

서방형 Follicle-Stimulating Hormone 주사제의 횡성약닭(조선헌계) 정액 생산 증진 효과

이가영¹ · 이재영² · 김은주³ · 김봉기^{4*} · 김성우^{5*}

¹농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원센터 산학연구원 석사, ²농촌진흥청 국립축산과학원 동물바이오유전체과 연구사, ³농촌진흥청 국립축산과학원 한우연구센터 연구사, ⁴공주대학교 동물자원학과 교수, ⁵농촌진흥청 국립축산과학원 한우연구센터 연구관

Slow-Releasing Follicle-Stimulating Hormone Injection to Enhance Semen Production of Heongseong-Yakdak Rooster (Joseon Red Chicken)

Ga Yeong Lee¹, Jae-Yeong Lee², Enju Kim³, Bongki Kim^{4*} and Sung Woo Kim^{5*}

¹Graduate Student, Animal Genetic Resources Research Center, National Institute of Animal Science, RDA, Hamyang 50000, Republic of Korea

²Junior Researcher, Animal Biotechnology and Genomics Division, National Institute of Animal Science, RDA, Wanju 55365, Republic of Korea

³Junior Researcher, Hamwoo Research Center, National Institute of Animal Science, RDA, Pyeongchang 25340, Republic of Korea

⁴Professor, Department of Animal Resources Science, Kongju National University, Yesan 32439, Republic of Korea

⁵Senior Researcher, Hamwoo Research Center, National Institute of Animal Science, RDA, Pyeongchang 25340, Republic of Korea

ABSTRACT The frozen genetic materials in avian species could be used for maintaining the biodiversity of bird species and breeds. The importance of frozen semen from original chicken lines has been highlighted by the frequent outbreaks of avian influenza that cause economic losses in the chicken industry. However, Heongseong-Yakdak, a population of Korean native chicken lines, showed a lowered quantity of semen, which made it difficult to produce frozen semen. For this reason, we introduced a method of stimulating semen production for the rooster. A slow-releasing FSH (0.5 IU per rooster) was injected subcutaneously every two days for two weeks. The volume and motility of semen was increased from $8.3 \pm 12.6 \mu\text{L}$ to $37.6 \pm 34.0 \mu\text{L}$ and from $84.9 \pm 3.5\%$ to $98.1 \pm 0.8\%$, respectively. These findings suggest that exogenous FSH can significantly enhance sperm production in Heongseong-Yakdak roosters. Further research is needed to evaluate the impact of FSH on fertility and hatching rates, as well as to assess potential side effects with different hormones types and dosages.

(Key words: Heongseong-Yakdak, semen, FSH, PVP)

서 론

횡성약닭은 강원도 횡성군 안흥면의 토종닭 연구자인 고 김찬호 선생님이 1990년대 초 수집한 기초 집단을 기반으로 육성된 품종이며 붉고 검은색의 모색을 가져 조선 화조로 불리기도 한다. 횡성약닭은 많은 연구가 진행되어 있지 않으며 다른 품종과 교배되지 않아 근친도가 매우 높는데(Roh et al., 2019), 현대 양계업의 품종으로 활용하기에는 성장이 느리며, 크기도 작고, 특히 번식 성적이 낮은 것으로 판단된다(Kim et al., 2022; Song et al., 2023). 이 품종은 국립축산과학원 가축유전자원센터의 계통 수집활동 기본 자료에 따르면, 자연교배에 의하여 생산된 수정란도 부화율이 5~25% 정도로 매우 낮아, 계통 유지에 어려움이 있으며 수컷

은 정액 채취가 어려우며 생산된 정액 양 또한 적어 동결정액으로 유전자원을 보존하는 것도 힘든 계통이다. 횡성약닭이 고정된 농장에서 전하는 바에 따르면, 개체는 방목상태에서 자연적으로 부화한 개체를 얻어서 집단을 유지하였고 특별한 사료를 공급하여 사육하였다고 한다(Son, 2020). 가축유전자원센터에 기증된 이후, 케이지 사육 방식에 적응하였으나, 종란 수집을 위한 인공수정 및 부화에 많은 어려움이 있는 특별한 계통으로 인지되었다.

가금 산업은 전염성 조류인플루엔자(avian influenza)로 많은 경제적 피해를 입고 있으며 가축유전자원을 위협하는 요인으로 해마다 많은 수의 닭이 희생되고 있다(Pramuwidyatama et al., 2023; Zamani et al., 2024). 특히 한국 재래종 계통은 보유 개체수가 적으며 경제성을 이유로 사육농가의 선

* To whom correspondence should be addressed : sungwoo@korea.kr, bkkim@kongju.ac.kr

