



# 연산오계 집단에서 *PRLR*과 *SPEF2* 유전자 마커를 이용한 만우성 유전자의 분포 확인

김민준<sup>1</sup>, 조성현<sup>1</sup>, 프라부따<sup>1</sup>, 조은진<sup>1</sup>, 이승숙<sup>1,2</sup>, 서동원<sup>1</sup>, 이준현<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>충남대학교 농업생명과학대학 동물자원과학부, <sup>2</sup>(주)지산농원

## Identification of chicken late feathering distribution in Yeonsan Ogye population using associated markers in *PRLR* and *SPEF2* genes

Minjun Kim<sup>1</sup>, Sunghyun Cho<sup>1</sup>, Prabuddha Manjula<sup>1</sup>, Eunjin Cho<sup>1</sup>, Seung-Sook Lee<sup>1,2</sup>, Dongwon Seo<sup>1,2</sup>, and Jun Heon Lee<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Animal & Dairy Science, Chungnam National University, Daejeon, 34134, Republic of Korea

<sup>2</sup>Jisan Farm, Yeonsan, Nonsan, 32910, Republic of Korea

### ABSTRACT

The *K* gene is well known as a late-feathering (LF) gene which is located on the Z chromosome and induces autosexing in different feather growth-speed in the early-stage of chicks. In addition, this gene is associated with an insertion of the endogenous *ev21* gene from avian leucosis virus and incomplete duplication (*ID*) containing a partial fusion of sperm flagellar protein 2 (*SPEF2*) and prolactin receptor (*PRLR*) genes. In this study, we have screened two markers that capture the *ev21* and *ID* region which were designed to identify the *K* gene distribution in the Yeonsan Ogye population to identify the different feathering phenotypes. For the calculation of the *K* gene frequency, a total of 79 birds (43 males, 36 females) were randomly investigated. If the birds have an LF phenotype, they are carrying *KK* or *Kk+* for males and a single *K* genotype for females. Whereas for the early-feathering (EF), males possess the recessive homozygous alleles, *k+k+*, and the females have a single *k+* genotype. In the male population, LF birds are 38 (88.4%) and EF birds are 5 (11.6%). Likewise, in the females, LF birds are 25 (69.4%) and EF birds are 11 (30.6%). The observed frequency of LF genotype is proper to develop LF gene-based parental line. In addition, these two markers can identify LF genotypes by identifying both *ev21* and *ID* regions. Therefore, after phenotype validation study, these markers can be used to identify the segregation of parental LF gene as one of the effective sexing methods for the Yeonsan Ogye population.

**Key words:** Autosexing, Late feathering, Yeonsan Ogye, *K* gene

\*Corresponding author: Jun Heon Lee

Division of Animal & Dairy Science, Chungnam National University, Daejeon, 34134, Republic of Korea  
Tel: +82-42-821-5779, Fax: +82-42-825-9754, E-mail: junheon@cnu.ac.kr

Received: 21 July, 2020, Revised: 04 September, 2020, Accepted: 07 September, 2020

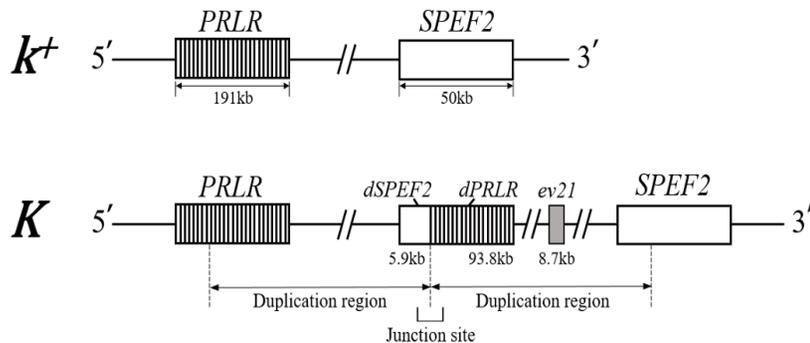


© Journal of Animal Breeding and Genomics 2020. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## Introduction

