가 유색계에 비해 긴장성 부동(tonic immobility) 시간이 길고(Albentosa et al., 2003), 혈장 코티코스테론 농도가 높으며(Fraisse와 Cockrem, 2006), 깃털 쪼음에 따른 깃털 손상율도 높게 나타나는데 반해(Uitdehaag et al., 2008), 혈장 세

<sup>†</sup> To whom correspondence should be addressed : shsohn@gntech.ac.kr

로토닌(serotonin) 수준은 낮게 나타난다고 보고하였다 (Bolhuis et al., 2009; Uitdehaag et al., 2011; de Haas et al., 2013). 이러한 지표들은 모두 백색계가 유색계에 비해 스트레스 반응 정도가 높음을 의미하는 것으로 특히, 백색 레그혼(White Leghorn) 계통이 로드(Rhode Island Red) 계통에 비해 스트레스 반응 정도가 높다는 결과들을 제시하고 있다(Albentosa et al., 2003; Fraisse와 Cockrem, 2006; Star et al., 2008a; Star et al., 2008b; Uitdehaag et al., 2011). 또한, 선발 육종에 따른 개량화가 진행된 개체일수록 스트레스 반응도가 높다는 결과를 제시하고 있는데, 적색야계(Red Jungle Fowl)와 토종계(village fowl) 및 실용 브로일러를 대상으로 열 스트레스 반응 정도를 비교 분석한 결과, 혈액 생화학 지표, 혈장 코티코스테론 농도, 열스트레스 단백질(HSP 70) 등 모든 생리적 스트레스 지표에서 실용 브로일러가 야계 및 토종계에 비해 스트레스에 더욱 민감하게 반응하는 양상을 보였다 (Soleimani et al., 2011).

닭의 스트레스 반응 정도를 분석하는 방법으로 크게 개체의 행동 습성 관찰에 따른 지표 분석과 스트레스 관련 생리적 표지 물질들의 변화 정도를 분석하는 방법이 있다. 스트레스 반응 관련 행동 습성의 분석으로는 깃털 쪼음 행위 및 긴장성 부동 반응에 대한 지표 분석이 대표적 방법이며(Albentosa et al., 2003; Fraisse와 Cockrem, 2006; Zimmerman et al., 2006; Uitdehaag et al., 2008, 2009), 스트레스와 관련한 생리적 표지 물질의 분석으로서는 혈액 생화학적 지표 (Mashaly et al., 1984; Zulkifli et al., 1999; Thaxton et al., 2006; Turkyilmaz, 2008; Kang et al., 2011; Soleimani et al., 2011), 혈장 코티코스테론 농도(Mashaly et al., 1984; Korte et al., 2005; de Haas et al., 2013, Fraisse와 Cockrem, 2006; Mack et al., 2013), 항산화 요산(antioxidant uric acid) 농도 (Munck et al., 1984; Star et al., 2008a), 혈장 3,5,3'-triiodothyronine 농도(Yahav et al., 1998; Uni et al., 2001; Star et al., 2008a; Mack et al., 2013) 및 세로토닌(5-HT) 농도(Bolhuis et al., 2009; Uitdehaag et al., 2011; de Haas et al., 2013)의 분석 등이 널리 소개되고 있다. 이 밖에도 세포 내 텔로미어(telomere) 함유율, DNA 손상을 및 열 스트레스 단백질(heat shock protein)의 발현율과 같은 DNA 관련 표지들이 개체의 스트레스 정도를 가늠할 수 있는 새로운 생리 표지이다(Sohn et al., 2012). 염색체의 양 말단부를 지칭하는 텔로미어는 세포 분열이 거듭됨에 따라 길이가 짧아지는데, 텔로미어의 감축 양상은 노화가 진행됨에 따라 나타나고, 이의 감축 정도는 사육 환경 및 사양 요인에 의해서 많은 영향을 받는다 (Meeker and Coffey, 1997; Cottliar and Slavutsky, 2001; Von

Zglinicki, 2002; Richter and Proctor, 2007; 이민희 등, 2008; 손시환 등, 2011; 손시환 등, 2013). 이러한 환경 요인들 중 특히, 닭의 밀사와 같은 사육 스트레스가 텔로미어 유실을 가속화 시킨다고 한다(Beloor et al., 2010; Sohn et al., 2012). 세포의 핵 내 DNA 손상을 또한 스트레스 반응 정도를 간접적으로 나타낼 수 있는 지표인데, 개체에 스트레스 요인을 가하게 되면, 세포사(apoptosis)가 촉진되어 DNA 손상(fragmentation) 정도가 급격히 증가된다(Chen et al., 2007). 이와 더불어 최근 개체의 스트레스 반응 정도를 직접적으로 나타낼 수 있는 유전자 표지로서 heat shock protein(HSP) 계열의 유전자 및 hydroxyl-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase (HMGCR) 유전자의 발현율이 소개되고 있는데, 닭에 있어서도 열 스트레스 반응과 관련하여 이들 표지들이 널리 이용되고 있다(Kregel, 2002; Gornati et al., 2004; Beloor et al., 2010; Soleimani et al., 2011; Sohn et al., 2012).

따라서 본 연구에서는 닭의 품종 간 스트레스 반응 정도를 살펴보고자 한국 재래닭 및 단관 백색 레그혼종에 대하여 각각 고밀도 및 표준 밀도로 분리 사육하고, 밀사에 따른 품종 간 스트레스 정도를 비교 분석하였다. 스트레스 지표로서 품종 간 체중 변화, 조직별 세포의 텔로미어 함량, DNA 손상을 및 HSPs 유전자 발현율을 분석하고, 이들 지표들로서 품종 간 스트레스 반응 정도를 비교 고찰하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시 동물 및 분석 시료

품종 간 스트레스 정도를 비교 분석하기 위하여 경남과학기술대학교 종합농장에서 부화하여 사육 중인 단관 백색 레그혼종 순계(Single Comb White Leghorn) 82수 및 한국 재래닭 적갈색종 82수를 비교 대상으로 하였다. 시험계들은 두 품종 공히 40주령 때 고 밀도구(311 cm<sup>2</sup>/수) 및 대조구(540 cm<sup>2</sup>/수)로 분리하고, 50주령까지 10주간 사육하였다. 시험계의 사양 관리는 강제 환기 및 자동 온도 조절 시스템이 완비된 무창 계사 내 2단 4열 케이지 형태로 칸 당 90 cm(W) × 90 cm(L) × 66 cm(H)의 철망 배터리형 케이지에서 사육하였고, 사료 급이는 자유 채식시켰으며, 점등 관리는 16시간 고정 점등하였다.