호도가 낮아 종 멸실 위험도가 점차 더 높아지고 있다. 가금 유전자원 망실을 대비하는 방법은 동결유전자원을 생산하여 액체 질소에 영구 보존하는 방법이 유일하다고 판단된다. 가금 동결유전자원은 크게 2가지로 나눌 수 있는데 수컷의 신선 정액을 동결하여 보존하는 방법과 초기 수정란에서 추출한 원시생식세포를 채취하여 동결하는 방법으로 구별할 수 있다. 이러한 유전자원은 재래닭 유전자원을 영구보존함으로써 멸실을 방지하며 가금 유전자은행의 기능을 수행하여 닭 종축 산업에 유전적 다양성을 제공할 수 있다(Kaya et al., 2008; Lenstra et al., 2012; Haque et al., 2024). 또한, 동결유전자원을 이용하여 계통을 복원하는 기술은 가축을 포함하여 야생동물의 유전적 다양성을 확보하는 수단으로 이용되고 있다(Donoghue, 2000; Kim et al., 2022). 특히 황성약닭은 아직까지 유전적 가치평가가 이루어지지 못한 계통으로 후대 확보를 위한 번식 연구와 생식세포 영구 보존이 시급하다고 보여진다. 또한, 황성약닭 수컷에서 정액을 확보하는데 많은 어려움이 있으므로 멸실 방지용 동결유전자원을 확보하기 위하여 정액 생산 효율을 증진시킬 필요성이 존재한다.

가금에서 생식선의 발달을 주관하는 호르몬은 뇌하수체 전엽성 호르몬으로 난포자극호르몬(follicle stimulation hormone, FSH)와 황체형성호르몬(leutenizing hormone, LH)로 알려져 있다(Ottinger and Baskst, 1995; Oduwole et al., 2018; Santi et al., 2020). 수탉에서 전자는 생식세포의 수를 증가시키고 세정관발달을 유도하여 정자 생성(spermatogenesis)에 중요한 것으로 알려져 있고, 후자는 웅성 호르몬 생산을 촉진시키고 정자형성(spermiogenesis)에 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있다(Ottinger and Bakst, 1995). 정자 생산 효율에 도움이 되는 FSH는 당단백질성 호르몬으로 뇌하수체에서 혈액으로 방출되면 반감기가 짧은 특성이 존재한다(Morell et al., 1971; Perlman et al., 2003; Wide et al., 2022). FSH는 소에서 흔히 다중난포성장을 유도하여 신선수정란을 확보할 때 점감주사법을 이용하며 하루 2회씩 4일간 주사하는 방법을 이용하는데 이는 많은 인력을 필요하는 작업으로 알려져 있다. 소에 있어서 FSH의 단점을 극복하기 위하여 장시간에 걸쳐 서서히 방출되도록 고안된 몇가지 방법이 있다(Yamamoto et al., 1994; Tribulo et al., 2011; Kimura, 2016). 그 중에서 고분자 물질인 polyvinylpyrrolidone(PVP)는 독성이 없으며 천천히 생분해가 일어나기 때문에 FSH와 결합하여 천천히 혈액으로 방출되며, 소에서 체내수정란(*in vivo* embryo)을 생산하여 수정란 이식을 시술하는 기법에 사용되었다(Yamamoto et al., 1994). 그러므로 본 연구에서는 황성약닭 품종 멸실을 방지하기 위한 수단으로 동결정액을 생산하기 위하여 PVP를 활용한

서방형 FSH 주사법이 정액생산량과 정자 운동성에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

국립축산과학원 가축유전자원센터에서 사육중인 황성약닭 수컷 55주령 3두와 110주령의 7두 및 오계 45주령 10두를 이용하여 시험에 공시하였다. 재래닭 수컷은 개별 케이지(폭 24 cm × 깊이 35cm × 높이 42 cm)에 사육하였고 종계 사료를 1두당 80 g을 공급하였으며 남은 사료를 익일 제거하는 방법으로 신선한 사료를 공급하였다. 광 조절은 종계 표준으로 14시간 동안 조사하였다. 실험축으로 사용된 정액 채취는 국립축산과학원 동물실험 윤리위원회의 승인(NIAS 2022-0562)을 받았으며 연구 규정을 준수하여 사용되었다.

2. 시약 및 희석액 조성

본 연구에 사용된 시약은 특별히 언급된 경우를 제외하고 Sigma-Aldrich Chemical Co.(USA) 제품을 사용하였고 정액 희석액과 주사액으로 이용되는 물은 세포 배양급(Gibco™, USA)을 이용하였다. 닭 정액 분석을 위하여 희석제로 이용되는 BPSE-I(Beltsville Poultry Semen Extender -I)는 potassium phosphate dibasic trihydrate 1.27 g, sodium L glutamate 0.867 g, D-fructose(anhydrous) 0.5 g, sodium acetate trihydrate 0.43 g, TES 0.195 g, potassium citrate 0.064 g, potassium phosphate monobasic 0.065 g 및 magnesium chloride anhydrous 0.034 g을 최종 부피가 100 mL가 되도록 조정하였다(Sexton et al., 1978). 닭 정액 동결 보존에 사용된 HS-1 희석액의 조성은 Hanzawa et al.(2010)에 의하여 제안된 방법으로 제조하였으며, sodium L glutamate 1.2 g, potassium acetate 0.3 g, D(+)-glucose 0.2 g D(+)-trehalose dihydrate 3.8 g, BES 0.5 g 및 Bis-TRIS 0.5 g을 최종 부피가 100 mL가 되도록 제조하였다.