양계 산업에서 발생 직후의 암수의 감별은 집단의 이용과 관리체계 선정에 매우 중요하다. 육계와 산란계는 계통 별로 암탉과 수탉의 용도와 사육방법이 다르기 때문이다. 그러나 발생 초기의 병아리는 외관상 구분되는 암수의 특징이 거의 없어 암수 감별 어려움이 있어 높은 비용의 전문감별사의 생식돌기 판별에 의존하고 있다. 이러한 방법은 감별사의 판단에 의존하기 때문에 경우에 따라 성별판별의 오류가 발생할 수 있고 발생 직후의 병아리의 스트레스 노출의 요인이 되기도 한다. 깃털 발생 속도에 영향을 미치는 만우성 형질을 이용한 감별법은 반성유전형질로써 발생 12일 후 자가 성감별이 가능하기 때문에 간편함과 비용적인 장점으로 1950년대부터 산업에 적용되고 있다(Mueller and Moultrie, 1952; Plumart and Mueller, 1954; Siegel et al., 1957). 만우성 표현형은 우성형질로써 Z염색체 상에 위치한 K유전자에 연관되어 발생 초기에 날개깃과 꼬리깃이 느리게 발달하는 특징을 갖는다. 조우성 표현형은 일반적인 형태로서, 발생 초기의 깃털의 발생 속도가 상대적으로 빠르며, 열성인  $k^+$ 유전자에 연관되어 유전된다고 알려져 있다(Warren, 1925). 이러한 반성유전형질의 특성을 이용해서, 만우성 암컷( $Z^kW$ )과 조우성 수컷( $Z^{k^+}Z^{k^+}$ )을 교배하였을 때의 자손들은 조우성 암평아리( $Z^{k^+}W$ )와 만우성 수평아리( $Z^{k^+}Z^{k^+}$ )가 생산되는 것으로 깃털 형태를 기반으로 암수를 판별할 수 있다.

개체의 조우성과 만우성을 결정하는 DNA 상의 유전자 지역을 K유전자 좌위라고 한다. 이는 Prolactin receptor 결정 유전자인 *PRLR*과 정자의 편모단백질 결정 유전자인 *SPEF2*에 연관되어 있다. K유전자 좌위의 구조적인 특징으로는 조우성 유전자  $k^+$ 의 경우 정상적인 *PRLR*과 *SPEF2*만을 가지지만, 만우성 유전자  $K$ 의 경우 *PRLR*과 *SPEF2*유전자의 불완전한 중복이 존재하며, 그것에서 비롯한 *SPEF2*의 상류지역(*dSPEF2*)과 *PRLR*의 하류지역(*dPRLR*)이 결합한 형태인 *dSPEF2/dPRLR*, 그리고 결합의 구획점이 되는 연결 지점(Junction site)이 있다(Elferlnk et al., 2008). 또한, K유전자의 중복 지역에 내생성 레트로바이러스인 *ev21*의 유전자가 삽입된 부위가 존재한다(Figure 1; Bacon et al., 1988; Smith and Levin, 1991).



**Figure 1.** The scheme of genetic structure of  $k^+$  and  $K$  gene.  $K$  locus has two allele types,  $k^+$  and  $K$  gene.  $K$  locus has close linkage with *PRLR* and *SPEF2* gene on the Z chromosome. Structural differences between  $k^+$  and  $K$  gene are presence of fused *dSPEF2/dPRLR* region resulted by incomplete duplication region of *PRLR* and *SPEF2* and insertion of *ev21* in the duplicated region characterized in  $K$  gene structure.

*PRLR*; prolactin receptor gene, *SPEF2*; sperm flagellar 2 gene, *dSPEF2*; duplicated partial *SPEF2* gene, *dPRLR*; duplicated partial *PRLR* gene, *ev21*; endogenous virus *ev21* gene, Junction site; The breakpoint of *dSPEF2/dPRLR* region.

만우성 유전자를 확인하기 위한 분자유전학적 마커로써 *ev21* 삽입 부위가 주로 활용되어왔다(Iraqi and Smith, 1994; Kansaku et al., 2011; Bang et al., 2018). 그러나 여러 닭 품종들에 대한 연구들에서 *ev21*의 삽입이 아닌 *PRLR*과 *SPEF2*의 불완전한 중복이 만우성 표현형에 직접적으로 연관되어 있다는 결과가 보고되고 있다(Elferlnk et al., 2008; Zhao et al., 2016; Takenouchi et al., 2018; Xiuling et al., 2018). 이에 다른 품종에서 만우성 유전자 마커의 활용을 위해서는 만우성 개체의 유전체 상의 *ev21*의 삽입과 *dSPEF2/dPRLR*의 존재를 먼저 확인해야 할 필요가 있다.

