

우수종돈 암태지 품종별 체내 수정란 생산비교 및 비외과적 수정란 이식에 관한 연구

정용대^{1,*}, 정진영^{1,*}, 사수진^{1,*}, 김기현¹, 유동조¹, 최정우², 장현준³, 박성권⁴, 조은석^{1,†}, 우제석^{1,†}

¹농촌진흥청 국립축산과학원 ²강원대학교 동물생명과학대학 ³단국대학교 약학대학
⁴세종대학교 생명과학대학 식품생명공학과

in vivo Embryo Production and Non-Surgical Embryo Transfer in Different Breed of Superior Sow

Yong-dae Jeong^{1,*}, Jin-Young Jeong^{1,*}, Soo-Jin Sa^{1,*}, Ki-Hyun Kim¹, Dong-Jo Yu¹,

Jung-Woo Choi², Hyun-Jun Jang³, Sungkwon Park⁴, Jae-Seok Woo^{1,†}, Eun-Seok Cho^{1,†}

¹National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, ²College of Animal Life Science, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Republic of Korea, ³College of Pharmacy, Dankook University, 119 Dandae-ro, Cheonan, Chungnam 330-714, Republic of Korea, ⁴Department of Food Science & Technology, Sejong University, Seoul 05006, Republic of Korea

ABSTRACT

Value of excellent breeding animals is important in livestock industry, but their economic life time is limited. And, many countries have been trying procurement of genetic resource in good animals. Therefore, this study was conducted to determine embryo production and to test efficiency of embryo transfer via non-surgical artificial insemination (AI) in different breed of superior sows. A total of 17 sows were used in this experiment (Duroc, n=10; Landrace, n=4; Yorkshire, n=3). The sows were artificially inseminated by semen of same breed boars. After 4 or 5 days following the AI, the embryos were obtained from the sows and then transferred to Landrace and Yorkshire recipients (n=3, respectively) by non-surgical method. The corpora lutea tended to be increased in Yorkshire and Landrace than Duroc(28 and 26 vs. 17, respectively). The recovery of embryo was 78.8% in Landrace, 65.4% in Duroc and 51.4% in Yorkshire. Duroc showed lower morulae and early blastocyst embryos than 2, 4, 8 and 16 cell. The morula in Yorkshire was higher ($P<0.05$) than that of Duroc (4.7 vs. 3.4). Similarly, the morulae and early blastocyst embryos presented greater ($P<0.05$) in Landrace compared with other breed sows. The recipient sows were pregnant in a Landrace only. This reason may be due to little embryos inserted in the recipients. In addition, pregnancy results were limited because of the little sows. In conclusion, ovulated ovum in sows can be affected by different breed. Also, further study needed pregnant test by using the many embryo in each breed.

(Key word: *in-vivo* embryo, non-surgical transfer, different breed, sows)

서론

국내에서 사용되는 종돈은 전량 수입에 의존하고 있으며 2014년에 1,525두, 2015년에 1,873두에 달하고 최근 두당 평균 수입가격은 약200만원으로 년간375억원에 달하고있다. 종돈의 효율적인 관리는 경제적 손실을 감소시킬 수 있는 방법 중 하나이다. 그러나, 최근들어 지속적으로 발생하는 구제역

및 돼지생식기호흡기증후군과 같은 바이러스성 질병의 증가는 종돈의 관리와 활용에 문제점을 야기시키고 있다 이에 우수한 종돈의 보존을 위해 2-3개 지역으로 나누어 생축으로 보존관리하고 있으나 산발적 및 전국적 질병확산 시 종돈보존에 취약점을 나타낼 수 있으며 그 보존비용은 연간 수억원이 소요되고 있는 실정이다. 따라서, 생축보존과 같이 높은 비용이 소모되는 방법보다는 상대적으로 저렴한 비용으로 가능한

* These authors contributed equally to this paper

† Corresponding authors contributed equally to this paper

† Corresponding author: Eun-Seok Cho, Jae-Seok Woo

Tel: 041-580-3457

E-mail: segi0486@korea.kr

수정란이식기술이 이용되고 있다.