3. 정액채취 및 정자 분석

황성약닭 수컷의 정액 채취는 황취법을 이용하였으며(Burrows and Quinn, 1935), 1.5 mL e-tube에 담은 후 실험용 얼음으로 옮겨 실험실로 이송하였다. 실험용 피펫을 이용하여 개체 별 정액 양을 정량하고 BPSE 희석액으로 희석하여 농도를 $40 \sim 60 \times 10^6/\text{mL}$ 로 조정하였다. 닭 정액 활력도는 정자 운동성 분석프로그램(Computer Assisted Sperm Analyzer, CASA)으로 ISAS(Proiser R & D, Paterna, Spain)를 이용하여

분석을 실시하였다(Svoradova et al., 2018; Elomda et al., 2024). 정액 채취는 동일한 개체 5두에서 2주 동안 총 3회 반복 채취하여 정액을 확보하였으며, 정자 생존율과 운동성에 대한 연구자료를 확보하였다.

4. FSH 주사제 준비와 피하주사

FSH 호르몬 처리를 위하여 서방형 FSH 주사제는 polyvinylpyrrolidone(PVP, lyophilized, Irvine Scientific, USA)를 활용하여 실험실에서 직접 제조하여 사용하였다(Yamamoto et al., 1994). 주사액으로부터 FSH가 서서히 분비될 수 있도록 멸균 처리된 PVP를 이용하였다. PVP 100 mg 에 세포 배양용 초순수 1 mL을 투입하여 냉장실에서 1일 동안 용해시켜 기본 조성액을 제조하였으며 FSH를 주사용 식염수에 10 IU/mL 농도를 맞추고 1 mL을 PVP 10% 용액과 동량(1:1, v/v)으로 혼합하였다. 충분히 균질화된 주사액은 냉장실에서 1일간 보존하였으며 매번 피하주사 1일전에 준비하였다. 실험군으로서 황성약닭 5두를 선정하여 피하에 2일 간격으로 0.1 mL (0.5 IU FSH)씩 주사하여 2주간 처리하였으며 정액 생산량의 검사는 주사제를 투여함과 동시에 26일간에 걸쳐 1주당 2회씩 정액을 채취하여 검사하였다. 대조군으로 동일한 황성약닭 5두를 FSH가 포함되지 않은 PVP를 미리 동량 주사하고 2~3주간 정액을 채취하여 비교하였다.

5. 황성약닭 및 오계 동결정액의 생존성 비교

FSH를 처리하여 생산한 황성약닭 정액의 동결보존성을 조사하기 위하여 다른 재래닭으로 오계를 선정하고 동결 및 용해 정자의 운동성을 비교하였다. 황취법으로 채취한 신선 정액은 실험용 얼음(ice slurry)을 이용하여 5℃로 조정된 후 실험실로 이송한 후 동일한 온도의 HS-1희석액으로 1:1로 1차 희석을 실시하고, 30분 평형을 유지하고 18% methacetamide (MA)가 첨가된 HS-1을 다시 1:1로 희석하여 바로 0.5 mL 스트로에 봉입하였다. 정액의 희석, 충전 및 밀봉 작업은 5℃로 조정된 저온 정액 처리장치(FHK, Japan) 안에서 실시하였다(Kim et al., 2018). 희석 정액의 동결은 스티로폼 박스 안 액체 질소 위 4 cm에서 30분간 정치하여 예비 동결을 실시하고, 액체 질소에 바로 침지하는 간이 동결법을 이용하였다. 동결정액의 용해는 저온용해법을 이용하였으며 5℃ 저온 수조에서 2분간 용해하여 정자의 농도와 운동성을 분석하였다.

6. 통계 처리

FSH 처리에 의한 황성약닭 정자 생산량에 관한 통계량은 기술적 반복으로, 오계 및 황성약닭의 동결정자 운동성에 관한

통계량은 생물학적 반복으로 자료를 확보하였다. 통계 분석을 위하여 2개 그룹을 비교할 경우에는 Student *t*-test를 활용하였고, 2개 계통의 동결 전, 용해 후 정자 운동성은 Duncan's multiple test를 활용하여 $P<0.05$ 수준에서 검증하였다. 데이터 분석의 균질성과 통계 분석은 Prism 프로그램(GraphPad Software Inc., San Diego, CA, UAS)을 이용하였으며 모든 측정값은 평균(mean)±표준편차(standard deviation)로 표현하였다.

결 과

1. FSH 주사가 황성약닭 정액 생산량에 미치는 영향

서방형 FSH 주사제를 처리한 효과는 황성약닭 정액 양을 증가시키는 것으로 관찰되었다. Fig. 1에서 관찰되는 바와 같이 2주간 8회 서방형 FSH를 1회당 0.5 IU를 주입하였을 때 황성약닭 5두의 정액 평균 생산량은 동일한 개체에서 8.3 ± 12.6 μ L에서 37.6 ± 34.0 μ L로 유의적으로 증가하였다($P<0.05$). 그럼에도 불구하고, 26일간 3~4일 간격으로 정액을 채취할 때 5수 중 1수는 정액 채취가 되지 않는 경우도 발생하는 것으로 관찰되었다.

2. FSH 주사가 황성약닭 정자 운동성에 미치는 영향

황성약닭의 신선 정액의 운동성을 CASA로 분석하고 서방형 FSH를 주사하였을 때 정자 활력도를 비교하였다.