한국의 재래닭 품종에서 만우성 유전자형의 분포를 확인한 연구는 꾸준히 수행되어왔으며 산업적 활용을 앞두고 있다(Shon et al., 2012; Bang et al., 2018; Kim et al., 2019). 본 연구에서는 산업에 이용될 조만우성 유전자 감별의 기초자료를 제공하고자 한국의 천연기념물인 연산오계 집단 내 만우성 유전자형의 분석을 실시하였다.

## Materials and Methods

공시 재료는 충남 논산시 화악리의 오계 농장에서 사육중인 동일 세대의 오계 79수 (암컷 36, 수컷 43)를 대상으로 익정맥의 혈액을 채취하여 실험에 활용하였다. 혈액 샘플 20  $\mu$ l와 PBS(phosphate buffer saline) buffer 180  $\mu$ l을 혼합하여 희석한 뒤 PrimePrep™ Genomic DNA isolation kit from blood (Genetbio, Korea)를 이용하여 Genomic DNA (gDNA)를 추출하였고, Nanodrop 2000c 분광흡도계(Thermo Fisher Scientific, USA)를 이용하여 DNA의 농도와 품질을 측정하였다. 추출된 gDNA는 25 ng/ $\mu$ l의 농도로 희석된 후 유전자형 분석을 위해 -20°C 이하에 보관되었다.

각 개체에서의 *ev21*과 *dSPEF2/dPRLR*의 존재를 확인하는 primer set을 만들기 위해서, NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에 공개된 데이터베이스에서 *ev21* 연관 유전자인 JFIL-1과 USIL-1 영역의 염기서열을 X54094.1과 X54093.1에서 획득하였고, Primer3plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>)에서 primer set을 디자인하였다. 같은 방법으로 *PRLR*, *SPEF2* 유전자와 *dSPEF2/dPRLR* 영역의 염기서열 정보를 NC\_006127.5, NC\_006127.5 그리고 KU553470.1에서 확인하여 primer set을 구성하였다. Primer set의 이름은 각각 삽입되는 유전자의 이름인 *ev21*과 *dSPEF2/dPRLR*에 존재하는 Junction site인 JS로 명명하였다(Table 1).

**Table 1.** List of primers used to amplify targeted regions

Primer	Forward/Reverse	Sequence	Product size (bp)
<i>ev21</i> <sup>1</sup> primer set			
GS10	Forward	TCTGTTGAGCCAGTCTTGATG	600
JFIL-2	Forward	TAAGCTGTTGCCACCATCAA	196
JFIL-R	Reverse	ATGCCAGCTGTCAATGTTCA	
<i>JS</i> <sup>2</sup> primer set			
PRLR-F	Forward	GCCTTCCCAGCTCAGATAAA	2,673
Junction-F	Forward	CCCATGTCCTTGCCCTAAAGA	1,710
Junction-R	Reverse	CATTTGATGACAGGGTGTGC	

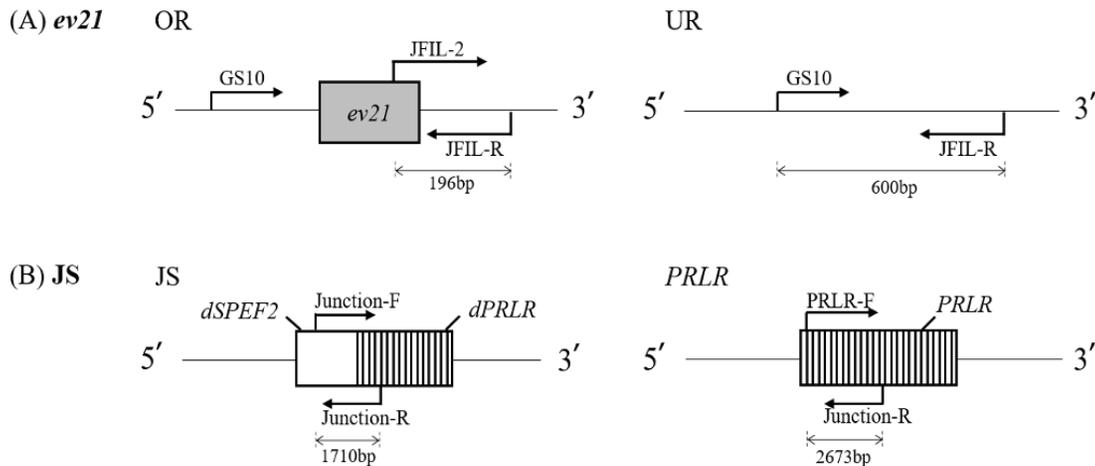
<sup>1</sup>*ev21* = endogenous virus 21 gene