수정란 이식기술은 우수한 유전능력을 보유한 공란돈에서 많은 수정란을 채란한 뒤 수란축에 이식하여 생산성이 높은 유전형질을 가진 가축을 생산하는 방법이다. 축산업에서 수정란이식기술은 효과적인 우수종돈의 생산을 가능하게 하지만 수정란의 생산 및 이식과정에서 배아에 손상을 야기할 수 있기 때문에 그 적용은 제한적이다 (Rátky et al., 2001). 특히, 양돈산업에서 수정란이식은 질병의 원천으로부터 위생적인 축군을 확보하고 (Martin, 1983, Randall et al., 1999), 유전자 다양성이 적은 집단에 새로운 유전자 도입을 위해 활용되고 있다 (Cameron et al., 1989). 경제수명이 다한 우수한 종돈의 유전자원의 보호 및 확보를 위해 제한적으로 사용되고 있다 (Brüssow et al., 1989; Kerr et al., 1984; Martin:1983).

국내에서는 멸종위험성이 높은 재래돼지 유전자원을 보존하기 위해 체내 수정란을 회수하여 동결 후, 25.3%의 생존율을 보고하였다 (손 등., 2003). 그러나, 소에 비해 돼지의 수정란이식기술은 산업화가 되지 않은 상태이다 (Martinez et al., 2014). 수정란이식방법은 외과적 및 비외과적으로 나누어지며 외과적인 방법은 자궁절개를 통해 수정란을 직접 이식해 수란돈에 부하를 발생시켜 자연종부에 비해 번식성적이 감소하며 노동력소모가 큰 방법이다. 반면에 비외과적 이식법은 외과적 방법에 비해 수태율이 높은 것으로 보고되었다 (Angel et al., 2014). 이의 종돈의 번식능력은 산차수 및 품종별에 따른 유전능력에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다 (Chen et al., 2003; Hanenberg et al., 2001).

따라서, 본 연구는 우수한 암퇘지의 유전자원 보존을 위해 체내 수정란생산 및 수정란이식을 통해 수태율대환 품종별 효과를 구명하기 위해 수행하였다.

재료 및 방법

발정동기화 및 인공수정

시험축은 국립축산과학원에서 보유하고 있는 랜드레이스 요크셔, 두록 암퇘지 중 발육성적이 상위 30% 이상의 개체를 선발하여 사용했다. 시험축 품종별 각각 15두씩 발정동기화를 위해 발정주기와 상관없이 altrennogest (Regumate®, Intervet, France; 20 mg/day/sow)를 사료에 혼합한 후 18일 동안 오후에 급여했다. 발정동기화제 급여 종료 후 24시간 뒤에 1,000 IU PMSG (Serarumon, Japan)을 피하주사하고 72시간 후에 750 IU hCG (Chrulon®, Intervet, EU)를 근육주사하였다. hCG주사 후 다음날부터 발정여부를 1일 2회 3일간 조사하였고, 발정이 관찰되는 개체는 발정개시 후 12시간과 24시간에 같은 품종 숫퇘지에서 채취한 액상 정액으로 이용해 인공

수정하였다.

수정란 채란

최종 인공수정 4-5일 후, 재발정이 오지 않은 공란돈들 (두록, $n=10$; 요크셔, $n=3$; 랜드레이스, $n=4$)을 선발해 ketamine-HCl (Ketamine 50®, 유한양행)을 사용해 안락사시킨 후, 자궁을 적출하였다 (Fig. 1). 자궁경부를 밀봉한 자궁을 실험실로 옮겨 생리식염수로 3회 세척 후, 난소로부터 황체수를 측정하여 배란수와 발달상태를 조사하고 난관 및 자궁 10 cm 정도에서 겸자로 절개부위를 잡은 후에 5% Fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA)가 혼합된 Dulbecc's phosphate buffered saline (D-PBS, Gibco, USA)를 나팔관에서 주입하여 100 mm 멸균배양접시에 3회 관류하여 수정란을 수집하였다.

수정란 검사 및 체외배양

회수된 관류액을 실체현미경 (Nikon SMZ18 1X13.8, Japan) 하에서 검사하고 수정란을 회수하였다. 10% FBS를 0.22 μ m Silinge filter로 필터링 한 후에 55 mm petridish에 담아 수정란을 회수하여 발육단계와 상태를 검사하였다. 검사한 수정란은 발육단계에 따라 39°C, 5% CO₂ incubator (Forma, USA)에서 D-PBS+20%FBS 배양하였다.