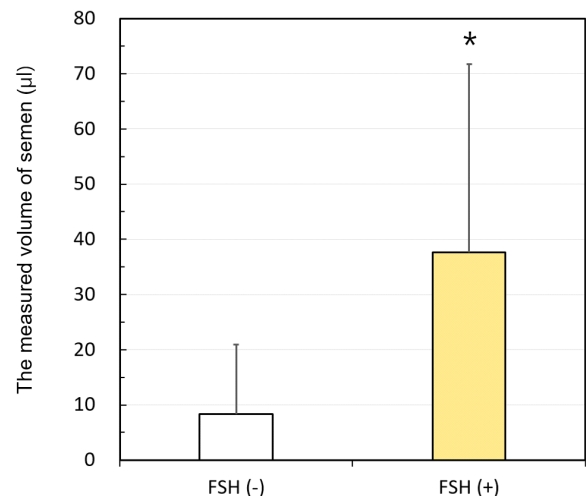


Fig. 1. The effect of slow-releasing FSH injection for 2 weeks on semen volume of Heongseong-Yakdak. The semen samples of rooster were collected with 3–4 day intervals for 26 days. The data and errors in the bar graph were designated from the values of the mean and standard deviation. A total of 5 roosters were used for 3 replicates.

Table 1에서 관찰되는 정자 운동량에 관한 자료를 살펴 보면, 정자 운동성(total motility, TM)이 유의적으로 증가하는 것으로 관찰되었으나, 활력정자운동성(progressive motility, PM)의 비율은 차이가 없었다. 또한 정자의 속도를 평가하는 곡선운동속도(curvilinear velocity, VCL), 평균거리운동속도(average path velocity, VAP) 및 직선거리운동속도(straight line velocity, VSL)의 분석결과 또한 FSH 처리군의 정자 속도가 유의적으로 향상된 것으로 관찰되었다($P<0.05$). 반면, 직진성(straightness, STR) 및 선형성(linearity, LIN)을 가진 정자 비율은 FSH처리군이 유의적으로 낮았으며 정자 두부 운동성을 판단하는 측두부이동거리(amplitude of later head, ALH)와 편모의 진폭도 정도를 판단하는 편모교차도(flagellar beat cross frequency, BCF)는 FSH 처리군이 유의적으로 낮게 관찰되었다($P<0.05$).

3. FSH 주사 종료가 황성약닭 정자 생산량에 미치는 영향

2주간의 서방형 FSH 주사를 종료하고 황성약닭의 정액 생산량이 얼마나 유지되는지 알아보기 위하여 주사 종료 후 12일간 정액 생산량을 조사하였다. Fig. 2에서 관찰되는 바와 같이, 정액생산량이 가장 높게 나타난 1수의 개체에서 약 1주일간 지속적인 증가를 관찰되었으나, 그 후 급격한 생산

성이 저하되는 경향을 보였다. 최대 150 μ L까지 생산이 가능하였으며 25일 차에서는 20 μ L로 감소하였다.

4. 동결 보존된 황성약닭의 운동성 조사

외인성 FSH를 주사하여 생산한 황성약닭 정액을 영구보존하고 융해한 동결 정자의 생존성을 조사하기 위하여 정자의 활력도를 조사하였다. Table 2에서 보는 바와 같이, 황성약닭은 FSH를 주사하여 채취한 정액을 동결 융해하였으며 오계의 신선 정액은 FSH를 주사하지 않은 정액을 동결 융해하여 정자 활력도에 관한 자료를 비교하였다. 오계 정자의 신선 정액의 정자 농도는 황성약닭보다 높았으며 유의적 차이가 관찰되었다($P<0.05$). 그러나, TM과 PM은 차이가 없었으며 정자의 속도와 관련된 분석요인들은 동결에 의하여 두 계통 모두 유의적으로 저하된 것으로 판단되었고 황성약닭과 오계 동결정액과 차이는 관찰되지 않았다. 반면, 직진성(straightness, STR) 및 선형성(linearity, LIN)을 가진 정자 비율은 FSH를 처리하여 동결한 처리군이 유의적으로 높았으며, 두부 운동성을 판단하는 측두부이동거리(amplitude of later head, ALH)는 동결 정액에서 두 집단 모두 증가하였고, 편모의 진폭도 정도를 판단하는 편모교차도(flagellar beat cross frequency, BCF)는 FSH 처리군이 유의적으로 높게 관찰되었다($P<0.05$).

고 찰

가금 산업은 가축 중 고도의 육종 기술을 적용한 종축을 활용하여 세분화된 가계도를 형성한 후에 실용계(CC, commercial chicken)를 생산하여 농가에 공급한다. 실용계는

Table 1. The effect of slow-releasing follicle-stimulating hormone injection on sperm kinetic parameters of Heongseong-Yakdak

