

토종 종계를 이용한 이면 교배조합 계통 간 스트레스 반응정도 비교 분석

조은정 · 박지애 · 최은식 · 손시환[†]

경남과학기술대학교 동물생명과학과

Comparison of Stress Response in Diallel Crossed Korean Domestic Chicken Breeds

Eun Jung Cho, Ji Ae Park, Eun Sik Choi and Sea Hwan Sohn[†]

Dept. of Animal Science and Biotechnology, Gyeongsang National University of Science and Technology, Jinju 660-758, Korea

ABSTRACT To establish a new synthetic Korean meat chicken breed, we tested 5×5 diallel cross mating experiment with domestic chicken breeds. Comparing stress responses among diallel crossed chicken breeds, we analyzed telomere length, DNA damage and expressions of heat shock protein genes (HSPs) as the markers of the stress response. The telomere length was measured by quantitative fluorescence *in situ* hybridization on the nuclei of lymphocytes. The expression levels of HSP-70, HSP-90 α and HSP-90 β genes were analyzed by quantitative real-time polymerase chain reaction in lymphocytes. The DNA damage rate of lymphocytes was quantified by the comet assay known as the single cell gel electrophoresis. In results, there were significant differences in the values of the stress markers such as telomere length, HSPs and DNA damage rate, and also were significant differences in viabilities and body weights among the 5×5 diallel crossed chicken breeds. The telomere shortening rate, expression values of HSPs and DNA damage rate were significant low in W and Y crossed chickens compare to the others, but GG pure breed showed the highest values in the 25 crossed chickens. Estimating correlation coefficient, the survival rate positively correlated to telomere length, but negatively correlated to the expression levels of HSP-70, HSP-90 α , HSP-90 β genes and to the value of % DNA in tail as DNA damage rate. The expression levels of HSP-70, HSP-90 α and HSP-90 β genes of dead chickens had significantly higher than those of survival chickens. According to the results on the stress marker analysis, it would be considered that the crossed breeds had more stress resistant than the pure breeds, and the crossed chickens with a light strain such as W or Y were relatively resistant to stress, but the crossed chickens with a heavy strain such as G, H, F were susceptible to stress.

(Key words : domestic chicken, diallel cross, stress response, telomere, DNA damage, HSPs)

서 론

국내 닭고기 소비량은 매년 증가하는 추세로 국내 실용계의 사육수수와 더불어 종계의 사육수수도 지속적으로 증가하고 있다. 하지만 국내에서 사용되고 있는 종계의 경우, 육계는 약 90%, 산란계는 거의 100%를 수입에 의존하고 있다. 현재 국내 닭 생산체계는 외국으로부터 원종계(Grand Parent Stock; GPS) 및 종계(Parent Stock; PS)를 수입하여 국내에서 일부 종계와 실용계(Commercial Chicken; CC)를 생산하고, 농가들은 이들 회사들로부터 CC를 구입 또는 계약 사육으로 생산된 닭들을 판매하는 구조이다. 수입 종계의 대부분은 외국의 몇몇 제한된 글로벌 종계회사에서 시판되는 것으로, 이들 종계들의 육종 정보나 순계의 반출은 엄격히 금지

함에 따라 이를 이용한 독자적 개량이나 계통 조성은 불가능하다. 가금 산업에서 병아리 가격이 생산비의 많은 부분을 차지하고 있고, 보유 유전자원에 대한 권리가 점점 더 강화되고 있는 시점에서 국산 종계 개발은 시급히 해결해야 할 과제이다. 국내 사육 환경과 국민 기호에 맞는 국산 종계의 개발은 국내 닭 종자의 해외 예속 문제 해결뿐만 아니라, 농가 소득 증대에도 크게 도움을 줄 것이다. 소비자의 요구와 기호에 맞고 경제성이 우수한 닭 생산을 위해서는 생산 능력이 높고 육질이 우수하며, 외적 스트레스와 질병 저항성이 강한 개체의 선발과 육종이 요구된다.

닭은 사육 환경에 따른 다양한 스트레스를 받는 것으로 알려져 있고, 특히 사육 밀도, 사육 온도 및 사육 형태에 의한 스트레스 반응 정도가 매우 다른 것으로 나타난다(Dele-

[†] To whom correspondence should be addressed : shsohn@gntech.ac.kr

zie et al., 2007; Tactacan et al., 2009; Beloor et al., 2010; Sherwin et al., 2010; Lay et al., 2011; Sohn et al., 2011; Sohn et al., 2014). 스트레스의 반응 정도는 환경적 요인뿐만 아니라, 유전적 요인에 따른 품종 및 계통 간에도 차이가 있다고 알려져 있다(Albentosa et al., 2003; Fraisse and Cockrem, 2006; de Hass et al., 2013; Sohn et al., 2014; Sohn et al., 2015). 가금류에 있어 스트레스 반응 정도 측정에 생리적 스트레스 지표로 가장 널리 이용되고 있는 것이 부신피질호르몬의 일종인 코르티코스테론(corticosterone)의 수준과 heterophil:lymphocyte의 비율(H/L ratio)이다(Beuving and Vonder, 1978; Gross and Siegel, 1983; Davis and Sipoes, 1987; Gross, 1989; Maxwell, 1993; Zulkifli et al., 1995; Fraisse and Cockrem, 2006; Rimoldi et al., 2015). 그러나 이러한 생화학적 지표는 측정 변이나 개체 변이가 큼에 따라 최근에는 스트레스 관련 유전자 표지들이 스트레스 예측 지표로 소개되고 있는데, 텔로미어 함유율이나 DNA 손상을 및 열 스트레스 단백질 발현율 등이 새롭게 제시되고 있다(Kregel, 2002; Gornati et al., 2004; Chen et al., 2007; Beloor et al., 2010; Sohn et al., 2012). 텔로미어는 진핵세포 염색체 말단부의 단순 반복 염기서열로 노화가 진행됨에 따라 이의 길이가 짧아진다(Cottliar and Slavutsky, 2001). 또한 텔로미어 길이의 감축 정도는 유전적 요인뿐만 아니라, 환경적 요인에 의해 많은 영향을 받는 것으로 보고되고 있다(Meeker and Coffey, 1997; Richter and Proctor, 2007; Sohn and Subramani, 2014). 특히, 닭에 있어 환경 스트레스 중 밀사 스트레스는 텔로미어 유실을 급격히 촉진시킨다고 하였다(Beloor et al., 2010; Sohn et al., 2012; Sohn et al., 2014). 열 스트레스 단백질(Heat Shock Proteins; HSPs) 유전자의 발현을 또한 중요한 스트레스 반응 표지로 알려져 있다. HSPs는 1962년 Ritossa가 열을 가한 초파리에서 처음 발견한 단백질로 70kDa 및 26kDa의 열 스트레스 단백질을 최초로 분리하여 보고하였다(Ritossa, 1962). 열 스트레스 단백질은 크기와 역할에 따라 HSP-60 family, HSP-70 family, HSP-90 family 및 low molecular protein family 등으로 분류되며, 전체 세포 단백질량의 5% 정도를 차지한다고 알려져 있다(Tissières, 1974). 일반적으로 동물 세포나 기관이 스트레스에 노출되면 대부분의 다른 단백질은 합성이 억제되나, HSPs는 특이적으로 빠르게 합성된다고 한다. HSPs는 세포의 항상성에 중요한 역할을 하며, 고온이나 중금속, 산화 스트레스 등에 의해 발현량이 증가하며, 원핵·진핵 생물의 모든 세포에서 검출된다(Craig, 1985; Li and Laszlo, 1985; Lindquist, 1986; Lindquist and Craig, 1988; Young et al., 2001; Powers and Workman, 2007). 특히, HSP-70은 스