<sup>2</sup>JS = Junction site of *dSPEF2/dPRLR*

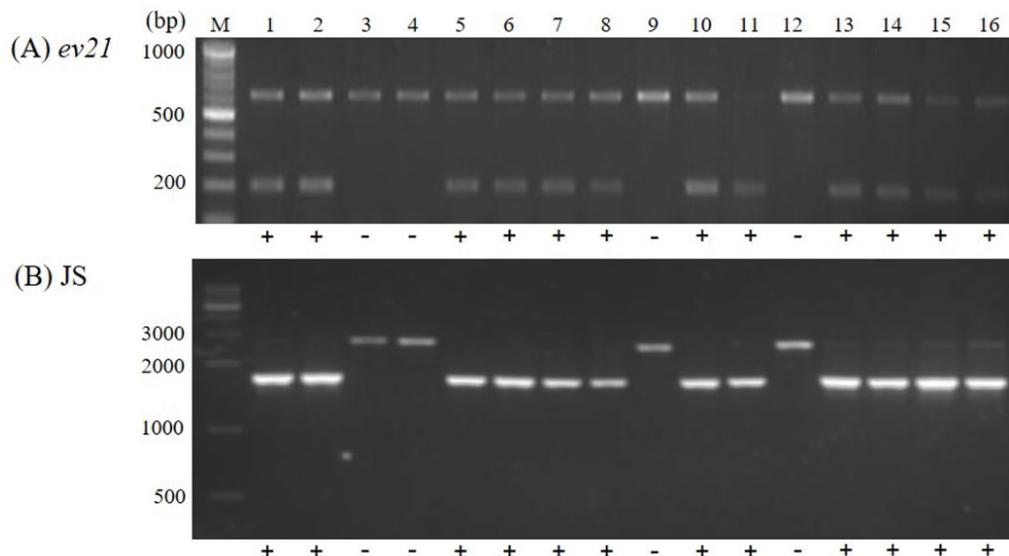
제작된 primer를 활용한 PCR(Polymerase chain reaction)을 위해 20  $\mu$ l의 mixture를 제작하였다. Mixture는 각 샘플 별로 25 ng의 gDNA, HS prime 2X premix (Genetbio, Korea) 10  $\mu$ l, 각 primer (10 pmol/ $\mu$ l)를 0.5  $\mu$ l씩 혼합하였고, 잔여 볼륨은 3 차증류수를 첨가하여 채웠다. 증폭 조건은 95°C에서 5분 pre-denaturation 후에 95°C에서 1분, 58.5°C에서 1분, 72°C에서 2분의 denaturation과 annealing 그리고 extension의 세 과정을 35 cycle 반복한 후 72°C에서 30분간 final extension을 수행하였다. PCR 증폭 산물은 TAE buffer를 이용하여 제작한 2% agarose gel에서 전기영동법을 통해 유전자형을 확인하였다.