텔로미어 함량 분석은 혈액, 간, 비장 및 난소 조직을 대상으로 하였으며, DNA 및 HSPs 분석은 혈액으로부터 시료를 분리하여 이용하였다. 혈액은 40주령 및 50령 때 시험구별 무작위로 10수씩 추출하여 각 개체의 익 정맥으로부터 채혈하였고, 각 조직들은 시험 종료 때인 50주령에 동일 개

체들을 대상으로 도살 후 부위별 채집을 하였다. 시험에 관련된 닭의 관리 및 취급은 본 대학 동물실험윤리위원회 (IACUC)의 규정을 준수하였으며, 사전 승인을 받았다.

## 2. Telomeric DNA 함량 분석

형광 접합 보인법(Fluorescence *in situ* Hybridization; FISH)을 위한 표본의 제작은 혈액 세포의 경우, 백혈구만 순수 분리하여 이용하였다. 분리된 세포는 0.06M KCl(Sigma Chem, St Louis, MO, USA)을 이용하여 실온에서 15분간 저장 처리하고, 이후 methanol과 acetic acid가 3:1로 혼합된 고정액으로 고정 처리한 다음, 3회 정도 반복 후 세포액을 슬라이드 위에 떨어뜨려 표본을 제작하였다. 혈액 외 각 조직들은 채집 후 D-PBS(Gibco, Invitrogen Corp. Grand Island, N.Y, USA) 용액으로 세척한 다음 세절하고, RPMI 1640(Gibco) 배양액으로 재세척 후 0.9% sodium citrate(Sigma Chem) 용액으로 저장 처리하였다. 고정 처리는 혈액에서와 동일하게 하고 표본을 제작하였다. 제작된 슬라이드 표본은 RNase(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA)로 처리 후, 에탄올로 탈수 건조시킨 후 FISH에 제공하였다. 접합 처리는 Hybridization 용액(13  $\mu$ L formamide, 5  $\mu$ L hybridization buffer, 200 ng chicken telomeric DNA probe)을 떨어뜨리고, 85°C에서 5분간 변성시킨 후, 38.5°C에서 12시간 이상 정치하였다. 접합 처리된 표본은 2 $\times$  SSC에 72°C, 5분간 처리하고, PN buffer(0.1% sodium phosphate, 0.1% Nonidet P-40)로 세척한 후 형광 접합 탐지를 위해 anti-digoxigenin-fluorescein(Boehringer Mannheim)으로 38.5°C에서 30분간 반응시켰다. PN buffer로 세척 건조한 표본은 propidium iodide solution(Sigma Chem)으로 염색하고, 적녹 파장대의 필터(WIB filter)를 부착한 형광 현미경(Model AX-70, Olympus, Tokyo, Japan)으로 접합 발현 양상을 관찰하였다. 관찰한 임의의 간기 핵들을 디지털 카메라(Model DP-70, Olympus, Tokyo, Japan)로 촬영하고, 이를 컴퓨터에 저장 후 이미지 분석 프로그램(MetaMorph<sup>®</sup>, UIC, Pennsylvania, USA)을 이용하여 개체 별 최소 100개 이상의 세포를 대상으로 핵 대비 telomeric DNA 함량을 분석하였다.

## 3. DNA 손상율 분석

DNA 손상율은 Comet assay로 분석하였다. 1% agrose로 도포한 슬라이드에 혈액과 0.5% low melting point agarose (LMPA)를 1:7.5로 혼합한 용액을 떨어뜨려 표본을 제작하고, 이를 냉장 상태로 굳혔다. 굳은 표본을 다시 1% LMPA로 도포한 후 4°C lysis solution(2.5 M NaCl, 100 mM diso-

dium EDTA, 10 mM Trizma base)에 60분간 침지하였다. Lysis solution을 제거한 다음, 전기영동 장치에 electrophoresis buffer(pH>13)를 채우고, 10분 정도 침지한 후, 25 V, 300 mA로 30분간 전기영동하였다. 건조된 슬라이드는 propidium iodide solution으로 5분간 염색하고, 냉장 초자수로 수세 후 형광 현미경으로 관찰하였다. 관측된 상은 디지털 카메라로 촬영하고, 개체 별 20개의 세포를 대상으로 Comet Score software v1.5(TriTek Corp. Sumerduck, VA, USA)로 분석하였다. 분석 항목으로는 tail 내 DNA 함유율(% DNA in tail; tail intensity/total comet intensity  $\times$  100), tail 내 DNA 생성률(tail moment; % DNA in tail  $\times$  tail length) 및 올리브 모먼트 (olive moment; tail intensity  $\times$  total length/total comet intensity)를 조사하였다.

## 4. HSP 및 HMGCRC 유전자 발현 분석

시험계들의 HSPs 및 HMGCRC 유전자 발현 분석을 위하여 개체의 혈액으로부터 RNA를 분리하였다. 채혈 직후 Histopaque(Sigma Chem)을 이용하여 순수 백혈구를 분리하였고, 분리한 백혈구 세포는 QIAamp<sup>®</sup> RNA Blood Mini Kit(Qiagen GmbH, Hilden, Germany)를 이용하여 RNA를 추출하고, cDNA를 합성하였다. Real-time PCR을 위한 primer 제작은 reference gene(Actin) 및 HSP70, 90- $\alpha$ , 90- $\beta$  및 HMGCRC을 표적 유전자(target gene)로 하여 primer-dimer가 형성되지 않도록 제작하였다(Table 1). Quantitative PCR은 real-time PCR machine (Model LC480, Roche, Mannheim, Germany)을 이용하여 cDNA 5  $\mu$ L(10 ng/ $\mu$ L), primer(5 pmol/ $\mu$ L) 각각 0.5  $\mu$ L, SYBR Green(Roche, GmbH, Mannheim, Germany) 10  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 5  $\mu$ L를 넣어 최종 volume이 20  $\mu$ L이 되도록 하고, 95°C에서 5분 처리하여 최초 변성시킨 후 95°C 10초 변성, 60°C 30초 접합, 72°C 10초간 신장 반응을 40회 반복하면서 진행 중 실시간 형광 모니터링하였다. Tm 값의 측정은 LightCycler<sup>®</sup> 480 software v1.5(Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany)를 이용하여 분석하였다. Reference gene을 이용한 각 표적 유전자의 상대적 정량 값은 Livak과 Schmittgen(2001)이 제시한 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 방법으로 분석하였다.