트레스에 가장 민감하게 반응하는 열 스트레스 단백질로 닭에 있어서도 제한급여, 수송, 격리와 같은 스트레스원에 노출되면 HSP-70 유전자의 발현이 현저하게 상승한다고 한다(Kamboh et al., 2013; Zulkifli et al., 2014). 고온에 노출된 닭은 HSPs 유전자의 발현 증가뿐만 아니라, 체중감소, 사료요구율, 산란수, 난중, 난각두께의 감소와 같은 생산능력 저하와 더불어 폐사율 상승, 육질 저하, 출하체중 도달 시기 지연과 같이 전반적인 생산비를 상승시킨다(Muiruri and Harrison, 1991; McCurdy et al., 1996; Woelfel et al., 2002; Al-Fataftah and Abu-Dieyeh, 2007; Felver-Gant et al., 2012; Kamboh et al., 2013). 생명체의 내·외적 스트레스는 세포의 사멸 및 DNA 손상을 촉진한다고 알려져 있다(Chen et al., 2007). 따라서 세포 핵 내 DNA 손상을 또한 스트레스 반응 정도를 나타내는 간접 지표로 DNA 손상 정도는 Comet assay 방법으로 쉽게 분석이 가능한데, 이는 표본 세포나 조직을 agarose로 덮고 파손된 DNA를 전기영동한 후 이미지를 정량하는 방법이다(Singh et al., 1988). Comet assay란 형광 염색된 세포 형상이 혜성의 모습을 닮아 붙여진 이름으로 DNA 이동 길이, DNA 파손에 기인된 Comet tail의 길이 및 양에 따라 DNA 손상 정도를 측정한다(Lee and Steinnert, 1995; Ryu et al., 1997; Lew et al., 2004). Comet assay는 세포 분열 주기에 영향을 받지 않으며, 분석 시간이 짧고, 다양한 종류의 세포에 적용이 가능하여 산화적 스트레스, 유전 독성 시험 등에 널리 이용되고 있다. 조류에서도 다양한 연구분야에 적용되고 있는데, 중금속 노출에 의한 DNA 손상 정도 분석(Baos et al., 2006) 및 닭고기의 품질을 평가하는 rapid test로 활용(Faullimel et al., 2005) 되고있으며, 닭의 산화 스트레스와도 밀접한 관계가 있음을 보고하고 있다(Frankic et al., 2006).

따라서 본 연구에서는 국산 중계 개발을 위하여 생산능력과 더불어 스트레스에 강한 우수 계통을 선발하고자 국내 H사에서 보유 중인 토종 순계 5계통을 이면 교잡하여 생산된 25계통을 대상으로 스트레스 표지인 텔로미어 함량과 감축율, HSPs 발현율 및 DNA 손상율을 분석하여 교배조합 간 스트레스 반응정도를 살펴보고 또한 이들 스트레스 지표와 생존율과의 관련성을 비교 고찰하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물 및 분석 시료

국내 H사가 보유하고 있는 토종 순계 5계통 H, G, F, W, Y를 이용하여 5×5 이면교잡으로 생산된 암컷 1,802수를 대

상으로 경남과학기술대학교 종합농장에서 2014년 11월 19일부터 2015년 8월 27일까지 40주간 사육하고, 교배조합별 스트레스 반응 정도를 분석하였다. 이들 순계들은 1980년대 초반 H사가 도입한 외래 순계를 기반으로 H, G, F의 경우, Cornish를 기반으로 산육성 종계로 고정시켰고, W와 Y의 경우 New Hampshire 등 몇 가지 겸용종이 혼입된 난육겸용종으로 고정된 종자이다. 스트레스 정도의 측정은 10주, 20주 및 40주령 때 교배조합별 각 20수씩의 혈액을 채취하여 분석에 공시하였다. 모든 시험계들의 사양관리는 동일한 조건으로 사육하였는데, 육성기(0~15주)의 사양 관리는 강제 환기 및 자동 온도 조절 시스템이 완비된 무창 계사 내 3단 2열 배터리형 케이지에 사육하였고, 사육밀도는 수당 약 220 cm²로 하였다. 사료 급여는 전 조합 공히 시중 배합 초생추 사료로 자유급이하고, 점등 관리는 점감 점증하여 16주령에 총 16시간으로 고정하였다. 이후 산란기 사양 관리는 종계사료 이송 후 2단 4열 케이지에 칸당 12수씩 수당 580 cm²의 밀도로 사육하였으며, 사료 급여는 H사의 체중별 육용종계 권장 급여량에 따라 종계사료로 제한 급여를 실시하였다. 그 밖의 백신 접종 등 기타 사양관리는 H사의 종계 사양 관리지침에 따라 수행하였으며, 시험에 관련된 닭의 관리 및 취급은 본 대학 동물실험윤리위원회 (IACUC)의 규정을 준수하여 시행하였다.

2. 텔로미어 함유율 분석

각 교배조합 계군의 텔로미어 함유율 분석을 위하여 Sohn et al.(2012)이 제시한 형광접합보인법(Fluorescence *in situ* Hybridization; FISH)을 일부 변형하여 적용하였다. 먼저, telomeric DNA probe의 제작을 위해 CCCTAA가 7번 반복된 단일 oligomers를 primer로 이용하여 PCR하고 Dig-PCR probe synthesis kit(Roche, Mannheim, Germany)로 labeling하였다.