비외과적 이식 및 임신진단

39°C, 5% CO₂ incubator (Forma, USA)에서 배양한 수정란은 확장배반포로 발달한 수정란을 골라 약 20개 전·후로 1 cc 주사기에 바늘을 제거한 상태에서 배양액을 0.45cc 주입한 후 바늘 장착 위치에서 마이크로 피펫을 사용하여 주사기 내에 장착하였다. 주사기에 장착한 수정란은 38°C 세포배양수송기 (FHK, Japan)로 돈사현장으로 이동하여 채란된 공란돈과 같은 시기에 발정이 조사된 수란돈을 선발하여 외음부를 70% 알코올거즈로 소독하고 DeepBlue Embryotransfer catheter (minitube, Germany)의 외부 카테터를 경관에 주입하고 1분이 경과한 후에 내부 카테터를 30 cm 내외를 주입하여 주사기에 장착한 수정란을 주입하고 다시 0.5cc의 배양액을 추가 주입하여 카테터 내부에 남아있을 수정란을 자궁내 이식하였다 (Fig. 2). 수정란을 이식한 후 25일 경과 뒤에 초음파진단기에 사용해 임신여부를 조사하였다.

통계 분석

수집된 모든 결과는 SAS의 GLM으로 분석하였고, 처리구 간 사후 검정은 turkey를 이용하여 유의수준 5% 미만에서 처리구 간 차이를 인정하였다.

결 과

품종이 다른 우수 암퇘지에 채란된 수정란 회수율 및 황체의 수는 표 1과 같다. 총 황체수는 요크셔에서 28개로 가장 많은 수를 보였고 랜드레이스는 26개이며, 두록이 17개로 가장 낮은 배란을 나타냈다. 수정란의 회수율은 랜드레이스가 78.8%, 두록이 65.4%, 그리고 요크셔는 51.4%로 계산되었다. 채란된 수정란의 발달단계를 평가한 결과 두록은 16세포기 이하의 수정란수가 상실배기 및 배반포기보다 많았다. 요크셔의 상실배기 수정란수는 두록보다 유의적으로 높았다 ($P < 0.05$). 랜드레이스는 상실배기 및 초기배반포기 수정란수는 요크셔와 두록에 비해 통계적으로 높게 나타났다 ($P < 0.05$).

생산된 수정란을 같은 품종의 수란돈에 비외적 방법으로 이식한 결과는 표 2에 나타났다. 수집된 수정란수가 다른 품

종에 비해 적은 두록을 제외한 요크셔와 랜드레이스에서 수태율시험을 수행하였다. 수정란이식을 통해 수태는 1마리의 랜드레이스에서만 나타났다. 비외과적 수정란 이식 카테터의 1, 2차 주입이 용이하였으며 (Fig. 2), 요크셔는 이식된 수정란수가 평균 16.3개 이었으며, 랜드레이스는 18.3개 있었다. 수정란 이식 카테터의 2차 카테터의 주입 길이는 요크셔가 평균 31 cm가 주입되었고, 랜드레이스는 26.6 cm가 주입되었다.

고 찰

우수 유전자원보존을 위해 번식성적이 좋은 암퇘지에서 체내 수정란 생산성의 품종별 비교와 채란된 수정란의 비외과적 이식방법을 이용하여 돼지 수정란이식기술을 확립하고자

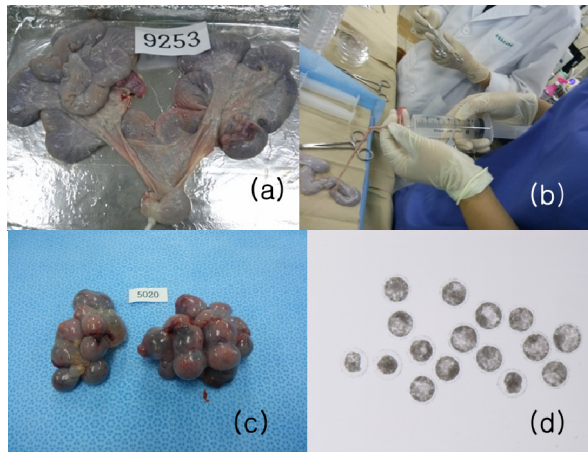


Figure 1. Process of embryo collection, and development of corpus luteum and embryo from superior sows. a, uterine; b, perfusion of uterine; c, development of corpus lutea; d, development of embryos