Parameter (unit)	Control	FSH injected
TM (%)	84.9 $\pm$ 3.5 ^a	98.1 $\pm$ 0.8 ^b
PM (%)	18.3 $\pm$ 4.0	21.6 $\pm$ 2.9
VCL (μ m/s)	62.5 $\pm$ 8.7 ^a	150.1 $\pm$ 9.5 ^b
VAP (μ m/s)	32.1 $\pm$ 4.2 ^a	76.3 $\pm$ 5.4 ^b
VSL (μ m/s)	20.4 $\pm$ 2.8 ^a	44.7 $\pm$ 3.7 ^b
STR (%)	63.4 $\pm$ 1.6 ^a	58.6 $\pm$ 1.2 ^b
LIN (%)	32.7 $\pm$ 0.9 ^a	29.8 $\pm$ 1.5 ^b
WOB (%)	51.5 $\pm$ 1.0	50.8 $\pm$ 2.3
ALH (μ m)	3.0 $\pm$ 0.2 ^a	5.6 $\pm$ 0.6 ^b
BCF (Hz)	6.8 $\pm$ 0.7 ^a	5.4 $\pm$ 0.4 ^b

The abbreviations are marked as TM (total motility), PM (progressive motility), VCL (curvilinear velocity), VAP (average path velocity), VSL (straight line velocity), STR (straightness = VSL/VAP), LIN (linearity = VSL/VCL), WOB (wobble = VAP/VCL), ALH (amplitude of lateral head), and BCF (flagellar beat cross frequency). A total 5 roosters were used for semen evaluation with 3 replicates. Within a single row, values with different superscripts differed significantly ($P<0.05$).

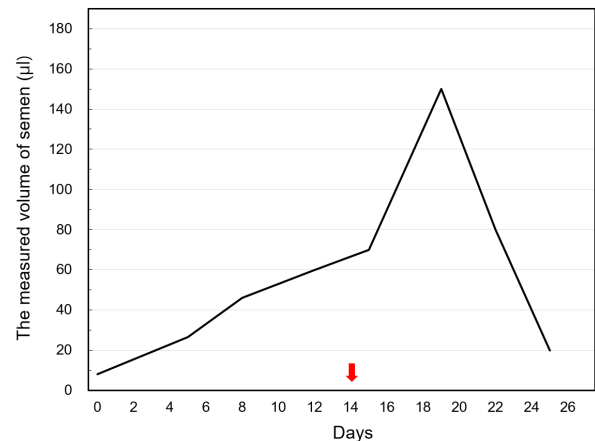


Fig. 2. The prolonged response of semen volume of one Heongseong-Yakdak rooster by FSH injections. The red arrow marks the last 8th FSH injection.

Table 2. The motile kinetics of frozen/thawed spermatozoa between Ogye and Heongseong-Yakdak roosters

Parameter (unit)	Fresh		Frozen/Thawed	
	O	HYD	O	HYD
Con ($\times 10^9$ /mL)	3.7 $\pm$ 0.3 ^a	2.0 $\pm$ 0.4 ^b	-	-
TM (%)	97.5 $\pm$ 0.7 ^a	95.9 $\pm$ 1.4 ^a	76.2 $\pm$ 1.6 ^b	73.5 $\pm$ 4.0 ^b
PM (%)	24.7 $\pm$ 4.5	20.1 $\pm$ 4.6	21.9 $\pm$ 1.5	24.1 $\pm$ 6.8
VCL (μ m/s)	109.8 $\pm$ 6.3	114.8 $\pm$ 5.2	61.2 $\pm$ 3.7 ^a	53.9 $\pm$ 14.0 ^a
VAP (μ m/s)	70.3 $\pm$ 3.5 ^a	57.5 $\pm$ 1.5 ^b	37.6 $\pm$ 1.1 ^c	37.1 $\pm$ 10.5 ^c
VSL (μ m/s)	48.9 $\pm$ 3.3 ^a	33.6 $\pm$ 2.4 ^b	27.8 $\pm$ 1.7 ^c	30.9 $\pm$ 9.5 ^c
STR (%)	69.6 $\pm$ 4.1 ^c	58.3 $\pm$ 2.8 ^d	74.0 $\pm$ 4.3 ^b	82.9 $\pm$ 6.0 ^a
LIN (%)	44.7 $\pm$ 4.3 ^a	29.2 $\pm$ 1.8 ^a	45.6 $\pm$ 4.6 ^a	57.3 $\pm$ 8.9 ^b
WOB (%)	64.1 $\pm$ 2.3 ^b	50.1 $\pm$ 1.6 ^c	61.6 $\pm$ 2.8 ^b	68.8 $\pm$ 5.9 ^a
ALH (μ m)	3.6 $\pm$ 0.2 ^b	4.7 $\pm$ 0.2 ^a	2.8 $\pm$ 0.1 ^c	3.1 $\pm$ 0.6 ^b
BCF (Hz)	7.0 $\pm$ 0.4 ^a	5.3 $\pm$ 0.2 ^b	7.2 $\pm$ 0.2 ^a	7.5 $\pm$ 0.2 ^a

The abbreviations are marked as O (Ogye line), HYD (Heongseong-Yakdak), CON (concentration), TM (total motility), PM (progressive motility), VCL (curvilinear velocity), VAP (average path velocity), VSL (straight line velocity), STR (straightness = VSL/VAP), LIN (linearity = VSL/VCL), WOB (wobble = VAP/VCL), ALH (amplitude of lateral head), and BCF (flagellar beat cross frequency). A total 10 roosters of respective chicken lines were used for semen evaluation with 3 replicates. Within a single row, values with different superscripts differed significantly ($P < 0.05$).