## Results and Discussion

각각 *ev21* 삽입 부위와 *dSPEF2/dPRLR*의 존재를 확인하는 마커인 *ev21*과 JS를 이용한 PCR 유전자형 분석 결과를 젤 전기영동법으로 확인하였다. 오계 79수 중 63수(79.7%)에서 *ev21*과 *dSPEF2/dPRLR* 영역이 동시에 존재했으며, 해당 개체들은 만우성에 연관된 유전자형을 가진다고 할 수 있다. 나머지 16수(20.3%)에서는 두 변이 지역이 모두 관찰되지 않았으므로 조우성에 연관된 유전자형을 가지는 것으로 추정되었다(Figure 3) (Elferink et al., 2008). 동일개체에서 *ev21*마커와 JS 마커의 유전자형이 같게 나타난 것은 오계 집단에서의 만우성 유전자의 구조는 *ev21* 삽입과 불완전한 유전자 중복(*ID*)의 발생이 함께 일어나는 형태임을 의미한다. 이는 예외적인 만우성 유전자 구조를 가지는 Zhang 등(2018)의 Taihang chicken 과 HY-line Brown, 그리고 Takenouchi 등(2018)의 Ingie품종과 White Plymouth Rock-C 품종과는 차이가 있다. 따라서, 오계 개체의 만우성 유전자형을 확인하기 위한 실용적인 방법으로 *ev21* 삽입 부위와 *dSPEF2/dPRLR*의 존재를 확인하는 방법 두 가지 모두 활용될 수 있다.



**Figure 2.** Schematic diagram for PCR Amplification strategy using designed primer sets. (A) *ev21* marker produces amplicons of different lengths depending on the region that *ev21* occupied or unoccupied. Likewise, (B) JS marker generates amplicons of different lengths depending on the gene region that is Junction Site (JS) or *PRLR*. *ev21*; endogenous virus *ev21* gene, OR; *ev21* gene occupied region, UR; *ev21* gene unoccupied region, JS; Junction site of *dSPEF2/dPRLR*, *PRLR*; Prolactin receptor gene.



**Figure 3.** PCR genotyping results using (A) *ev21* and (B) JS markers. Sample numbers are at the top of picture. (A) PCR results showing bands derived from *ev21* marker. 196 bp PCR product represents presence of the *ev21* insertion region. (B) 1710 bp PCR product indicates the junction site of *dSPEF2/dPRLR* region.

오계 집단내 성별에 따른 유전자형의 빈도는 수컷 43수 중 38수(88.4%)가 만우성, 5수(11.6%)가 조우성 유전자형으로 나타났으며, 암컷 36수 중 25수(69.4%)에서 만우성, 11수(30.6%)에서 조우성 유전자형이 관찰되었다(Table 2). 마커의 증폭 특성상 *Kk+* 이형접합체의 식별이 어렵기 때문에 정확한 유전자 빈도는 알 수 없었다. 하지만, 이전의 Shon 등(2012)에서 표현형 구별법으로 확인한 국내 토종 순계의 만우성 유전자형 분포는 국립축산과학원에서 보유중인 한국재래닭 5계통 중 4계통과 오골계 품종에서 모든 개체가 열성 표현형인 조우성을 가지는 것으로 보고되었고 한국재래닭 적갈색 계통은 10일령 측정 기준 24.2%의 만우성 개체 비율이 관찰되었다. 같은 연구의 결과에서 외래 품종인 흑색 코니시종과 로드아일랜드레드종에서 각각 37.8%, 20.5%의 만우성 개체의 비율이 보고되었다. 본 연구에서 밝힌 오계 집단의 만우성 유전자형의 빈도(79.7%)는 조우성 유전자형 빈도(20.3%) 보다 확연히 높게 관찰되었는데, 이는 앞서 보고된 다른 계통들의 만우성 유전자형의 분포 형태와 현저한 차이를 보여주고 있다. 특히, 다수의 국립축산과학원 한국 재래닭 계통 및 오골계 품종에서 조우성 유전자가 고정되어 있는 것과는 대조적인 특징이 나타내었다. 또한, 외래 품종에 비해서도 오계 집단에서 더 높은 만우성 유전자형의 비율이 관찰되었다. Kim 등(2019)에서 표현형 구별법 및 분자유전학적 방법으로 확인한 H사의 토종순계의 유전자형 분포는 전체 754수 중 만우성 232수(30.8%), 조우성 522수(69.2%)의 양상을 보였다. 그 중 수컷이 186수 중 83수(44.6%)의 만우성 개체를 포함하였고, 암컷은 568수 중 149수(26.2%)의 만우성 개체가 보고되었다. 또한, Bang 등(2018)에서 분자유전학적 방법으로 통해 확인한 한협의 토종닭 실용계 856수의 유전자형의 분포는 만우성 110수(12.9%), 조우성 746수(87.1%)로 보고되었다. 오계를 대상으로 한 본 연구 결과와 Kim 등(2019)에서의 H사에서 육종된 실용토종종계 및 Bang 등(2018)의 결과인 실용계 계통과의 비교에서도 오계 집단의 만우성 유전자형의 비율이 더 높게 관찰되었다. 특히, 오계 집단의 수컷과 암컷의 만우성 유전자형의 비율이 다른 계통들에 비해 높게 나타났는데, 이를 통해 높은 만우성 유전자형의 빈도가 오계 집단의 특징이 될 수 있음을 추론할 수 있으며, 암컷의 높은 만우성 유전자형의 빈도는 만우성 형질을 이용해서 성 감별을 가능케 하기 위한 부모 세대 계통 조성 시에 수컷보다 많은 성비를 차지하는 암컷의 선발에 이점으로 작용할 수 있다.