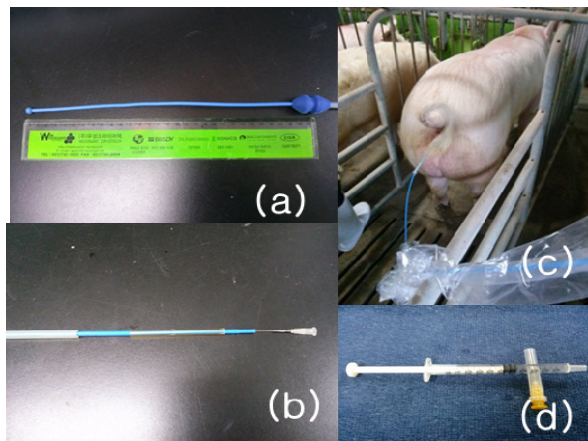


Figure 2. Catherter and process for non-surgical embryo transfer. a, front part of catherter; b, rear part of catherter; c, d, process of embryo transfer.

시행하였다. 과배란처리된 한국재래돼지에서 인공수정4일 후, 확인된 수정란은 상실배가 8.8개, 배반포가 3.2개이며, 5일에 채란한 경우 확장배반포가 10.6개, 배반포가 3.0개로 나타났다 (손 등, 2004). 또한, 총 채란된 개수는 4일에 14.3개, 5일째 채란된 수정란수는 15.0개로 채란일(4 또는 5일)에 의한 수정란수를 차이가 없음을 보고했다(손 등, 2004). 하지만, 과배란 처리된 헝가리 재래돼지는 인공수정5일후에 17.3개의 상실배란과 배반포란을 회수되었고 미수정란은 1.4개를 나타냈다 (Rátky et al., 2001). 과배란 처리된 개량품종인 공란돈에서 인공수정 4일후에 수집된 모든 수정란은 16세포기 이하이며, 5일후는 2~4세포기가 10.5%, 8~16세포기가 37.6% 상실배가 25%, 배반포가 13%이었으며, 6일째에는 16세포가 9.3%, 상실배가 5.9%, 배반포가 44.3%, 확장배반포가 16.8%로 보고했다 (김 등, 1990). 돼지에서 수정란회수율은 50%에서 100%로 다양하다 (Brüssow, 1990; Wrathall et al., 1970). 이는 돼지의 품종에 따라 번식생리가 차이가 있음을 의미한다. 또한, 수정란수 및 배란수는 양의 상관관계를 가지는 것으로 알려져 있다 (Irgang et al., 1993). Large White, 랜드레이스, 두록의 순종 및 잡종의 배란수는 11.2-14.0이며 수정란수는 8.2-11.1이며 순종보다 잡종인 LW x L 및 L x D보다 배란수 및 수정란수가 증가하는 것으로 보고되었다(Irgang et al., 1993). 본 연구에서도 두록에 비해 랜드레이스와 요크셔의 황체수는 높게 측정되었고 수정란의 채란수 및 회수율도 높게 나타났다. 따라서, 품종에 의해 배란수의 차이가 수정란 회수