FISH를 위한 표본의 제작은 Ficoll을 이용하여 혈액 내 백혈구만을 분리하고, 이를 0.06M KCl(Sigma Chem, St Louis, MO, USA)을 이용하여 실온에서 15분간 저장 처리 후 Carnoy's 액으로 고정처리 하였다. 제작된 슬라이드 표본은 RNase (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA)로 37°C에서 30분간 처리하여 RNA를 제거하고, 70%, 80%, 100% 에탄올로 탈수 건조시켰다. 준비된 표본에 hybridization 용액(13 μL formamide, 5 μL hybridization buffer, 200 ng chicken telomeric DNA probe)을 떨어뜨리고 85°C에서 5분간 변성시킨 후 38.5°C에서 12시간 이상 정치하였다. 접합 처리된 표본은 72°C의 2× SSC에 5분간 침지한 후 PN buffer(0.1% sodium phosphate, 0.1% Nonidet P-40)로 세척하고, anti-digoxigenin-fluorescein (Boehringer Mannheim)으로 형광 접합 후 다시 PN buffer로 세척 건조한 다음, propidium iodide solution(Sigma Chem)으로 염색하였다. 완성된 표본은 적녹 파장대의 필터를 부착한 형광현미경(Model AX-70, Olympus, Tokyo, Japan)으로 간기의 핵들을 관찰하고, 이를 디지털 카메라(Model DP-70, Olympus, Tokyo, Japan)로 촬영하였다. 촬영된 표본을 대상으로 개체별 100개 이상의 간기 핵에 대해 이미지 분석 프로그램 (MetaMorph[®], UIC, Pennsylvania, USA)을 이용하여 핵 내 텔로미어 함유율을 측정하였다.

3. HSPs 유전자 발현 분석

교배조합 계군의 HSPs 유전자 발현 분석을 위하여 각 개체의 혈액으로부터 RNA를 분리하였다. 채혈한 전혈을 이용하여 QIAamp[®] RNA Blood Mini Kit(Qiagen GmbH, Hilden, Germany)로 RNA를 추출하고, cDNA를 합성하였다. Real-time PCR을 위한 primer 제작은 reference gene(RPL27) 및 HSP-70, -90α, -90β를 target gene으로 하여 Table 1과 같이 제작하였다. Quantitative-PCR은 real-time PCR machine(Model

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

Gene	Primer	Sequence(5'-3')	Size (bp)	Tm (°C)
RPL27	Forward	GCGCATTGGAGCGGCTGTGT	81	60
	Reverse	CCTCCGTGGGTAGCGGTCG		
HSP-90α	Forward	GGAGAAGTTACCAAGCGATT	133	60
	Reverse	CAGAAGATGAAGAAGAGAAGA		
HSP-90β	Forward	GCAGGACAGTAGGTGAGT	113	60
	Reverse	GAGGCAGAGCAAGATGAAG		
HSP-70	Forward	TCCTCTGCTTTGTATTCTCTG	145	60
	Reverse	ATGCTAATGGTATCCTGAACG		

LC480, Roche, Mannheim, Germany)을 이용하여 cDNA 5 μ L (10 ng/ μ L), primer(5 pmol/ μ L) 각각 0.5 μ L, SYBR Green (Roche, GmbH, Mannheim, Germany) 10 μ L, ddH₂O 5 μ L를 넣어 최종 volume이 20 μ L가 되도록 하고, 95°C에서 5분 처리하여 최초 변성시킨 후 95°C 10초 변성, 60°C 30초 접합, 72°C 10초간 신장 반응을 40회 반복하면서 실시간 형광 모니터링 하였다. Tm값의 측정은 LightCycler[®] 480 software v1.5 (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany)를 이용하였다. Reference gene을 이용한 각 분석 대상 유전자의 상대적 정량값은 Livak and Schmittgen(2001)이 제시한 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법으로 측정하였다.

4. DNA 손상율 분석

DNA 손상율은 단일세포 전기영동법으로 알려진 Comet assay로 분석하였다. 1% agrose로 도포한 base 슬라이드에 분리한 백혈구 세포와 0.5% low melting point agarose(LMPA)를 혼합한 용액을 떨어뜨려 cover glass로 덮고 냉장 상태로 굳힌 다음 다시 1% LMPA에 침지하였다. 이 후 암소에서 4°C lysis solution(2.5M NaCl, 100 mM disodium EDTA, 10 mM Trizma base)으로 60분간 처리한 다음 alkaline electrophoresis buffer(pH>13)를 채운 전기영동장치에 10분 정도 정지하고, 30분간 전기영동 하였다(25V, 300mA, 4°C). 전기영동이 끝난 슬라이드는 70% 알코올로 세척하고, 건조된 슬라이드는 propidium iodide solution으로 5분간 염색하고, 냉장 초자수로 세척 후 형광현미경으로 관찰하였다. 관찰된 상은 디지털 카메라로 촬영하고, 개체별 50개의 세포를 대상으로 Comet Score software v1.5(TriTek Corp. Sumerduck, VA, USA)로 분석하였다. 분석 항목으로는 tail내 DNA 함유율(%

DNA in tail; tail intensity/total comet intensity \times 100), tail내 DNA 생성률(tail moment; % DNA in tail \times tail length) 및 올리브 모먼트(olive moment; tail intensity \times total length/total comet intensity)를 측정하였다.

5. 통계분석

교배조합 계군 간 생존율, 텔로미어 함유율, HSPs 유전자 발현율 및 DNA 손상율의 평균값의 비교는 SAS 통계패키지 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)의 GLM procedure를 이용하여 one-way ANOVA 방법으로 유의성 검정을 하고, 이들 간의 다중검정은 Tukey's HSD procedure로 검정하였다. 계군의 스트레스 표지와 생존율과의 상관성 분석은 동일 통계패키지로 Pearson's correlation coefficient를 산출하고, 이들의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 교배조합 계통 간 텔로미어 함량 및 체중 비교

5 \times 5 이면교잡에 따른 25개 교배조합 계통들의 20주령 텔로미어 함유율은 Table 2와 같고, 이들 개체들의 10주령부터 40주령까지 텔로미어 함량의 감축율은 Table 3과 같다. 분석 결과, 텔로미어 함유율 및 텔로미어 감축율 모두 교잡 계통 간에 유의한 차이를 보였다. 25개의 교잡구 중 WY 교잡 계통이 다른 교잡 계통에 비해 유의적으로 높은 텔로미어 함량을 나타내었으며, 가장 낮은 텔로미어 감축율을 보였다. 반면, 가장 낮은 텔로미어 함유율은 FG 교잡 계통이었으며, 텔로미어 감축율은 GG 순계가 가장 높게 나타났다. 대체적으로 Y 및 W를 부계로 한 교잡종들이 F, G, H를 부계로 이

Table 2. The amount of telomeric DNA in 5 \times 5 diallel crossed chickens at 20 wks

♀ \ ♂	H	G	F	Y	W	Total
H	2.40 ^{2,3,4}	2.37 ^{2,3,4}	2.38 ^{2,3,4}	2.49 ^{1,2,3}	2.44 ^{2,3,4}	2.37 ^b
G	2.34 ^{3,4}	2.37 ^{2,3,4}	2.28 ⁴	2.45 ^{2,3,4}	2.52 ^{1,2}	2.39 ^b
F	2.52 ^{1,2}	2.36 ^{2,3,4}	2.37 ^{2,3,4}	2.40 ^{2,3,4}	2.40 ^{2,3,4}	2.42 ^{ab}
Y	2.39 ^{2,3,4}	2.48 ^{1,2,3}	2.44 ^{2,3,4}	2.44 ^{2,3,4}	2.63 ¹	2.49 ^a
W	2.35 ^{2,3,4}	2.41 ^{2,3,4}	2.32 ^{3,4}	2.40 ^{2,3,4}	2.36 ^{2,3,4}	2.37 ^b
Total	2.41 ^{AB}	2.38 ^{AB}	2.34 ^B	2.45 ^A	2.45 ^A	2.41 (SEM:±0.01)

^{1~4} The values with different number within the 25 crossed chicken breeds significantly differ.