순종계(PL, pure line), 원종계(GPS, grandparent stock), 종계(PS, parent stock)의 단계에 의하여 원하는 유전자를 집중시켜 생산성을 고도로 유지하게 된다(Pollock, 1999; Sohn et al., 2021). 외국 육종 기업은 PL과 GPS를 생산하는 기업비밀을 가지고 있으며, 외부로 판매하지 않기 때문에 우리나라 종계 산업은 PL라인을 보유하고 있지 못하는 수준이며 GPS나 PS를 구매하여 CC를 생산하고 있다(Choi et al., 2015).

한국 재래닭은 고유 유전자를 보유하고 있는 유전자원으로 원종계 생산에 이용될 가능성이 높다(Kim et al., 2022). 그러나 아직까지 종계로서 육종하지 않았으며 일부 계통은 고도의 근친도를 유지하기 때문에 계통별 특성을 세밀하게 분석할 필요성이 있다. 그러므로 재래닭의 동결유전자원은 육종에 필요한 유전적 다양성을 공급하는 원재료로 활용될 수 있기 때문에 소중한 국가 자원이라고 볼 수 있다. 그 중에서도 횡성약닭은 가장 근친도가 높은 품종으로 밝혀졌으며 강건한 생리적 특성을 고려해 볼 때, 질병 저항성에 관여할 수 있는 형질을 가지고 있는 것으로 추정된다. 아직까지 연구가 진행되지 않은 집단으로 동결유전자원 보존이

시급한 품종이지만 번식학적 특성상 많은 어려움이 존재한다. 특히 수컷의 정액 생산량이 매우 적은 특성에 의하여 동결정액 생산이 쉽지 않다. 그래서 재래닭 중에서도 가장 낮은 번식 능력을 가지고 있으며 계절 및 환경에 대한 번식 반응은 오히려 야생 조류와 비슷한 형질을 가지고 있다고 봐도 무방할 정도의 성적을 보여주고 있다.

서방형 약물(slow releasing drug)은 방출이 제어되도록 설계되어 장시간에 걸쳐 활성성분이 서서히 혈액으로 분비되는 것을 의미한다(Lipowski, 1938; Vilar et al., 2012; Markowicz-Piasecka et al., 2023). 반응이 급격하게 나타나거나 반감기가 매우 짧은 약물에 적합한 방법인데, 스스로 약물을 복용하기가 불가능한 정신분열증을 치료하는 약물에 처음 사용되었다. 피임제로서 이용되는 medroxyprogesterone acetate도 서방형 약물로 알려져 있고 약 3~9개월의 지속적인 효과가 보고되었으며(Kennedy, 2012; Sunitha and Samatha, 2018), 반감기가 몇 시간에 불과하다고 알려진 FSH는 점성이 높은 hyaluronan 또는 PVP를 이용하거나 aluminum hydroxide gel을 이용하여 주사제를 제조하고 암소에서 과배란을 유도하는데 사용하였다(Yamamoto et al., 1994; Tribulo et al., 2011; Kimura, 2016). 이러한 특성을 이용하여 본 연구에서는 서방형 FSH가 정액 생산이 매우 어려운 횡성약닭 수컷에 대한 이용성을 확인하기 위하여 0.5 IU FSH 호르몬을 약 2주간 2일간 간격으로 주사하고 정액 생산량을 관찰하였다. 특히, 외인성 FSH 주사를 14일 8번째 주사를 마지막으로 처방하고 그 후 정액 생산량은 약 5~6일만에 걸쳐 꾸준히 증가하였는데 이는 주사된 호르몬이 피하에서 천천히 분비되고 있음을 보여주고 있다. 그러나 25일째에는 원상태로 정액생산량이 복귀하는 것으로 관찰되었는데, FSH의 정확한 기작과 활성도에 관한 추가 연구가 필요하다고 판단된다.

본 연구에서 제시된 횡성약닭 동결정액 생산은 최초로 판단된다. 횡성약닭은 가축유전자원센터에서 기탁되어 생축으로 보존되었으나, 채정이 불가능한 개체가 가장 많이 출현하는 계통으로 후대 갱신이 어려운 상황이었으며 다량의 정액이 필요한 동결정액에 필요한 정액량을 확보할 수 없었다. 서방형 FSH 주사방법을 적용하여 횡성약닭 정액 생산을 유도할 수 있었으며 단백질성 약물이 가진 부작용을 억제하고자 가장 낮은 농도로 추정되는 용량을 선정하고 2일에 1회 주사하는 방법을 선택하였다. 2주만에 걸친 주사 기간 동안 정액 생산량은 점진적으로 증가되었으며 주사를 중단한 후 1주일까지 정액생산량이 증가하는 것으로 보아 FSH 효과가 지속적으로 유지됨을 알 수 있었으며 최적의 농도와 단백질 호르몬에 의한 항체 형성 관련 연구 등 부작용에 대

한 많은 연구가 필요함을 시사하였다. 약 1달에 걸친 실험과 정에서 1마리의 수컷에서 약 10여 개의 0.5 mL 동결정액 유전자원을 확보하여 영구 보존할 수 있었으며 정액생산량을 약 4~5배로 증가시킬 수 있었다. 또한 가금 동결정액 유전자원을 생산하여 영구보존하는 기법을 적용할 경우에도, 다른 재래닭 계통인 오계와 비교하여도 융해 후 정자 운동성이 낮아지는 현상은 관찰할 수 없었다.