## 5. 통계 분석

시험구 간 체중, telomeric DNA 함량, DNA 손상율, HSPs 및 HMGCRC 유전자 발현율의 통계 분석은 2  $\times$  2 요인 시험 설계에 따라 SAS 통계 패키지(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)의 GLM procedure를 이용하여 품종 간, 사육 밀도 간 및 품종  $\times$  사육 밀도에 대한 유의성을 검정하고, 요인별 차

**Table 1.** The primers of HSPs for the semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

Genes	Primer	Sequence(5'-3')	Size(bp)	Tm(°C)
HSP70	Forward	ATGCTAATGGTATCCTGAACG	145	60
	Reverse	TCCTCTGCTTTGTATTCTCTG		
HSP90 $\alpha$	Forward	CAGAAGATGAAGAGAAGAAGA	133	60
	Reverse	GGAGAAGTTACCAAGCGATT		
HSP90 $\beta$	Forward	TGTAGTAATGGCGAACCTAA	84	60
	Reverse	TCAGAGCGTAAGACCTAAC		
HMGCR	Forward	GAGGCAGAGCAAGATGAAG	113	60
	Reverse	GCAGGACAGTAGGTGAGT		
Actin	Forward	CCACCGCAAATGCTTCTA	96	60
	Reverse	GCCAATCTCGTCTTGTTTATG		

이를 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 밀사 스트레스에 따른 품종 간 체중 변화

한국 재래닭(KNC)과 단관 백색 레그혼(WL) 종을 대상으로 시험 기간 동안 품종 별 대조구와 고밀도 스트레스구 간의 체중의 변화를 Table 2에 제시하였다. 시험 결과, 체중 및 증체량에 있어 KNC와 WL의 품종 간 차이는 없는 것으로 나타났으나, 두 품종 공히 밀사에 따른 스트레스구는 대조

구에 비해 유의한 체중의 감량을 나타내었다( $P<0.01$ ). 사육 밀도뿐만 아니라 사육 온도, 이송, 급이 제한 및 공포적 환경 등 다양한 외적 사양 스트레스가 닭의 생산 능력에 나쁜 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Thaxton et al., 2006; Zimmerman et al., 2006; Delezie et al., 2007; Keles et al., 2010). 특히 고밀도 사육의 경우, 브로일러에서 체중 및 사료 섭취량의 감소뿐만 아니라, 다리 이상 개체 발생 빈도의 증가 등 생산 능력의 저하를 초래한다고 하였다(Shanawany, 1988; Bloor et al., 2010). 또한 고온 스트레스 환경에 노출된 산란계의 경우, 사료 섭취량, 증체량, 산란율, 난중 및 난

**Table 2.** Analysis of variances for the factors affecting to the body weights and weight gains of Korean Native Chickens (KNC) and White Leghorns (WL) in different stocking density

Breed	Stocking density	40 weeks	50 weeks	Gain (40~50)
KNC	Control	1,677.54±53.81	1,566.00±93.43 <sup>a</sup>	133.50±49.47 <sup>b</sup>
	High	1,652.95±33.81	1,282.97±37.84 <sup>b</sup>	370.25±37.02 <sup>a</sup>
WL	Control	1,735.54±34.84	1,575.38±37.83 <sup>a</sup>	150.14±23.20 <sup>b</sup>
	High	1,757.93±25.55	1,205.77±35.99 <sup>b</sup>	508.87±34.68 <sup>a</sup>
Breed means				
KNC		1,665.24±29.80 <sup>b</sup>	1,424.48±34.66	251.87±28.39
WL		1,746.73±20.75 <sup>a</sup>	1,390.58±36.70	329.50±20.74
Stocking density				
	Control	1,706.55±31.34	1,570.68±34.83 <sup>a</sup>	141.82±24.17 <sup>b</sup>
	High	1,705.44±20.99	1,244.37±26.94 <sup>b</sup>	439.56±25.36 <sup>a</sup>
Breed(B)		*	N.S	N.S
Stocking(S)		N.S	**	**
B×S <sup>1</sup>		N.S	N.S	N.S

<sup>a,b</sup> Values (means±S.D) with different superscripts within the same column significantly differ ( $P<0.05$ ).

<sup>1</sup> B×S is interaction effect of breed and stocking density.

\*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ .

질 등 거의 모든 생산 형질에서 나쁜 결과를 초래한다고 한다(Usayran et al., 2001; Lin et al., 2004; Mashaly et al., 2004). 한편, 닭의 외적 스트레스가 품종 간 생산 능력에 미치는 영향에 대한 연구로서 4계통의 산란계를 공시하고, 열 스트레스 및 LPS 처리에 따른 사료 섭취량, 체중, 산란율, 난중 및 난각 두께를 비교한 바 처리에 따른 계통 간 반응 양상은 거의 유사하였고, 단지 반응 정도에 있어 일부 형질에서 계통 간 약간의 차이가 있었음을 제시하였다(Star et al., 2008b). 이상의 연구 보고들과 같이 본 시험에서도 고밀도 사육과 같은 외적 사양 관리 스트레스는 닭의 성장에 직접적인 영향을 미치는 것으로 보이나, 품종 간 체중 감량에 기인된 스트레스 반응 정도의 차이는 거의 없는 것으로 사료된다.