율에 영향을 미치며 인공수정 후 5일이상 경과시 채란하는 것이 수정란 회수율을 증진시킬수 있을 것으로 사료된다

비외과적 수정란이식은 수정란을 생산하여 생축으로서 중돈의 수송이 없이 간편하게 수정란을 수송할 수 있어 노동력절감 및 동물복지에도 적합한 생산방법이다. 하지만, 돼지에서 비외과적 수정란기술은 다른 축종에 비해 이식기구의 미흡으로 매우 제한적이다 (Martinez et al., 2014). 이는 암돼지의 자궁경의 나선형 구조로 인해 일반적인 이식기구가 적합하지 않기 때문이다. 비외과적방법은 내시경법과 카테터법 나눌 수 있다 내시경을 이용한 수정란의 회수율은 61.4%이며 채란자가 숙달되면 71.4%까지 증가하였고 수태율은 외과적이식은 75%인 반면 내시경법은 50%를 나타냈다(Rátky et al., 2001). 따라서, 내시경법은 돼지의 수정란이식에 적합하지 않은 방법으로 판단된다 초기의 비외과적 카테터법은 자궁경내 카테터를 삽입해 수정란을 이식하는 방식으로 수태율은 40%미만, 산자수는 5-7두의 번식성적을 나타내었으나 (Hazeleger and Kemp, 2001; Martinez et al., 2000) 개선된 카테터법은 자궁경을 거쳐 자궁체에 수정란을 이식함에 따라 수태율은 80%, 산자수를 8두를 기록했다 (Cameron et al., 1989). 최근 개발된 비외과적 자궁심부 이식법 (nonsurgical Deep-Uterine Embryo Transfer)은 번식성적(수태율, 85%; 산자수, 9.8두)을 더 증가시켜 효율적인 수정란 이식법으로 보고되었다 (Angel et al., 2014). 본 연구에서도 자궁심부법을 이용해 수정란을 이식하였으나 총 6두의 수란돈중 1마리의 랜드레이스만 임신이 확인되었다이 원인은 이전 연

Table 1. Effects of different breed on number of corpora lutea and production of embryo in superior sows

| Breeds | No. pigs | Mean Luteal | | No. of Embryos | | | | | | | | | |
|-----------|----------|-------------|----------|----------------|---------|---------|---------|----------|-----------------------|----------------------|---------------------|-----------|--------------|
| | | left | Right | Unfertilized | 2cell | 4cell | 8cell | 16cell | Morula | Early Blastocyst | Expanded Blastocyst | Total | Recovery (%) |
| Duroc | 10 | 7.5±1.7 | 9.3±2.7 | 2.7±1.7 | 4.5±3.6 | 3.8±2.1 | 4.5±2.5 | 0.0±0.0 | 3.4±1.9 ^b | 2.0±0.0 ^b | 6.0±0.0 | 8.5±2.9 | 65.4 |
| Yorkshire | 3 | 14.3±4.2 | 13.7±3.9 | 1.5±0.5 | 1.5±2.1 | 2.0±0.0 | 2.0±0.0 | 0.0±0.0 | 4.7±2.6 ^{ab} | 1.7±0.5 ^b | 1.0±0.0 | 12.0±2.1 | 51.4 |
| Landrace | 4 | 14.5±5.5 | 11.5±7.6 | 3.5±1.5 | 5.0±0.0 | 5.0±0.0 | 2.0±0.0 | 10.0±0.0 | 9.3±9.1 ^a | 7.6±5.6 ^a | 0.0±0.0 | 21.0±11.7 | 78.8 |

The values expressed mean±standard errors.

^{ab} Different superscripts show significant differences ($P<0.05$).

Table 2. Effect of different breed on pregnancy of sow with non-surgical embryo transfer

| Breeds | Recipient No. | Embryos transfer No. | Intrauterine Insert catheter in Uterus lenth(cm) | Insert Media Vol(ml) | Pregnancy(25d) |
|-----------|---------------|----------------------|--|----------------------|----------------|
| Yorkshire | 1 | 11 | 27 | 2 | x |
| | 2 | 20 | 35 | 1.5 | x |
| | 3 | 18 | 31 | 1.5 | x |
| Landrace | 1 | 20 | 35 | 1 | O |
| | 2 | 18 | 18 | 1 | x |
| | 3 | 17 | 26.9 | 1 | x |

구에 비해 상대적으로 부족한 수정란수가 수태율에 부정적인 영향을 미친 것으로 예측된다(Angel et al., 2014; 30개).