^{ab} The values with different letter within column significantly differ.

^{A,B} The values with different letter within row significantly differ.

Table 3. The telomere shortening rate from 10 weeks to 40 weeks in 5×5 diallel crossed chickens

♀ \ ♂	H	G	F	Y	W	Total
H	0.92 ^{1,2,3}	0.79 ³	0.79 ³	0.99 ^{1,2,3}	0.89 ^{2,3}	0.89 ^{bc}
G	0.91 ^{1,2,3}	1.20 ¹	0.92 ^{1,2,3}	0.76 ³	0.82 ^{2,3}	0.89 ^{bc}
F	1.11 ^{1,2}	0.90 ^{1,2,3}	0.96 ^{1,2,3}	1.00 ^{1,2,3}	0.92 ^{1,2,3}	0.98 ^{ab}
Y	0.99 ^{1,2,3}	0.84 ^{2,3}	0.77 ³	0.88 ^{2,3}	0.78 ³	0.85 ^c
W	0.95 ^{1,2,3}	1.01 ^{1,2,3}	0.94 ^{1,2,3}	1.04 ^{1,2,3}	0.99 ^{1,2,3}	0.99 ^a
Total	0.98 ^A	0.93 ^{AB}	0.87 ^B	0.94 ^{AB}	0.88 ^B	0.92 (SEM:±0.01)

^{1~3} The values with different number within the 25 crossed chicken breeds significantly differ.

^{a~c} The values with different letter within column significantly differ.

^{A,B} The values with different letter within row significantly differ.

용한 교잡종에 비해 텔로미어 함량이 높게 나타나고, 모계로는 Y를 이용한 교잡종이 상대적으로 높은 텔로미어 함량을 보였으며, 텔로미어 감축율에서도 비슷한 경향을 나타내었다. 또한 각 순계와 이들의 교잡계 간 텔로미어 함유율에서 거의 모든 교잡구가 순계구에 비해 높은 텔로미어 함유율을 보이며, 더불어 텔로미어 감축율 또한 낮게 나타났다. 이는 텔로미어 함유율에 있어 잡종강세 효과를 시사하는 것으로 전체 순계구의 20주령 평균 텔로미어 함유율은 2.39인 반면, 교잡구는 2.42로서 약 10.3%의 잡종강세율을 보이고 있다. 한편, 공시한 교잡 계통 전수를 대상으로 20주령 개체 체중을 측정하고, 이들의 평균값을 Table 4에 제시하였다. 체중 분석 결과, H, G, F 계통 간 9개의 교잡구는 고 체중, Y, W 계통 간 4개의 교잡구는 저 체중, 나머지 12개의 교잡구는 중 체중으로 뚜렷이 구분되는 양상을 나타내었다. 따라서 텔

로미어 함량과 체중 간의 연관성을 살펴본 바 저 체중구에서 상대적으로 높은 텔로미어 함유율을 보이고, 고 체중구에서 낮은 함유율을 나타내며, 감축율 또한 고 체중구가 저 체중구에 비해 높게 나타나는 경향이 있었다. 이러한 결과는 초기 성장 속도가 빠른 브로일러와 같은 계통들이 상대적으로 성장 속도가 느린 재래종에 비해 텔로미어 감축이 크다는 사실과 일치하는 양상이다(Sohn and Subramani, 2014). 최근 Sohn et al.(2014)은 한국재래계와 화이트레그혼종에서 품종 간 및 사육밀도 간 텔로미어의 함량 차이가 있음을 보고하였고, 또한 동일 사육조건의 국내 토종닭 12계통의 품종 및 계통 간에도 텔로미어 함유율의 차이가 있었으며, 텔로미어 함량과 스트레스 반응 정도 간의 관련성을 제시하였다(Sohn et al., 2015). 이러한 연구 결과와 더불어 본 연구에서도 25개의 교잡 계통 간 텔로미어 함유율의 차이가 존재하였고, 체중의 차

Table 4. The body weights of 5×5 diallel crossed chickens at 20 wks

♀ \ ♂	H	G	F	Y	W	Total
H	2,560 ^{1,2}	2,746 ¹	2,659 ¹	2307 ^{3,4}	2,203 ^{3,4}	2,489 ^a
G	2,737 ¹	2,595 ¹	2,767 ¹	2,360 ^{2,3}	2,261 ^{3,4}	2,545 ^a
F	2,650 ¹	2,639 ¹	2,701 ¹	2,332 ^{3,4}	2,229 ^{3,4}	2,503 ^a
Y	2,289 ^{3,4}	2,303 ^{3,4}	2,264 ^{3,4}	1,646 ⁵	1,615 ⁵	2,091 ^b
W	2,129 ⁴	2,250 ^{3,4}	2,282 ^{3,4}	1,586 ⁵	1,602 ⁵	1,970 ^c
Total	2,428 ^B	2,492 ^{AB}	2,518 ^A	2,048 ^C	1,975 ^D	2,295 (SEM:±13.29)

^{1~5} The values with different number within the 25 crossed chicken breeds significantly differ.

^{a~c} The values with different letter within column significantly differ.

^{A~D} The values with different letter within row significantly differ.

이도 뚜렷하게 나타났다. 따라서 이들 조합 중 Y, W 계통 간 교잡 자손들이 높은 텔로미어 함유율과 낮은 체중으로 인해 외적 스트레스에 저항력이 강한 계종으로 판단되고, 고 체중의 H, G, F의 순계 계통들이 상대적으로 낮은 텔로미어 함유율을 보이며, 스트레스에 민감한 계종으로 판단된다.