**Table 2.** Results of identifying feathering type by sex, based on the presence or absence of endogenous virus 21 (*ev21*) and junction site (JS) of *dSPEF2/dPRLR* in Ogye population

Sex	<i>ev21/JS</i> <sup>1</sup>				PCR analysis <sup>2</sup>
	+/+	+/-	-/+	-/-	
Male	38	-	-	-	LF
	-	-	-	5	EF
Female	25	-	-	-	LF
	-	-	-	11	EF
Total	63	-	-	-	LF
	-	-	-	16	EF

<sup>1</sup>Symbols "+" and "-" indicate presence and absence of the PCR products, respectively.

<sup>2</sup>LF = Late feathering, EF = Early feathering

만우성 유전자형에 따른 한국 토종닭의 날개깃과 꼬리깃의 발달 양상은 Bang 등(2018)에서 다음과 같이 보고하였다. 날개깃의 경우 조우성 개체는 주익우와 부익우의 길이가 1일령에는 각각 13 mm와 9 mm로 차이가 나며, 7일령에는 주익우가 1.7배, 15일령에는 2배의 차이를 보였다. 이와는 대조적으로 만우성 개체는 대개 주익우와 부익우의 차이가 15일령까지는 미미하였다. 따라서, 발생 초기에 주익우의 길이만 비교하여도 조우성과 만우성을 구분할 수 있다고 보고하였다. 꼬리깃의 경우 조우성 개체는 5일령부터 발달이 관찰되기 시작하였으며, 7일령에는 깃대와 깃가지의 발달이 뚜렷한 특징을 보였다. 반면 만우성 개체는 17일령이 될 때까지 꼬리깃의 명확한 발달이 관찰되지 않았다고 보고하였다. 오계의 만우성 형질의 표현형에 대한 연구는 아직 수행되지 않았지만 이와 같은 표현형의 상이한 특징을 오계 집단의 실용적인 조우성 및 만우성 개체의 식별에 활용 가능할 것으로 사료된다.

## Conclusion

산업적으로 자가 성감별에 널리 이용되는 만우성 표현형은 발생 초기에 나타나기 때문에, 종계 선발 시기의 성계에서 조우성과 만우성 표현형을 구별하는 것은 불가능하다. 따라서, 만우성 형질을 이용한 후대의 자가 성감별을 조성하기 위해서는 만우성 유전자 마커의 활용이 필요하며, 집단 별로 만우성 유전자 분포가 다르고 유전자 지역의 구조적인 차이가 존재하기 때문에 유전자 마커를 새롭게 적용할 집단에 대해서 선행 분석이 요구된다(Shon et al., 2012; Bang et al., 2018; Kim et al., 2019; Zhao et al., 2016; Takenouchi et al., 2018; Xiuling et al., 2018). 만우성 유전자에 대한 종계 계통 조성이 이루어지지 않은 연산오계 집단에 대한 분석 결과, 만우성 유전자의 유전체 상의 구조는 *ev21*과 불완전한 유전자 중복(*TD*)이 항상 동시에 존재하는 형태인 것으로 밝혀졌다. 또한, 본 실험에서 확인된 연산오계 집단의 높은 만우성 유전자형 빈도(79.7%)는 조우성으로 고정된 한국의 다른 다수의 재래종들 및 오골계 계통 그리고 토착외래종 품종들과의 비교에서 대조적인 유전자 조성을 보였다. 따라서, 집단에서 높게 형성된 만우성 유전자형의 빈도는 만우성 계통 조성을 고려한 종계 선발에 큰 이점이 될 수 있을 것으로 예상된다. 본 연구는 연산오계 집단의 만우성 유전자의 형태와 분포 특성을 확인하였으며 표현형에 검증에 대한 후속 연구를 통해 실질적인 만우성 형질을 이용한 자가 성감별이 가능할 것이라 사료된다.