서방형 FSH 주사방법은 종계 가계도를 유지할 수 있는 방법으로 사용될 수 있으므로 가금 산업에 도움이 될 수 있을 것으로 추정된다. 특히 PS나 GPS개체가 생산되고 관리하는 과정은 가금 육종에 기본이 되는 활동인데, 원인을 정확하게 판단할 수 없고 정액 생산이 정지된 수컷 처리에도 활용이 가능할 것으로 추정된다. 형질전환 닭의 경우, 번식 생리적 특성이 일반 계통과 다를 수 있으므로, 닭 계통의 유지 관리가 더 어려운데, 서방형 FSH의 활용은 형질전환 닭 유전자원 보존에 활용될 가능성이 높다. 멸종 위기에 처한 야생 조류를 복원시키기 위한 과정에도 야생으로 돌아갈 수 없는 개체에서 가금유전자원을 생산하고자 할 경우에도 적용할 수 있을 것으로 기대된다.

적 요

조류의 동결유전자원은 유전적 다양성을 유지하기 위하여 영구보존가능한 국가자산으로 닭 종축 생산에 중요한 기능을 수행할 수 있다. 해마다 조류인플루엔자에 의한 경제적 손실이 높아가고 있으며 동결정액과 원시생식세포를 이용한 동결유전자원생산은 그 중요성이 더 높아지고 있으며 재래닭의 경우 멸실 위험에 대비할 필요성이 있다. 황성약닭은 재래닭 계통 중, 정액생산량이 가장 낮은 것으로 판단되며 동결정액 생산이 힘든 품종으로 간주되었다. 본 연구에서는 이러한 문제점을 해결하기 위하여 서방형 FSH 처방을 통하여 정액 생산량을 증가할 수 있는지 검토하였다. 서방형 FSH 0.5 IU를 2주간에 걸쳐 2일간의 간격으로 주사하였을 때 황성약닭 정자의 부피와 운동성이 모두 증가하는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과는 외인성 FSH의 처방이 황성약닭 정자 생산을 유의적으로 증가시킬 수 있음을 보여주고 있다. 따라서 황성약닭뿐 아니라 가금 종축에서 가계의 멸실 위험을 줄이는데 도움이 될 수 있으며 FSH 호르몬 처방에 의하여 나타날 수 있는 부작용에 대한 추가적인 연구와 다른 성조절 호르몬에 대한 연구가 더 필요할 것으로 판단된다.

(색인어 : 정액, 난포자극호르몬, 폴리비닐피롤리돈, 황성약닭)

사 사

본 연구는 농촌진흥청 가축유전자원센터에서 수행한 “닭 동결유전자원 수집 보존 체계 확립(PJ01558302)” 과제의 지원에 의하여 수행되었습니다.

ORCID

Ga Yeong Lee	https://orcid.org/0000-0001-8208-8728
Jae-Yeong Lee	https://orcid.org/0000-0003-2965-7826
Enju Kim	https://orcid.org/0000-0003-4040-0474
Bongki Kim	https://orcid.org/0000-0002-5229-7294
Sung Woo Kim	https://orcid.org/0000-0001-8521-3010

REFERENCES

- Burrows WH, Quinn JP 1935 A method of obtaining spermatozoa from the domestic fowl. *Poultry Sci* 14:251-254.
- Choi NR, Seo DW, Jemaa SB, Sultana H, Heo KN, Jo C, Lee JH 2015 Discrimination of the commercial Korean native chicken population using microsatellite markers. *J Anim Sci Technol* 57:5.
- Donoghue AM, Wishart GJ 2000 Storage of poultry semen. *Anim Reprod Sci* 62:213-232.
- Elomda AM, Mehaisen GMK, Stino FKR, Saad MF, Ghaly MM, Partyka A, Abbas AO, Nassar FS 2024 The characteristics of frozen-thawed rooster sperm using various intracellular cryoprotectants. *Poul Sci* 103(11):104190.
- Haque MA, Jung JH, Choo HJ, Afrin S, Lee YM, Kim JJ 2024 Pedigree analysis of Korean native chickens: Unraveling inbreeding and genetic diversity. *Poul Sci* 103(10):104071.
- Hanzawa S, Niinomi T, Miyata T, Tsutui M, Tajima A 2010 Cryopreservation of chicken semen using N-methylacetamide as cryoprotectant. *Jp Poult Sci* 47:J27-J32.
- Kaya M, Yildiz MA 2008 Genetic diversity among Turkish native chickens, Denizli and Gerze, estimated by microsatellite markers. *Biochem Genet* 46(7-8):480-491.
- Kennedy WK 2012 When and how to use long-acting injectable antipsychotics? *Cur Psych* 11(8):40-43.
- Kim M, Cho E, Cho S, Choo H, Jin D, Lee JH 2022 A study on the conservation status of Korean native chicken po-