2. 교배조합 계통 간 HSPs 유전자 발현량 비교

Heat shock proteins(HSPs)들은 열 스트레스에 반응하여 합성되는 단백질로서 열 스트레스 정도가 높아지면 조직과 혈액 내 HSP의 발현율이 상승한다(Schlesinger, 1986; Zulkifli et al., 2002; Gornati et al., 2004; Beloor et al., 2010; Sohn et al., 2012). 본 연구에서는 국산 종계 개발을 위한 25

개 교배조합 계통들에 대한 열 스트레스 반응 정도를 비교 분석하고자 HSP-70, HSP-90 α 및 HSP-90 β 의 mRNA 발현량을 분석하고, 이의 결과를 Table 5~7에 제시하였다. 분석 결과, 20주령 시험계들의 HSP-70 유전자 발현량과 HSP-90 α 및 HSP-90 β 의 발현량이 모든 교잡구들 간에 공히 유의한 차이를 보였다. 또한 분석된 HSP-70, HSP-90 α 및 HSP-90 β 의 발현율에 있어 교잡구 간 발현량의 상대적 고저가 거의 비슷한 경향을 보이고 있는데, 모든 표지들에 있어 공히 H, G, F와의 교잡구에서 높은 발현율을 보이고, Y 및 W의 교잡구들이 상대적으로 낮은 발현율을 보였다. 특히, H, G, F의 순계들이 그들과의 교잡계들에 비해 월등히 높은 HSPs의 발현율을 나타내고 있다. 이는 텔로미어 함유율의 결과와 거

Table 5. The expression of HSP-70 gene in 5 \times 5 diallel crossed chickens at 20 wks

♀ \ ♂	H	G	F	Y	W	Total
H	7.62 ¹	0.99 ²	2.47 ^{1,2}	1.50 ^{1,2}	0.65 ²	3.03 ^a
G	2.55 ^{1,2}	7.27 ¹	1.35 ²	2.86 ^{1,2}	0.83 ²	2.87 ^a
F	0.66 ²	0.72 ²	4.00 ^{1,2}	1.99 ^{1,2}	1.12 ²	1.60 ^{ab}
Y	0.74 ²	1.32 ²	1.28 ²	0.47 ²	0.53 ²	0.88 ^b
W	0.67 ²	2.48 ^{1,2}	2.06 ^{1,2}	0.84 ²	0.89 ²	1.40 ^{ab}
Total	2.22 ^A	2.58 ^A	2.65 ^A	1.46 ^{AB}	0.81 ^B	1.98 (SEM:±0.09)

The values are $2^{-\Delta\Delta ct}$ which indicates the fold change in gene expression relative to the control.

^{1,2} The values with different number within the 25 crossed chicken breeds significantly differ.

^{ab} The values with different letter within column significantly differ.

^{A,B} The values with different letter within row significantly differ.

Table 6. The expression of HSP-90 α gene in 5 \times 5 diallel crossed chickens at 20weeks

♀ \ ♂	H	G	F	Y	W	Total
H	0.28 ^{1,2}	0.25 ^{1,2}	0.30 ^{1,2}	0.07 ^{1,2}	0.03 ²	0.20 ^a
G	0.47 ¹	0.36 ^{1,2}	0.03 ²	0.27 ^{1,2}	0.003 ²	0.22 ^a
F	0.06 ^{1,2}	0.04 ²	0.29 ^{1,2}	0.24 ^{1,2}	0.02 ²	0.12 ^{ab}
Y	0.05 ^{1,2}	0.03 ²	0.11 ²	0.06 ^{1,2}	0.002 ²	0.05 ^b
W	0.01 ²	0.26 ^{1,2}	0.08 ^{1,2}	0.33 ^{1,2}	0.14 ^{1,2}	0.16 ^{ab}
Total	0.16 ^{AB}	0.19 ^A	0.18 ^{AB}	0.19 ^A	0.04 ^B	0.15 (SEM:±0.01)

The values are $2^{-\Delta\Delta ct}$ which indicates the fold change in gene expression relative to the control.

^{1,2} The values with different number within the 25 crossed chickens significantly differ.

^{ab} The values with different letter within column significantly differ.

^{A,B} The values with different letter within row significantly differ.

Table 7. The expression of HSP-90β gene in 5×5 diallel crossed chickens at 20 wks

♀ \ ♂	H	G	F	Y	W	Total
H	0.65 ^{2~4}	0.57 ^{2~6}	0.13 ^{4~6}	0.37 ^{2~6}	0.24 ^{3~6}	0.40 ^{ab}
G	0.61 ^{2~5}	0.84 ²	0.32 ^{2~6}	0.55 ^{2~6}	0.45 ^{2~6}	0.55 ^a
F	0.42 ^{2~6}	0.39 ^{2~6}	1.49 ¹	0.40 ^{2~6}	0.28 ^{2~6}	0.58 ^a
Y	0.16 ^{4~6}	0.26 ^{3~6}	0.08 ^{5,6}	0.24 ^{3~6}	0.03 ⁶	0.16 ^c
W	0.03 ⁶	0.75 ^{2,3}	0.36 ^{2~6}	0.34 ^{2~6}	0.02 ⁶	0.3b ^c
Total	0.45 ^A	0.56 ^A	0.39 ^{AB}	0.37 ^{AB}	0.21 ^B	0.4 (SEM:±0.02)

The values are 2^{-ΔΔct} which indicates the fold change in gene expression relative to the control.

^{1~6} The values with different number within the 25 crossed chicken breeds significantly differ.

^{a~c} The values with different letter within column significantly differ.

^{AB} The values with different letter within row significantly differ.

의 유사한 양상으로 텔로미어 함유율, 체중 및 HSPs 발현율로 스트레스 반응 정도를 예측할 때 H, G, F 계통의 자손들이 W, Y 계통의 자손들에 비해 상대적으로 스트레스에 민감한 것으로 판단된다. 품종 간 스트레스 반응 정도에 있어 일반적으로 실용브로일러가 토종닭이나 야계들에 비해서 열 스트레스에 대한 HSP-70의 발현율이 상승하여 육종된 개량종 개체의 스트레스 반응 정도가 자연 상태의 개체들에 비해 상대적으로 높다고 하였다(Yahav et al., 1998; Sandercock et al., 2006; Cahaner et al., 2008; Soleimani et al., 2011; Tamzil et al., 2013). Felver-Gant et al.(2012)은 White Leghorn 유래 실용산란계 두 계통에 열 스트레스를 가했을 때 계통 간 HSP-70 발현율의 유의적 차이가 있고, 스트레스 반응 정도도 다르게 나타난다고 하였으며 또한 종계에 있어서도 주령이나 계통에 따라 HSPs 발현율의 차이가 있음을 보고함에 따라 열 스트레스에 대한 저항성 품종 육종의 가능성을 시사하였다(Yalçin et al., 2001; Tamzil et al., 2013). 한편, Sohn et al.(2015)은 동일 환경 조건하에 국내 재래종 12 품종에 대한 HSP-70, HSP-90α, HSP-90β 및 HMGCR의 발현량을 비교에서 품종 간 뚜렷한 발현량의 차이를 보여 품종 간 스트레스 반응의 정도가 다를 것을 보고하였다.