따라서, 본 연구는 품종이 다른 우수 암퇘지의 보존을 위해 수정란이식기술 활용을 위한 기초자료로 활용가능할 것으로 사료된다. 그러나, 수정란의 부족 및 수란돈들의 미임신으로 인해 다른 품종이 수정란이식을 통한 수태율에 미치는 영향을 구명하는 추가연구가 필요하다

사 사

This work was supported by Grant No. PJ01099201 from Rural Development Administration, Republic of Korea; and the 2016 Post-doctoral Fellowship Program of the Rural Development Administration, Republic of Korea.

REFERENCES

- Angel MA, Gil MA, Cuello C, Sanchez-Osorio J, Gomis J, Parrilla I, Vila J, Colina I, Diaz M, Reixach J. 2014. The effects of superovulation of donor sows on ovarian response and embryo development after nonsurgical deep-uterine embryo transfer. *Theriogenology* 81:832-839.
- Brüssow KP. 1990. Results obtained from transfer of embryos into oviduct and uterus of swine. *Mh Vet Med* 40:562-565.
- Brüssow K-P, Geißler F, Kauffold M, George G, Thieme H-J, Maaß P. 1989. Use of high-quality adult sows for embryo transfer. *Mh Vet Med* 44:317-320.
- Cameron RDA, Durack M, Fogarty R, Putra DKH, McVeigh J. 1989. Practical experience with commercial embryo transfer in pigs. *Australian Vet J.* 66:314-318.
- Chen P, Baas TJ, Mabry JW, Koehler KJ, Dekkers JCM. 2003. Genetic parameters and trends for litter traits in U.S. Yorkshire, Duroc, Hampshire and Landrace. *Journal of Animal science* 81:46-53.
- Hanenberg EGAT, Knol EF, Merks JWM. 2001. Estimates of genetic parameters for reproduction traits at different parities in dutch landrace pigs. *Livestock Production Science* 69:179-186.
- Hazeleger W, Kemp B. 1999. State of the art in pig embryo transfer. *Theriogenology* 51:81-90.
- Hazeleger W, Kemp B. 2001. Recent developments in pig embryo transfer. *Theriogenology* 56: 1321-1331.
- Irgang R, Scheid IR, Wentz I, Favero JA. 1993. Ovation rate, embryo number and uterus length in purebred and crossbred Duroc, Landrace and Large White gilts. *Livestock Production Science* 33:253-266.
- Kerr OM, McCaghey WJ. 1984. Ova transfer from aged sows to gilts. *Rec. Agricultural Reserch* 32:71-76.
- Martin PA. 1983. Commercial embryo transfer in swine: Who is interested and why. *Theriogenology* 19:43-48.
- Martinez EA, Angel MA, Cuello C, Sanchez-Osorio J, Gomis J, Parrilla I, Vila J, Colina I, Diaz M, Reixach J. 2014. Successful non-surgical deep uterine transfer of porcine morulae after 24 hour culture in a chemically defined medium. *PLoS one*, 9:e104696.
- Martinez E, Vazquez J, Roca J, Lucas X, Gil M, Vazquez J. 2000. Deep intrauterine insemination and embryo transfer in pigs. *Reproduction* 58:301-311.
- Randall AE, Pettitt MJ, Plante C, Buckrell BC, Randall GCB, Henderson JM, Laroche R, Magar R, Pollard JW. 1999. Elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus through embryo transfer. *Theriogenology* 51:274.
- Rátky J, Brüssow K-P., L. Solyi, H. Torner, and P. Sarlos. 2001. Ovarian response, embryo recovery and result of embryo transfer in a Hungarian native pig breed. *Theriogenology* 56:969-987.
- Wrathall AE, Done JT, Stuart P, Mitchell D, Betteridge KJ, Randall GCB. 1970. Successful intercontinental pig conceptus transfer. *Vet. Rec.* 67:226-228.
- 김희석, 소도민지, 상마정. 1990. 돼지의 수정란 이식에 관한 연구I. 채란시기 및 반복채란이 수정란의 생산에 미치는 영향. *한국동물자원과학회*, 32:9-14.
- 손동수, 연성흙, 허태영, 강석진, 서국현, 최선호, 류일선, 이규승, 박창식. 2004. 재래돼지에서 수정란의 회수 및 동결보존에 관한연구. *한국수정란이식학회지*, 19:257-264.

Received September 09, 2016, Revised September 23, 2016,

Accepted September 29, 2016