## 2. 밀사 스트레스에 따른 품종 간 Telomeric DNA 함량 비교

KNC와 WL의 백혈구, 간, 비장 및 난소 세포에 대한 상대적 telomeric DNA 함유율을 측정하고, 품종 간 및 사육 밀도 간 분석 결과를 Table 3에 제시하였다. 분석 결과, 시험 개시 시기인 40주령의 백혈구 세포의 텔로미어 함량은 두 품종 공히 시험구별 차이가 나타나지 않았으나, 시험 종료 때인 50주령의 경우, KNC와 WL 모두 고밀도 사육구에서

유의적으로 낮은 텔로미어 함유율을 나타내었으며, 시험 기간 동안 텔로미어의 감축을 또한 고밀도에서 유의적으로 높게 나타냈다. 또한, 품종 간에 있어 40주령과 50주령 모두 레그혼이 재래닭에 비하여 백혈구세포의 텔로미어 함유율이 높게 나타났으나, 시험 기간 동안 품종 간 텔로미어 감축율의 차이는 없는 것으로 나타났다. 더불어 비장 세포의 경우에도 두 품종 공히 고밀도구가 대조구에 비해 유의하게 낮은 텔로미어 함유율을 보였으나, 간이나 난소 세포의 경우에는 처리 간 차이가 없었다. 이러한 결과는 백혈구 및 비장 조직의 경우, 면역과 직접적 관련이 있는 세포들로서 다른 조직과 달리 외적 스트레스 요인에 매우 민감하게 작용하여 텔로미어 감축에 큰 영향을 받는 것으로 여겨진다. 한편, 모든 조직에서 품종과 사육 밀도 간 상호 작용이 없는 것으로 분석되어 각 요인들이 독립적으로 텔로미어 함유율에 영향을 미치는 것으로 사료된다. 이러한 결과는 닭의 고밀도 사육에 따른 밀사 스트레스가 세포 내 텔로미어의 감축을 촉진시킨다는 여러 보고와 일치되는 양상으로 외적 스트레스 요인이 텔로미어 감축 속도에 직접적으로 영향함을 재차 입증하였다(Beloor et al., 2010; Sohn et al., 2012; 손시환 등, 2011). 닭의 품종 간 및 계통 간 텔로미어 길이에 대한 변이 연구는 거의 찾아보기 어려웠으나, 본 연구 결과,

**Table 3.** Analysis of variances for the factors affecting to the relative amount of telomeric DNA of chicken tissues in Korean Native Chickens (KNC) and White Leghorns (WL) with different stocking density

Breed	Stocking density	Blood			Liver (50 wks)	Spleen (50 wks)	Ovary (50 wks)
		40 wks	50 wks	Telomere shortening rate			
KNC	Control	1.69±0.03	1.59±0.04 <sup>b</sup>	0.18±0.04 <sup>b</sup>	1.42±0.04	1.47±0.03	1.74±0.05
	High	1.67±0.03	1.30±0.03 <sup>a</sup>	0.33±0.02 <sup>a</sup>	1.36±0.06	1.32±0.05	1.82±0.06
WL	Control	1.77±0.04	1.59±0.03 <sup>b</sup>	0.17±0.03 <sup>b</sup>	1.49±0.04	1.44±0.08	1.88±0.05
	High	1.73±0.02	1.40±0.03 <sup>a</sup>	0.32±0.02 <sup>a</sup>	1.41±0.05	1.32±0.04	1.76±0.03
Breed means							
	KNC	1.67±0.03 <sup>b</sup>	1.38±0.04 <sup>b</sup>	0.29±0.03	1.39±0.05	1.40±0.04	1.78±0.06
	WL	1.74±0.03 <sup>a</sup>	1.48±0.03 <sup>a</sup>	0.26±0.03	1.45±0.05	1.38±0.06	1.82±0.04
Stocking density							
	Control	1.73±0.04	1.59±0.04 <sup>a</sup>	0.17±0.04 <sup>b</sup>	1.39±0.05	1.45±0.04 <sup>a</sup>	1.78±0.06
	High	1.70±0.03	1.34±0.03 <sup>b</sup>	0.32±0.02 <sup>a</sup>	1.45±0.05	1.32±0.04 <sup>b</sup>	1.82±0.04
Breed(B)		*	**	N.S	N.S	N.S	N.S
Stocking(S)		N.S	**	**	N.S	*	N.S
B×S <sup>1</sup>		N.S	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S

<sup>a,b</sup> Values (means±S.D) with different superscripts within the same column significantly differ ( $P<0.05$ ).

<sup>1</sup> B×S is interaction effect of breed and stocking density.

\*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ .

텔로미어 길이는 유전적 차이로 인해 품종 간 변이가 존재하는 것으로 사료된다. 이상의 결과로부터 한국 재래닭과 단관 백색 레그혼종 간 텔로미어 함유율은 유전적 요인에 의해 본질적으로 다소의 차이가 있는 것으로 보이나, 스트레스와 같은 외적 요인에 의한 반응 정도에는 큰 차이가 없는 것으로 사료된다.

### 3. 밀사 스트레스에 따른 품종 간 DNA 손상을 비교

닭 품종 별 고밀도 사육구와 대조구 간에 스트레스 반응 정도를 살펴보고자 혈액 세포 내 DNA 손상을 Comet assay 방법으로 분석하고, 이의 결과를 Table 4에 제시하였다. 일반적으로 개체들이 스트레스에 노출되면 세포들의 DNA 손상이 급격히 증가되어 apoptosis가 촉진된다(Chen et al., 2007; Sohn et al., 2012). 따라서 세포의 DNA 손상을 분석은 스트레스 반응 정도를 간접적으로 나타낼 수 있는 지표로서 Comet assay는 DNA 파손 정도를 분석하는 방법이다. Comet assay의 분석 값으로 전체 핵 대비 DNA 파손율을 나타내는 % DNA in tail, tail 내 DNA 생성률을 제시하는 Tail Moment 및 DNA 파손 분포와 정도를 상대적으로 나타내는 Olive Moment가 있다. 분석 결과, 닭 품종 별 고밀도 사육구와 대조구 간에 공히 밀사구가 대조구에 비해 모든 Comet 지표에서 유의적으로 높은 분석 값을 나타내었다. 한편, 품종 간

DNA 손상 정도는 모든 지표에서 차이가 없는 것으로 분석되었다. 또한 품종과 시험구 간 상호 작용이 없는 것으로 분석되어, 각각 독립적 요인인 것으로 나타났다. 따라서 밀사와 같은 환경적 스트레스가 품종에 관계없이 세포 내 DNA 손상을 유의하게 증가시키는 것으로 보이나, WL과 KNC 간에 스트레스에 따른 품종 간 DNA 손상 정도의 차이는 없는 것으로 사료된다.