- pulations. *J Anim Breed Genom* 6(4):135-142.
- Kimura K 2016 Superovulation with a single administration of FSH in aluminum hydroxide gel: a novel superovulation method for cattle. *J Reprod Dev* 62(5):423-429.
- Kim SW, Choe SR, Ko YG, Jeon IS 2018 Motility of rooster spermatozoa under different thawing conditions. *Korean J Poult Sci* 45(4):237-244.
- Lenstra JA, Groeneveld LF, Eding H, Kantanen J, Williams JL, Taberlet P, Nicolazzi EL, Solkner J, Simianer H, Ciani E 2012 Molecular tools and analytical approaches for the characterization of farm animal genetic diversity. *Anim Genet* 43(5):483-502.
- Lipowski I Patent 1938 A Process for Producing Carriers for Medicinal Substances.
- Markowicz-Piasecka M, Kubisiak M, Asendrych-Wieik K, Kołodziejczyk M, Grzelińska J, Fabijańska M, Pietrzak T. 2023 Long-acting injectable antipsychotics-a review on formulation and *in vitro* dissolution. *Pharmaceutics* 16(1):28.
- Morell AG, Gregoriadis G, Scheinberg IH, Hickman J, Ashwell G. 1971 The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation. *J Biol Chem* 246(5):1461-1467.
- Oduwale OO, Peltoketo H, Huhtaniemi IT. 2018 Role of follicle-stimulating hormone in spermatogenesis. *Front Endocrinol* 14(9):763.
- Ottinger MA, Bakst MR 1995 Endocrinology of the avian reproductive system. *J Avian Med Surg* 9(4):242-250.
- Perlman S, van den Hazel B, Christiansen J, Gram-Nielsen S, Jeppesen CB, Andersen KV, Halkier T, Okkels S, Schambye HT 2003 Glycosylation of an N-terminal extension prolongs the half-life and increases the *in vivo* activity of follicle stimulating hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 88:3227-3235.
- Pollock DL 1999 A geneticist's perspective from within a broiler primary breeder company. *Poult Sci* 78(3):414-418.
- Pramuwidyatama MG, Indrawan D, Boeters M, Poetri ON, Saatkamp HW, Hogeveen H 2023 Economic impact of highly pathogenic avian influenza outbreaks in Western Java smallholder broiler farms. *Prev Vet Med* 212:105833.
- Roh HJ, Kim KW, Lee J, Jeon D, Kim SC, Ko YG, Mun SS, Lee HJ, Lee JH, Oh DY, Byeon JH, Cho CY 2019 Genetic diversity of Korean native chicken populations in DAD-IS database using 25 microsatellite markers. *Korean J Poult Sci* 46(2):65-75.
- Santi D, Crépieux P, Reiter E, Spaggiari G, Brigante G, Casarini L, Rochira V, Simoni M. 2020 Follicle-stimulating Hormone (FSH) Action on Spermatogenesis: a Focus on Physiological and Therapeutic Roles. *J Clin Med* 9(4):1014.
- Sexton, Thomas J, T A Fewlass 1978 A new poultry semen extender 2. Effect of the diluent components on the fertilizing capacity of chicken semen stored at 5°C *Poult Sci* 57(1):277-284.
- Sohn SH, Choi ES, Cho EJ, Kim BG, Shin KB, Lee SG, Oh KS 2021 Crossbreeding combination test for the production of new synthetic Korean native commercial chickens. *Korean J Poult Sci* 48(3):101-110.
- Son DS 2020 Personal Communication. National Institute of Animal Science.
- Song H, Kim S, Cho SR, Jin DH 2023 Investigation of growth and egg production performance of 6 indigenous Korean chicken breeds enrolled in DAD-IS. *Korean J Poult Sci* 50(4):241-249.
- Sunitha RM, Samatha B 2018 Formulation development and evaluation of medroxyprogesterone acetate injectable suspension. *J Drug Deliv Therap* 8(6-s):298-303.
- Svoradová A, Kuželová L, Vašíček J, Olexíková L, Baláži A, Kulíková B, Hrnčár C, Ostro A, Bednarczyk M, Chrenek P 2018 The assessment of cryopreservation on the quality of endangered oravka rooster spermatozoa using CASA and cytometry. *Cryo Letters* 39(6):359-365.
- Tríbulo A, Rogan D, Tribulo H, Tribulo R, Alasino RV, Beltramo D, Bianco I, Mapletoft RJ, Bó GA 2011 Superstimulation of ovarian follicular development in beef cattle with a single intramuscular injection of Folltropin-V. *Anim Reprod Sci* 129(1-2):7-13.
- Vilar G, Tulla-Puche J, Albericio F 2012 Polymers and drug delivery systems. *Curr Drug Deliv* 9(4):367-394.
- Wide L, Eriksson K, Sluss PM, Hall JE. 2022 Determination of half-lives of circulating FSH and LH glycoforms in women during GnRH receptor blockade. *J Clin Endocrinol Metab*. 107(10):e4058-e4062.
- Yeon SH 2018 Personal Communication. National Institute of Animal Science.

Yamamoto M, Ooe M, Kawaguchi M, Suzuki T 1994 Superovulation in the cow with a single intramuscular injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology* 41(3):747-755.

Zamani O, Bittmann T, Ortega DL 2024. The effect of avian

influenza outbreaks on retail price premiums in the United States poultry market. *Poult Sci* 103(10):104102.

Received Mar. 23, 2025, Revised May. 4, 2025, Accepted May. 7, 2025