3. 교배조합 계통 간 DNA 손상율 비교

Comet assay는 내·외부 스트레스 및 유전적, 환경적 요인으로 인한 세포 내 DNA 손상 정도를 비교적 간단하고 빠르게 측정하는 방법이다. Comet assay 측정 지표는 % DNA in tail, tail moment 및 olive moment 3개의 측정 지표가 있으나, 지표 간 거의 비슷한 결과를 나타낸다. 따라서 본 연구에서

는 25개 교배 조합 계통에 대해 DNA 손상 정도를 % DNA in tail로 분석하고, 이의 결과를 Table 8에 제시하였다. 분석 결과, 교잡계통 간 유의한 차이를 보이며, 이들 중 GG 순계가 가장 높은 DNA 손상율을 보인 반면, Y와 W 계통과의 조합구들이 상대적으로 낮은 DNA 손상율을 보였고, 특히 YG 조합은 상반 교잡 모두에서 가장 낮은 DNA 손상율을 나타내었다. 이들 중 모계통으로 Y와의 교잡구들이 대체적으로 낮은 DNA 손상율을 보임으로서 텔로미어 함량 및 HSP 발현율의 결과와 마찬가지로 이들 교잡구가 상대적으로 스트레스 민감도가 낮고, 한편 G나 H를 이용한 교잡 계통들이 DNA 손상율이 높아 스트레스에 민감한 것으로 사료된다. Comet assay를 이용한 DNA 손상도 분석은 독성시험에 널리 이용되고 있으나, 닭의 산화 스트레스가 DNA 손상율을 가속화 시킨다고 보고한 이래 가끔에서 스트레스 반응 척도를 가늠하는 표지로 유용하게 활용되고 있다(Faullimel et al., 2005; Sohn et al., 2012).

4. 생존율과 스트레스 표지 값 간의 상관 분석

25개 교배조합계통에 대한 16주령부터 40주령까지 성계 생존율의 결과를 Table 9에 제시하였다. 교잡계통 전체의 평균생존율은 80% 정도로 매우 저조한 성적을 나타내었고, 특히 고체 중인 H, G 순계의 경우 50% 이하의 극도로 낮은 생존율을 보였다. 이는 30주령 이후 시험계들의 사육시기가 7월에서 8월에 걸침으로 30℃ 이상 폭염에 기인한 폐사수가 급증하였기 때문이다. 한편, 교배조합군 중 고체중 계종인 H, G, F의 순계와 이들의 교잡계군 간에 비슷한 체중임에도 교잡계종들이 순계에 비해 현저하게 높은 생존율을 보이고

Table 8. The rate of DNA damage expressed by % DNA in tail in 5×5 diallel crossed chickens at 20 wks

♀ \ ♂	H	G	F	Y	W	Total
H	30.17 ^{1,2}	28.15 ^{1~3}	25.56 ^{1~3}	23.29 ^{2,3}	26.61 ^{1~3}	26.56 ^a
G	25.55 ^{1~3}	33.12 ¹	27.72 ^{1~3}	21.51 ³	22.05 ³	25.16 ^a
F	27.37 ^{1~3}	25.92 ^{1~3}	27.00 ^{1~3}	25.04 ^{2,3}	26.31 ^{1~3}	26.27 ^a
Y	26.17 ^{1~3}	22.41 ³	22.26 ³	27.70 ^{1~3}	20.92 ³	20.31 ^b
W	26.62 ^{1~3}	25.90 ^{1~3}	26.01 ^{1~3}	27.46 ^{1~3}	26.79 ^{1~3}	26.62 ^a
Total	25.53 ^B	26.44 ^B	27.11 ^A	24.99 ^B	24.21 ^B	25.59 (SEM:±1.43)

^{1~3} The values with different number within the 25 crossed chicken breeds significantly differ.

^{a,b} The values with different letter within column significantly differ.

^{A,B} The values with different letter within row significantly differ.

Table 9. The livability of 5×5 diallel crossed chickens from 16 weeks to 40 weeks

♀ \ ♂	H	G	F	Y	W	Total
H	46.63 ³	67.79 ^{1~3}	86.54 ^{1~3}	94.88 ^{1,2}	78.43 ^{1~3}	74.86
G	63.46 ^{1~3}	50.51 ^{2,3}	88.46 ^{1~3}	73.35 ^{1~3}	86.74 ^{1~3}	72.50
F	80.77 ^{1~3}	65.38 ^{1~3}	69.23 ^{1~3}	83.79 ^{1~3}	85.71 ^{1~3}	76.98
Y	78.74 ^{1~3}	78.33 ^{1~3}	86.43 ^{1~3}	100.00	96.29 ^{1~3}	87.96
W	83.52 ^{1~3}	80.00 ^{1~3}	85.82 ^{1~3}	96.15 ^{1,2}	93.33 ^{1~3}	86.46
Total	71.42 ^{BC}	69.83 ^C	82.54 ^{AB}	90.86 ^A	87.62 ^A	80.14 (SEM:±2.73)

^{1~3} The values with different number within the 25 crossed chicken breeds significantly differ.

^{A~C} The values with different letter within row significantly differ.

있는데, 이는 교잡종의 잡종강세 효과로 보여지고, 순계들의 현저히 낮은 생존율은 근친퇴화(inbreeding depression) 현상에 기인된 결과라 사료된다. 집단의 스트레스 반응 정도를 가늠할 수 있는 가장 대표적인 표지가 생존율이라 하겠다. 따라서 생존율과 텔로미어 함량, HSPs 발현율 및 DNA 손상을 간의 상관관계를 분석하고, 이들 간의 상관계수를 Table 10에 제시하였다. 본 연구에서 분석된 스트레스 표지들의 값과 생존율 간에 모두 유의한 상관계수가 추정되었고, 텔로미어 함량과는 저도의 정(+)의 상관, HSP-70, HSP-90 α , HSP-90 β 및 DNA 손상을과는 중도 및 저도의 부(-)의 상관을 나타내었다. 특히 열 스트레스 표지 유전자들의 발현도와 생존율 간에 다소 높은 부의 상관이 추정됨에 따라 20주령 이후 폭염으로 인해 폐사한 개체와 생존 개체 간 20주령 때 HSPs 발현율 값을 비교 분석하고, 이의 결과를 Table 11에 제시하였다. 분석 결과, 20주령 이후 폐사한 개체의 HSPs