### 4. 밀사 스트레스에 따른 품종 간 HSP 및 HMGCR 유전자 발현량 비교

본 연구에서 분석한 heat shock protein(HSP)들은 환경적 스트레스, 특히 열 스트레스에 반응하여 합성되는 특이 단백질이고(Schlesinger, 1986; Zulkifli et al., 2002), hydroxyl-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase(HMGCR)는 cortisol의 생합성을 조절하는 인자이다(Gornati et al., 2004). 따라서 개체의 스트레스 정도가 높아지면, HSP 및 HMGCR의 발현율이 증대함으로써, 상대적으로 개체의 스트레스 정도를 가늠할 수 있는 척도라 하겠다(Gornati et al., 2004; Beloor et al., 2010; Sohn et al., 2012). 따라서 본 연구에서는 닭 품종별 고밀도 사육구와 대조구 간에 혈액 및 간 조직으로부터 HSP70, HSP90- $\alpha$ , HSP90- $\beta$  및 HMGCR 유전자의 mRNA 발현율을 분석 비교하여 이의 결과를 Table 5와 6에 제시하

**Table 4.** Analysis of variances for the factors affecting to the DNA fragmentation of chicken blood cells by the Comet-assay in Korean Native Chickens (KNC) and White Leghorns (WL) with different stocking density

Breed	Stocking density	% in tail	Tail moment	Olive moment
KNC	Control	37.02±1.27 <sup>bc</sup>	39.15±3.55 <sup>ab</sup>	42.78±6.42 <sup>ab</sup>
	High	49.46±3.32 <sup>a</sup>	46.74±5.22 <sup>a</sup>	53.41±7.99 <sup>a</sup>
WL	Control	33.90±1.31 <sup>c</sup>	33.84±3.55 <sup>bc</sup>	29.25±3.01 <sup>b</sup>
	High	44.91±1.27 <sup>ab</sup>	48.42±2.58 <sup>a</sup>	64.05±3.08 <sup>a</sup>
Breed means				
KNC		43.81±2.29	43.29±4.39	48.28±7.21
WL		39.40±1.29	41.13±3.07	46.65±3.05
Stocking density				
Control		35.46±1.29 <sup>b</sup>	36.50±4.39 <sup>b</sup>	36.01±7.21 <sup>b</sup>
High		47.39±2.30 <sup>a</sup>	47.50±3.07 <sup>a</sup>	58.24±3.04 <sup>a</sup>
Breed(B)		N.S	N.S	N.S
Stocking(S)		**	**	**
B×S <sup>1</sup>		N.S	N.S	N.S

<sup>a,b</sup> Values (means±S.D) with different superscripts within the same column significantly differ ( $P<0.05$ ).

<sup>1</sup> B×S is interaction effect of breed and stocking density.

\*\*  $P<0.01$ .

**Table 5.** Analysis of variances for the factors affecting to the expression of HMGCR and HSPs genes of liver cells in Korean Native Chickens (KNC) and White Leghorns (WL) with different stocking density

Sources	HMGCR		HSP90- $\alpha$		HSP90- $\beta$		HSP70	
Breed means								
KNC	2.55±0.30 <sup>†</sup>	(1.54) <sup>‡</sup>	10.36±0.48 <sup>b</sup>	(4.89)	-2.13±0.42 <sup>b</sup>	(2.75)	3.96±0.36 <sup>b</sup>	(2.35)
WL	2.65±0.27	(1)	12.57±0.04 <sup>a</sup>	(1)	-1.58±0.16 <sup>a</sup>	(1)	5.20±0.35 <sup>a</sup>	(1)
Stocking density								
Control	2.55±0.46	(1)	12.08±0.23 <sup>a</sup>	(1)	-2.15±0.21	(1)	5.31±0.30 <sup>a</sup>	(1)
High	2.13±0.46	(1.65)	10.82±0.45 <sup>b</sup>	(7.44)	-2.43±0.37	(0.80)	3.99±0.41 <sup>b</sup>	(2.86)
Breed(B)	N.S		**		**		**	
Stocking(S)	N.S		**		N.S		**	
B×S <sup>1</sup>	N.S		N.S		N.S		N.S	

<sup>a,b</sup> Values (means±S.D) with different superscripts within the same column significantly differ ( $P<0.05$ ).

<sup>1</sup> B×S is interaction effect of breed and stocking density.

<sup>†</sup>  $\Delta$ Ct value which is equal to the difference in threshold cycles for target and internal control gene.

<sup>‡</sup>  $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$  value which indicates the fold change in gene expression relative to the control.

\*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ .

**Table 6.** Analysis of variances for the factors affecting to the expression of HMGCR and HSPs genes of lymphocytes in Korean Native Chickens (KNC) and White Leghorns (WL) with different stocking density

Sources	HMGCR		HSP90- $\alpha$		HSP90- $\beta$		HSP70	
Breed means								
KNC	2.19±0.28 <sup>†</sup>	(1.27) <sup>‡</sup>	10.38±0.39 <sup>b</sup>	(3.59)	-2.10±0.39 <sup>b</sup>	(2.72)	4.01±0.21 <sup>b</sup>	(1.84)
WL	2.54±0.45	(1)	12.23±0.16 <sup>a</sup>	(1)	-1.55±0.17 <sup>a</sup>	(1)	4.97±0.26 <sup>a</sup>	(1)
Stocking density								
Control	2.71±0.44	(1)	12.30±0.21 <sup>a</sup>	(1)	2.11±0.21	(1)	5.19±0.24 <sup>a</sup>	(1)
High	2.01±0.29	(1.50)	10.29±0.34 <sup>b</sup>	(3.86)	2.43±0.35	(0.96)	3.85±0.24 <sup>b</sup>	(2.38)
Breed(B)	N.S		**		**		**	
Stocking(S)	N.S		**		N.S		**	
B×S <sup>1</sup>	N.S		N.S		N.S		*	

<sup>a,b</sup> Values (means±S.D) with different superscripts within the same column significantly differ ( $P<0.05$ ).