## Acknowledgement

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원의 Golden Seed 프로젝트 사업(213010-05-4-SB250)과 농촌진흥청 공동연구사업 / 골든씨드프로젝트(PJ012820052020)의 지원을 받아 연구되었음.

## References

- Bacon LD, Smith E, Crittenden LB and Havenstein GB. 1988. Association of the slow feathering (K) and an endogenous viral (ev21) gene on the Z chromosome of chickens. *Poult. Sci.* 67:191-197.
- Bang MH, Cho EJ, Cho CY and Sohn SH. 2018. Study on the Characteristics of Feather Developing Pattern and Morphology in Early- and Late-Feathering Korean Native Chickens. *Korean J. Poult. Sci.* 45(3):155-165.
- Elferink MG, Vall´ee AA, Jungerius AP, Crooijmans RP and Groenen MA. 2008. Partial duplication of the PRLR and SPEF2 genes at the late feathering locus in chicken. *BMC Genomics.* 9:391-400.
- Iraqi F and Smith EJ. 1994. Determination of the zygosity of ev21-K in late-feathering male White Leghorns using the polymerase chain reaction. *Poult. Sci.* 73:939-946.
- Kansaku, N., D. G´ueme´ne, A. Nakamura, and M. Uchida. 2011. Sequence characterization of K-gene linked region in various chicken breeds. *J. Poult. Sci.* 48:181-186
- Kim KG, Cho EJ, Choi ES, Kwon JH, Jung HC and Sohn SH. 2019. Comparison of Production Performances between Early- and Late-feathering Chickens in Parent Stocks of Korean Native Chicken. *Korean J. Poult. Sci.* 46(4):279-286.
- Mueller CD and Moultrie F. 1952. Classification of sex-linked early and late feathering in 10-week-old chickens. *Poult. Sci.* 31(1):171-172.
- Plumart PE and Mueller CD. 1954. Effect of sex-linked early feathering on plumage from 6 to 12 weeks of age. *Poult. Sci.* 33(4):715-721.
- Siegel PB, Mueller CD and Craig JV. 1957. Some phenotypic differences among homozygous, heterozygous, and hemizygous late feathering chicks. *Poult. Sci.* 36(2):232-239.
- Smith EJ and Levin I. 1991. Application of a locus-specific DNA hybridization probe in the analysis of the slow-feathering endogenous virus complex of chickens. *Poult. Sci.* 70:1957-1964.

- Sohn SH, Park DB, Song HR, Cho EJ, Kang BS and Suh OS. 2012. Genotype Frequencies of Sex-Linked Feathering. *J. Anim. Sci. Technol.* 54(4):267-274.
- Takenouchi. A, Toshishige. M, Ito. M and Tsudzuki. M. 2018. Endogenous viral gene ev21 is not responsible for the expression of late feathering in chickens. *Poult. Sci.* 97:403-411.
- Warren DC. 1925. Inheritance of rate of feathering in poultry. *J. Hered.* 16:13-18.
- Zhang X, Wang H, Zhang L, Wang Q, Du X, Ge L, Zhou R, Li L and Li X. 2018. Analysis of a genetic factors contributing to feathering phenotype in chickens. *Poult. Sci.* 97:3405-3413.
- Zhao J, Yao J, Li F, Yang Z, Sun Z, Qu L, Wang K, Su Y, Zhang A, Montgomery SA, Geng T and Cui H. 2016. Identification of candidate genes for chicken early- and late-feathering. *Poult. Sci.* 95:1498-1503.