발현율이 이후 생존 개체에 비해 거의 2배 이상 높은 발현율을 보였다. 이러한 결과는 HSPs 유전자 발현율과 생존율 간에 매우 높은 관련성이 있음을 시사하는 것으로 스트레스에 민감한 계통이 폐사율이 높음을 의미한다. 이러한 결과는 고온에 노출된 닭은 HSPs 유전자의 발현 증가와 더불어 산란능력 감소 및 폐사율이 상승한다는 보고와 거의 일치하는 결과이다(Muiruri and Harrison, 1991; Woelfel et al., 2002; Felver-Gant et al., 2012; Kamboh et al., 2013). 본 연구에서 고 체중 종인 H, G, F 계통의 자손들이 경량종인 W, Y 계통의 자손들에 비해 상대적으로 높은 폐사율을 보이고, 분석된 모든 스트레스 지표에서도 높은 수치를 나타냄으로 체중이 무거운 품종일수록 스트레스에 민감한 것으로 판단된다. 체중에 따른 스트레스 민감도의 차이는 타 연구에서도 거의 유사한 결과들을 보고하고 있다(Yahav et al., 1998; Soleimani et al., 2011; Tamzil et al., 2013; Sohn et al., 2015).

Table 10. The correlation coefficients of livability with telomere length, HSPs gene expression values and DNA damage rate in the chickens at 20 wks

	Telomere length	HSP-70	HSP-90α	HSP-90β	% DNA in tail
<i>r</i>	0.16732	-0.28349	-0.17456	-0.29530	-0.14523
<i>p</i>	0.00030	<0.00010	0.00020	<0.00010	0.00950

r is correlation coefficient of livability with marker values.
p is statistical *p*-value.

Table 11. The HSPs gene expression levels of the chickens at 20 wks which will be survived or dead after analysing

	HSP-70	HSP-90α	HSP-90β
Survival chickens after 20 wks	1	1	1
Death chicken after 20 wks	1.96**	3.42**	1.84**

The values are $2^{-\Delta\Delta ct}$ which indicates the fold change in gene expression relative to the control.
 The asterisk(**) within column indicates significant difference at $p < 0.01$.

토종닭 교배조합 계통 간 스트레스 반응 정도를 비교 분석하기 위하여 본 연구에서 이용한 텔로미어 함량, 열 스트레스 유전자인 HSP-70, HSP-90α, HSP-90β의 발현율 및 DNA 손상율은 모든 지표들에서 조합 간에 유의한 차이를 나타내었고, 각 표지들 간의 조합별 발현 양상의 경향치는 거의 비슷하게 나타났다. 따라서 텔로미어 함량, DNA 손상도 및 HSPs 유전자 발현율은 스트레스 민감도와 밀접한 관련이 있는 훌륭한 스트레스 반응 표지로 사료되며, 더불어 생존율과 같은 항병성 및 강건성의 생리적 표지로도 이용 가능함을 시사한다. 이러한 스트레스 표지 분석에 따라 본 연구에 공시된 25개 교잡구 중 경량종인 W, Y 계통의 자손들이 상대적으로 외부 스트레스에 강하고, 고 체중 종인 H, G, F 계통의 자손들이 스트레스에 민감한 것으로 사료된다. 또한 순종에 비해 교잡종들의 스트레스 민감도가 낮게 나타남으로 스트레스 저항성의 잡종강세 현상이 있는 것으로 사료된다.

적 요

본 연구에서는 국산종계 개발을 위하여 5계통의 토종닭 순계를 이용하여 5×5 이면교배조합 시험을 수행하고, 공시된 25계통에 대한 스트레스 반응 정도를 비교 분석하였다. 스트레스 반응정도 표지로 텔로미어 함량 및 감축율, 열 스트레스 단백질 유전자(HSPs)로 HSP-70, HSP-90α, HSP-90β

의 발현율 및 DNA 손상율을 이용하여 분석하였다. 텔로미어 함량은 양적 형광점합보인법을 이용하고, HSPs 발현율은 quantitative real-time PCR 기법으로, DNA 손상율은 Comet assay법을 적용하였다. 분석 결과, 교배조합 25계통 간 텔로미어 함량과 감축율, HSPs 유전자 발현율 및 DNA 손상율 모두에서 유의한 차이를 보였고, 더불어 계통 간 체중 및 생존율에도 유의한 차이가 나타났다. 텔로미어 감축율, HSPs 유전자 발현율 및 DNA 손상을 모든 분석 값에서 W 및 Y 계통과의 교잡구가 다른 교잡구에 비해 유의하게 낮은 값을 보였고, 반면 G계통의 순계구가 가장 높은 값을 나타내었다. 생존율과 스트레스 표지 값들 간의 상관계수를 추정한 결과, 텔로미어 함량과는 저도의 정(+)의 상관, HSP-70, HSP-90α, HSP-90β 및 DNA 손상율과는 중도 및 저도의 부(-)의 상관을 나타내었다. 또한 폐사 개체와 생존 개체 간 HSP-70, HSP-90α 및 HSP-90β의 발현율을 비교 분석한 결과, 폐사 개체의 HSPs 발현율이 생존 개체에 비해 유의하게 높은 발현율을 보였다. 이상 스트레스 표지 값의 분석 결과를 종합할 때, 교잡계들이 순계에 비해 스트레스 저항성이 높은 것으로 판단되고, 더불어 W, Y와 같은 경량종 계통의 교잡계들이 외적 스트레스에 강한 반면, G, H, F와 같은 고체중 계통의 교잡계들은 스트레스에 민감한 것으로 사료된다.

(색인어: 토종닭, 이면교잡, 스트레스 반응, 텔로미어, DNA 손상도, 열스트레스 단백질)

사 사

본 논문은 Golden Seed Project 중축사업(과제 번호: PJ-009924022016) 및 경남과학기술대학교 2015년도 대학회계 연구비 지원으로 수행되었음.