<sup>1</sup> B×S is interaction effect of breed and stocking density.

<sup>†</sup>  $\Delta$ Ct value which is equal to the difference in threshold cycles for target and internal control gene.

<sup>‡</sup>  $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$  value which indicates the fold change in gene expression relative to the control.

\*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ .

었다. 분석 결과, WL과 KNC의 HSP70, HSP90- $\alpha$ , HSP90- $\beta$  및 HMGCR 유전자의 발현 양상이 혈액과 간 조직에서 거의 유사한 결과 형태를 보였으며, HMGCR을 제외한 대부분의 유전자들에서 품종 간 및 사육 밀도 간 발현량의 차이를 나타내었다. 품종 간에 있어 KNC가 WL에 비하여 HSP90- $\alpha$ , HSP90- $\beta$  및 HSP70의 유전자 발현율이 유의적으로 높게 나타났고, 고밀도 사육 처리구가 대조구에 비해 HSP90- $\alpha$  및 HSP70의 발현율이 높게 나타났었다. 닭의 HSP 계열 중 여러

단백질이 스트레스 연관 표지로 알려지고 있으나, Sohn 등 (2012)은 HSP90- $\alpha$  유전자 발현량이 밀사 스트레스에 유의적 표지임을 제시한 바 있고, Soleimani 등(2011)은 열 스트레스에 있어 HSP70이 강력한 스트레스 표지임을 보고하였다. 본 연구에서도 밀사 스트레스에 따른 HSP 계열의 단백질 중 HSP70 및 HSP90- $\alpha$  만이 유의적 차이를 보이고 있어 이전 연구들과 유사한 결과를 보이고 있다. 이러한 결과를 토대로 Table 7에서는 밀사에 따른 품종 별 스트레스 반응

**Table 7.** Comparison of stress response for the stocking density between Korean Native Chickens and White Leghorns as analyzed with expressions of HMGCR and HSPs genes of lymphocytes

	Korean Native Chicken				White Leghorn			
	Control		High density		Control		High density	
	$\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	$\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	$\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	$\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
HMGCR	2.41±0.32	1	1.97±0.25	1.36	3.02±0.56	1	2.05±0.34	1.96
HSP90- $\alpha$	11.36±0.30 <sup>a</sup>	1	9.40±0.50 <sup>b</sup>	3.89	13.26±0.13 <sup>a</sup>	1	11.20±0.17 <sup>b</sup>	4.17
HSP90- $\beta$	-2.76±0.22	1	-3.23±0.56	1.38	-1.46±0.21	1	-1.63±0.13	1.13
HSP70	4.43±0.16	1	3.74±0.27	1.62	5.97±0.31 <sup>a</sup>	1	3.97±0.21 <sup>b</sup>	4.00

<sup>a,b</sup> Values (means±S.D) with different superscripts within the same row in each breed significantly differ ( $P<0.05$ ).

$\Delta Ct$  is equal to the difference in threshold cycles for target and internal control gene.

$2^{-\Delta\Delta Ct}$  indicates the fold change in gene expression relative to the control.

정도를 HSPs 발현율로 제시하였다. 분석 결과, 두 품종 공히 밀사에 따라 HSP90- $\alpha$  유전자 발현량이 유의적으로 증가하였고, HSP70의 경우, WL에서만 차이를 보였으며, 반응 정도는 공히 WL이 KNC에 비해 높게 나타났다. 이러한 양상은 적색야계와 토종닭 및 실용 브로일러를 대상으로 열 스트레스 반응 정도를 비교 분석한 연구에서도 유사한 결과를 보였다. 즉, 동일 연령 및 동일 체중의 품종들을 열 스트레스구와 대조구로 비교 분석한 바, 모든 환경에서 공히 야계 및 토종닭들이 육종 개량화된 실용 브로일러에 비해 HSP70의 발현율이 높았으나, 열 스트레스에 따른 반응 정도는 실용 브로일러가 현저하게 높게 나타났다고 하였다 (Soleimani et al., 2011). 이밖의 많은 연구에서 닭의 품종 및 계통 간 열 적응력의 유전적 차이가 있음을 보고하였고, 더불어 야계 및 열대지방의 토종닭들이 브로일러에 비해 월등히 높은 열 적응력을 가졌다고 하였다 (Yahav et al., 1998; Deeb and Cahaner, 1999; Zulkifli et al., 1999; Sandercocock et al., 2006; Cahaner et al., 2008). 일반적으로 선발 육종을 통해 개량이 진행된 개체의 스트레스 반응 정도가 자연 상태의 개체들에 비해 상대적으로 높은 것으로 알려지고 있다. 또한 백색 레그혼 계통과 유색계의 스트레스 저항성 비교에서도 행동 습성에 따른 지표뿐만 아니라, 생리적 표지 물질들의 분석에서 백색계가 유색계에 비해 스트레스 반응 정도가 민감하다고 하였다 (Albentosa et al., 2003; Fraisse and Cockrem, 2006; Star et al., 2008a; Bolhuis et al., 2009; Uitdehaag et al., 2011; de Haas et al., 2013). 이상의 결과들을 종합하여 볼 때, 품종과 관계없이 닭에 있어 고밀도 사육이 개체들에 민감한 환경적 스트레스 요인임을 시사하고, 품종 간 스트레스의 반응 정도는 분석 항목 간 다소의 차이는 있으나, 대체적으로 WL이 KNC에 비해 스트레스에 보다

민감하게 반응하는 것으로 사료된다.

## 적 요

본 연구에서는 닭의 품종에 따른 개체의 스트레스 반응 정도를 알아보고자 한국 재래닭과 단관 백색 레그혼종을 공시하고, 고밀도 사육에 따른 생리적 스트레스 표지 값을 비교 분석하였다. 스트레스 반응 정도는 혈액과 각 조직별 세포들에 대한 텔로미어 함량, DNA 손상을 및 열 스트레스 단백질(HSPs) 유전자의 발현율을 분석하고 비교하였다. 텔로미어 함량 및 감축율은 양적 형광 접합 보인법으로 분석하였고, DNA 손상은 Comet assay로 분석하였다. 열 스트레스 단백질 유전자 발현율은 HSP70, HSP90- $\alpha$ , HSP90- $\beta$  및 HMGCR을 표적으로 하여 real-time PCR로 분석하였다. 분석 결과, 한국 재래닭과 단관 백색 레그혼 간 품종에 따른 체중, 증체량, 텔로미어 감축율 및 DNA 손상의 차이는 없는 것으로 나타났다. 그러나 고밀도 사육과 같은 스트레스 사양 관리는 품종에 상관없이 닭의 성장을 저해하고, 텔로미어 감축 및 DNA 손상을 촉진시키는 것으로 나타났다. 한편, HMGCR을 제외한 HSPs 유전자 발현율의 경우, 밀사 사육에 따른 요인뿐만 아니라, 품종 간에도 유의적 차이를 보였다. HSPs의 분석에 따른 스트레스 정도는 단관 백색 레그혼종이 한국 재래닭에 비해 보다 민감하게 반응하는 것으로 나타났다. 따라서 품종과 관계없이 닭에 있어 고밀도 사육이 강한 환경적 스트레스 요인임을 시사하고, 품종 간 스트레스의 반응 정도는 레그혼종이 한국 재래닭에 비해 다소 높은 것으로 사료된다.

(색인어 : 스트레스 반응, 텔로미어, DNA 손상율, 열 스트레스 단백질, 한국재래닭, 레그혼)



## 사 사

본 논문은 차세대 바이오그린21 사업(과제 번호 : PJ0079-812011) 및 2013년도 경남과학기술대학교 기성회 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

## REFERENCES

- Albentosa MJ, Kjaer JB, Nicol CJ 2003 Strain and age differences in behaviour, fear response and pecking tendency in laying hens. *Br Poult Sci* 44(3):333-344.
- Beloor J, Kang HK, Kim YJ, Subramani VK, Jang IS, Sohn SH, Moon YS 2010 The effect of stocking density on stress related genes and telomeric broiler chickens. *Asian-Aust J Anim Sci* 23:437-443.
- Bolhuis JE, Ellen ED, Van Reenen CG, De Groot J, Napel JT, Koopmanschap RE, De Vries Reilingh G, Uitdehaag KA, Kemp B, Rodenburg TB 2009 Effects of genetic group selection against mortality on behavior and peripheral serotonin in domestic laying hens with trimmed and intact beaks. *Physiol Behav* 97:470-475.
- Cahaner A, Ajuh JA, Siegmund-Schultze M, Azoulay Y, Druyan S, Zárate AV 2008 Effects of the genetically reduced feather coverage in naked neck and featherless broilers on their performance under hot conditions. *Poult Sci* 87(12):2517-2527.
- Chen JH, Hales CN, Ozanne SE 2007 DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative? *Nucleic Acids Res* 35:7417-7428.
- Cotliar AS, Slavutsky IR 2001 Telomeres and telomerase activity: their role in aging and in neoplastic development. *Medicina* 61:335-342.
- de Haas EN, Kemp B, Bolhuis JE, Groothuis T, Rodenburg TB 2013 Fear, stress, and feather pecking in commercial white and brown laying hen parent-stock flocks and their relationships with production parameters. *Poult Sci* 92(9):2259-2269.
- Deeb N, Cahaner A 1999 The effects of naked neck genotypes, ambient temperature, and feeding status and their interactions on body temperature and performance of broilers. *Poult Sci* 78(10):1341-1346.
- Delezie E, Swennen Q, Buyse J, Decuyper E 2007 The effect of feed withdrawal and crating density in transit on metabolism and meat quality of broilers at slaughter weight. *Poult Sci* 86:1414-1423.
- Fraisse F, Cockrem JF 2006 Corticosterone and fear behaviour in white and brown caged laying hens. *Br Poult Sci* 47(2):110-119.
- Gornati R, Papis E, Simona R, Genciana T, Marco S, Giovanni B 2004 Rearing density influences the expression of stress-related genes in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Gene* 341:111-118.
- Kang SH, Ko YH, Moon YS, Sohn SH, Jang IS 2011 Effects of the combined stress induced by stocking density and feed restriction on hematological and cytokine parameters as stress indicators in laying hens. *Asian-Aust J Anim Sci* 24(3):414-420.
- Keles H, Fidan AF, Cigerci IH, Kucukkurt I, Karadas E, Dundar Y 2010 Increased DNA damage and oxidative stress in chickens with natural Marek's disease. *Vet Immunol Immunopathol* 133(1):51-58.
- Korte SM, Koolhaas JM, Wingfield JC, McEwen BS 2005 The Darwinian concept of stress: Benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. *Neurosci Biobehav Rev* 29:3-38.
- Kregel KC 2002 Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol* 92(5):2177-2186.
- Lay DC Jr, Fulton RM, Hester PY, Karcher DM, Kjaer JB, Mench JA, Mullens BA, Newberry RC, Nicol CJ, O'Sullivan NP, Porter RE 2011 Hen welfare in different housing systems. *Poult Sci* 90(1):278-294.
- Lin H, Mertens K, Kemps B, Govaerts T, De Ketelaere B, De Baerdemaeker J, Decuyper E, Buyse J 2004 New approach of testing the effect of heat stress on eggshell quality: Mechanical and material properties of eggshell and membrane. *Br Poult Sci* 45:476-482.
- Livak KJ, Schmittgen TD 2001 Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> method. *Methods* 25(4):402-408.
- Mack LA, Felver-Gant JN, Dennis RL, Cheng HW 2013 Genetic variations alter production and behavioral responses following heat stress in 2 strains of laying hens. *Poult Sci* 92(2):285-294.