REFERENCES

Albentosa MJ, Kjaer JB, Nicol CJ 2003 Strain and age di-

- ferences in behaviour, fear response and pecking tendency in laying hens. *Br Poult Sci* 44(3):333-344.
- Al-Fataftah AR, Abu-Dieyeh ZHM 2007 Effect of chronic heat stress on broiler performance in Jordan. *Int J Poul Sci* 6(1):64-70.
- Baos R, Jovani R, Pastor N, Tella JL, Jiménez B, Gómez G, González MJ, Hiraldo F 2006 Evaluation of genotoxic effects of heavy metals and arsenic in wild nestling white storks (*Ciconia ciconia*) and black kites (*Milvus migrans*) from southwestern Spain after a mining accident. *Environ Toxicol Chem* 25(10):2794-803.
- 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 length in broiler chickens. *Asian-Aust J Anim Sci* 23:437-443.
- Beuving G, Vonder GM 1978 Effect of stressing factors on corticosterone levels in the plasma of laying hens. *Gen Comp Endocrinol* 35(2):153-159.
- 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.
- Cottliar AS, Slavutsky IR 2001 Telomeres and telomerase activity: Their role in aging and in neoplastic development. *Medicina* 61:335-342.
- Craig EA 1985 The heat shock response. *CRC Crit Rev Biochem* 18: 239-280.
- Davis GS, Siopes TD 1987 Plasma corticosterone response of turkeys to adrenocorticotrophic hormone: Age, dose, and route of administration effects. *Poult Sci* 66(10):1727-1732.
- 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.
- 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.
- Faullimel C, Ennahar S, Aoude-Werner D, Guterl P, Marchioni E 2005 DNA comet assay for the detection of time-temperature abuse during the storage of poultry. *J Food Prot* 68(7):1414-1420.
- Felver-Gant JN, Mack LA, Dennis RL, Eicher SD, Cheng HW 2012 Genetic variations alter physiological responses following heat stress in 2 strains of laying hens. *Poult Sci* 91(7):1542-1551.
- Fraisse F, Cockrem JF 2006 Corticosterone and fear behaviour in white and brown caged laying hens. *Br Poult Sci* 47(2): 110-119.
- Fraisse F, Cockrem JF 2006 Corticosterone and fear behaviour in white and brown caged laying hens. *Br Poult Sci* 47(2): 110-119.
- Frankic T, Pajk T, Rezar V, Levart A, Salobir J 2006 The role of dietary nucleotides in reduction of DNA damage induced by T-2 toxin and deoxynivalenol in chicken leukocytes. *Food Chem Toxicol* 44(11):1838-1844.
- 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.
- Gross WB, Siegel HS 1983 Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. *Avian Dis* 27(4):972-979.
- Gross WB 1989 Factors affecting chicken thrombocyte morphology and the relationship with heterophil:lymphocyte ratios. *Br Poult Sci* 30(4):919-925.
- Kamboh AA, Hang SQ, Bakhregul M, Zhu WY 2013 Effects of genistein and hesperidin on biomarkers of heat stress in broilers under persistent summer stress. *Poult Sci* 92(9): 2411-2418.
- 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.
- Lee RF, Steinert S 1995 Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic

- (marine and freshwater) animals. *Mutat Res* 544(1):43-64.
- Lew SH, Kim DW, Suh JK, Seung IS, Shim JC, Cheong MA, Park JH 2004 Genotoxicity of enflurane in human peripheral blood lymphocytes studied *in vivo* by single cell gel electrophoresis. *Korean J Anesthesiol* 47(2):162-166.
- Li GC, Laszlo A 1985 Amino acid analogs while inducing heat shock proteins sensitize CHO cells to thermal damage. *J Cell Physiol* 122:91-97.
- Lindquist S 1986 The heat-shock response. *Ann Rev Biochem* 55:1151-1191.
- Lindquist S, Craig EA 1988 The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 22:631-677.
- Livak KJ, Schmittgen TD 2001 Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25(4):402-408.
- Maxwell MH 1993 Avian blood leucocyte responses to stress. *World's Poultry Science Journal* 49:34-43.
- McCurdy RD, Barbut S, Quinton M 1996. Seasonal effect on pale soft exudative (PSE) occurrence in young turkey breast meat. *Food Res Int* 29(3):363-366.
- Meeker AK, Coffey DS 1997 Telomerase: A promising marker of biological immortality of germ, stem, and cancer cells. *Biochemistry* 62:1323-1331.
- Muiruri HK, Harrison PC 1991 Effect of roost temperature on performance of chickens in hot ambient environments. *Poult Sci* 70(11):2253-2258.
- Powers MV, Workman P 2007 Inhibitors of the heat shock response: Biology and pharmacology. *FEBS Lett* 581(19): 3758-3769.
- 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.
- Rimoldi S, Lasagna E, Sarti FM, Marelli SP, Cozzi MC, Bernardini G, Terova G 2015 Expression profile of six stress-related genes and productive performances of fast and slow growing broiler strains reared under heat stress conditions. *Meta Gene* 31(6):17-25.
- Ritossa FM 1962 A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18:571-573.
- Ryu JC, Kim HJ, Seo YR, Kim KR 1997 Single cell gel electrophoresis (comet assay) to detect DNA damage and apoptosis in cell level. *Environ Mutagens & Carcinogens* 17:71-77.
- 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.
- 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.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL 1988 A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175(1):184-191.
- Sohn SH, Cho EJ, Park DB, Jang IS, Moon YS 2014 Comparison of stress response between Korean Native Chickens and Single Comb White Leghorns subjected to a high stocking density. *Korean J Poult Sci* 41(2):115-125.
- Sohn SH, Cho EJ, Park JA, Hong YH, Kim CD 2015 Analysis of stress response of domestic chicken breeds for the development of a new synthetic parent stock. *Korean J Poult Sci* 42(2):157-167.
- Sohn SH, Jang IS, Son BR 2011 Effect of housing systems of cage and floor on the production performance and stress response in layer. *Korean J Poult Sci* 38(4):305-313.
- Sohn SH, Subramani VK 2014 Dynamics of telomere length in the chicken. *World's Poultry Science Journal* 70:721-735.
- 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.
- 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.
- Tamzil MH, Noor RR, Hardjosworo PS, Manalu W, Sumantri C 2013 Acute heat stress responses of three lines of chickens with different heat shock protein(HSP)-70 geno-

- types. *Int J Poult Sci* 12(5):264-272.
- Tissières A, Mitchell HK, Tracy UM 1974 Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* 84(3):389-398.
- Woelfel RL, Owens CM, Hirschler EM, Martinez-Dawson R, Sams AR 2002 The characterization and incidence of pale, soft, and exudative broiler meat in a commercial processing plant. *Poult Sci* 81(4):579-584.
- 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.
- Yalçın S, Ozkan S, Türkmüt L, Siegel PB 2001 Responses to heat stress in commercial and local broiler stocks. 1. Performance traits. *Br Poult Sci* 42(2):149-152.
- Young JC, Moarefi I, Hartl FU 2001 Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J Cell Biol* 154(2):267-273.
- Zulkifli I, Najafi P, Nurfarahin AJ, Soleimani AF, Kumari S, Aryani AA, O'Reilly EL, Eckersall PD 2014 Acute phase proteins, interleukin 6, and heat shock protein 70 in broiler chickens administered with corticosterone. *Poult Sci* 93(12):3112-3118.
- 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, Siegel HS, Mashaly MM, Dunnington EA, Siegel PB 1995 Inhibition of adrenal steroidogenesis, neonatal feed restriction and pituitary-adrenal axis response to subsequent fasting in chickens. *Gen Comp Endocrinol* 97(1):49-56.

Received May 11, 2016, Revised Jun. 8, 2016, Accepted Jun. 13, 2016