- Mashaly MM, Hendricks GL 3rd, Kalama MA, Gehad AE, Abbas AO, Patterson PH 2004 Effect of heat stress on production parameters and immune responses of commercial laying hens. *Poult Sci* 83:889-894.
- Mashaly MM, Webb ML, Youtz SL, Roush WB, Graves HB 1984 Changes in serum corticosterone concentration of laying hens as a response to increased population density. *Poult Sci* 63(11):2271-2274.
- Meeker AK, Coffey DS 1997 Telomerase: a promising marker of biological immortality of germ, stem, and cancer cells. *Biochemistry* 62:1323-1331.
- Munck A, Guyre PM, Holbrook NJ 1984 Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr Rev* 5:25-44.
- Puvadolpirod S, Thaxton JP 2000 Model of physiological stress in chickens 4. Digestion and metabolism. *Poult Sci* 79:383-390.
- Richter T, Proctor C 2007 The role of intracellular peroxide levels on the development and maintenance of telomere-dependent senescence. *Exp Gerontol* 42:1043-1052.
- Sandercock DA, Hunter RR, Mitchell MA, Hocking PM 2006 Thermoregulatory capacity and muscle membrane integrity are compromised in broilers compared with layers at the same age or body weight. *Br Poult Sci* 47:322-329.
- Schlesinger JM 1986 Heat shock proteins. *J Cell Biol* 103:321-325.
- Shanawany MM 1988 Broiler performance under high stocking densities. *Br Poult Sci* 29:43-52.
- Sherwin CM, Richards GJ, Nicol CJ 2010 Comparison of the welfare of layer hens in 4 housing systems in the UK. *Br Poult Sci* 51(4):488-499.
- Sohn SH, Subramani VK, Moon YS, Jang IS 2012 Telomeric DNA quantity, DNA damage, and heat shock protein gene expression as physiological stress markers in chickens. *Poult Sci* 91(4):829-836.
- Soleimani AF, Zulkifli I, Omar AR, Raha AR 2011 Physiological responses of 3 chicken breeds to acute heat stress. *Poult Sci* 90(7):1435-1440.
- Star L, Decuyper E, Parmentier HK, Kemp B 2008a Effect of single or combined climatic and hygienic stress in four layer lines: 2. Endocrine and oxidative stress responses. *Poult Sci* 87(6):1031-1038.
- Star L, Kemp B, van den Anker I, Parmentier HK 2008b Effect of single or combined climatic and hygienic stress in four layer lines: 1. Performance. *Poult Sci* 87(6):1022-1030.
- Tactacan GB, Guenter W, Lewis NJ, Rodriguez-Lecompte JC, House JD 2009 Performance and welfare of laying hens in conventional and enriched cages. *Poult Sci* 88(4):698-707.
- Thaxton JP, Dozier WA 3rd, Branton SL, Morgan GW, Miles DW, Roush WB, Lott BD, Vizzier-Thaxton Y 2006 Stocking density and physiological adaptive response of broilers. *Poultry Sci* 85(5):819-824.
- Turkyilmaz MK 2008 Effect of stocking density on stress reaction in broiler chickens during summer. *Turk J Vet Anim Sci* 32(1):31-36.
- Tuytens FA, Sonck B, Staes M, Van Gansbeke S, Van den Bogaert T, Ampe B 2011 Survey of egg producers on the introduction of alternative housing systems for laying hens in Flanders, Belgium. *Poult Sci* 90(4):941-950.
- Uitdehaag KA, Rodenburg TB, van Hierden YM, Bolhuis JE, Toscano MJ, Nicol CJ, Komen J 2008 Effects of mixed housing of birds from two genetic lines of laying hens on open field and manual restraint responses. *Behav Processes* 79(1):13-18.
- Uitdehaag KA, Rodenburg TB, Van Reenen CG, Koopmanschap RE, De Vries Reilingh G, Engel B, Buist WG, Komen H, Bolhuis JE 2011 Effects of genetic origin and social environment on behavioral response to manual restraint and monoamine functioning in laying hens. *Poult Sci* 90(8):1629-1636.
- Uitdehaag KA, Rodenburg TB, Bolhuis JE, Decuyper E, Komen H 2009 Mixed housing of different genetic lines of laying hens negatively affects feather pecking and fear related behaviour. *Appl Anim Behav Sci* 116:58-66.
- Uni Z, Gal-Garber O, Geyra A, Sklan D, Yahav S 2001. Changes in growth and function of chick small intestine epithelium due to early thermal conditioning. *Poult Sci* 80(4):438-445.
- Usayran N, Farran MT, Awadallah HHO, Al-Hawi LR, Asmar RJ, Ashkarian VM 2001 Effects of added dietary fat and phosphorus on the performance and egg quality of laying hens subjected to a constant high environmental temperature.

- Poult Sci 80:1695-1701.
- Von Zglinicki, T 2002 Oxidative stress shortens telomeres. Trends Biochem Sci 27:339-344.
- Yahav S, Luger D, Cahaner A, Dotan M, Rusal M, Hurwitz S 1998 Thermoregulation in naked neck chickens subjected to different ambient temperatures. Br Poult Sci 39(1):133-138.
- Zimmerman PH, Lindberg AC, Pope SJ, Glen E, Bolhuis JE, Nicol CJ 2006 The effect of stocking density, flock size and modified management on laying hen behaviour and welfare in a non-cage system. Appl Anim Behav Sci 101: 111-124.
- Zulkifli I, Norma MTC, Israf DA, Omar AR 2002 The effect of early-age food restriction on heat shock protein 70 response in heat-stressed female broiler chickens. Br Poultry Sci 43(1):141-145.
- Zulkifli I, Dass RT, Norma MT 1999 Acute heat stress effects on physiology and fear-related behaviour in red jungle fowl and domestic fowl. Can J Anim Sci 79:165-170.
- 손시환 장인석 손보람 2011 계사 사육 형태가 산란계의 생 산성과 스트레스 반응에 미치는 영향. 한국가금학회지 38 (4):305-313.
- 손시환 조은정 장인석 문양수 2013 육계에서 비타민 C 및 E 의 첨가 급여가 성장 능력과 스트레스 반응에 미치는 영 향. 한국가금학회지 40(1):31-40.
- 이민희 이상호 김영주 고영현 장인석 문양수 최양호 손시환 2008 산란계에 항산화 물질 급여가 텔로미어 함량 및 난 질에 미치는 영향. 한국가금학회지 35(3):267-274. (접수: 2014. 5. 8, 수정: 2014. 6. 10, 채택: 2014. 6. 17)