

## 소의 수정란이식에 관한 연구

김일화 · 손동수 · 전대규 · 조현주 · 류일선 · 윤상보 · 최창열 · 이광원 · 김준식 · 김 현 · 박상분 · 지병천  
국립종축원

## Studies on Embryo Transfer in Cattle

I. H. Kim, D. S. Son, D. K. Jeon, H. J. Cho, I. S. Ryu, S. B. Yoon, C. Y. Choi,  
K. W. Lee, J. S. Kim, H. Kim, S. M. Park and B. C. Chee  
*National Animal Breeding Institute*

### Summary

This study was carried out to produce superior dairy cattle by embryo transfer. Seven dairy cows were superovulated with divided injection of FSH 40mg for 5 days started on day 9 to 14 of the estrus cycle and injection of PGF<sub>2</sub>α 45mg on day 4 of FSH injection. Donor cows were flushed to collect embryos on day 7 or 8 of the estrus cycle. Fresh embryos collected were transferred to synchronized dairy recipients or frozen using glycerol 3 step method to be equilibrated. And 35 embryos which were frozen using glycerol 6 step method were imported from U.S.A. After glycerol dilution of frozen embryos was done by reverse density during freezing, frozen-thawed embryos were transferred to synchronized dairy or beef recipients.

The results obtained were as follows ;

1. Total of 24 embryos were collected from 7 donor cows flushed and transferable embryos were 18 (75.0%).
2. Among 24 embryos, morula, early blastocyst, blastocyst, expanded blastocyst and unfertilized ova were 3 (12.5%), 1 (4.2%), 10 (41.6%), 4 (16.7%) and 6 (25.0%), respectively.
3. Heat inducing rate after 1st and 2nd injections of PGF<sub>2</sub>α in Holstein and beef cattle was 83.3% and 71.4% and 62.5% and 69.2%, respectively.
4. Among 56 recipients, 23 head were pregnant (41.1%). The pregnancy rate of fresh embryos was 50.0% (1/2 heads) and the pregnancy rate of frozen embryos which were frozen using glycerol 3 step and using glycerol 6 step imported from U.S.A. was 52.6%(10/19 heads) and 34.3%(12/35 heads), respectively.
5. The pregnancy rate of blastocyst (60.0%) was higher than that of morula (39.0%), early blastocyst (25.0%) and expanded blastocyst (0%).
6. The pregnancy rate of grade 1 embryos (52.2%) was higher than that of grade 2 (34.6%) and grade 3 (28.6%).
7. The pregnancy rate according to synchrony of recipient with donor was higher in simultaneous recipient (55.0%) and +12hrs' (53.8%) than -24hrs' (23.5%), -12hrs' (20.0%) and +24hrs' (0%).

### 서 론

가축 능력 개량의 조기달성을 위하여 이용되는 수정란이식은 수정란의 비외과적 채란, 이식 그리고 동결보존법이 확립됨에 따라 실용화가 가능하게 되었다(Rowe 등, 1980). 소의 수정란 이식에 있어서 자궁 경관을 경유한 비외과적 이식이 검부 혹은 정중선

절개후의 외과적이식보다 수태율은 낮으나 이식 시간의 단축, 이식비용의 절감등의 장점 때문에 비외과적이식이 계속 증가되는 실정이다(Sreenan, 1983; Schneider, 1980).

신선수정란은 공란우로 부터 채란하여 수 시간 이내 수란우에 이식하였을때 수태율이 높은 장점은 있으나 적절한 두수의 수란우의 준비와 수정란의 보존에

제약을 받는 단점이 있다. 그러나 동결수정란은 신선 수정란에 비해 수태율은 낮으나 장기간 보존, 수란우의 발정동기화 시기 선택, 국제간의 이동등의 장점 때문에 수정란이식의 실용화를 위해서는 신선수정란보다 유리하다(Christie, 1986; Foote, 1987). Wilmot 등(1973)에 의해 동결수정란 이식에 의한 첫번째 송아지가 태어난 이래 동결수정란의 수태율 향상을 위해서 수정란의 동결 및 융해시 손상을 줄이기 위한 많은 연구가 진행되었으나 신선수정란에 비하여 약 10%정도 수태율이 낮은 실정이다(Renard 등, 1983; Nelson 등, 1988).

수정란의 이식시 수태율 좌우하는 요인으로는 수정란의 발육단계와 질(Linder 등, 1983; Humblot 등, 1987), 공란우와 수란우의 발정의 동기화(Looney 등, 1984; New comb, 1979), 수정란의 이식 까지의 보존시간(Sreenan 등, 1975; Garcia 등, 1986) 등 외에도 이식시기, 공란우의 연령, 수란우의 발정동기화 방법등 많은 요인이 관계된다(Hasler 등, 1987). 그리고 수정란의 동결 및 융해후 생존에 영향을 미치는 요인은 동해방지제의 종류(Elsden 등, 1982; Prather 등, 1987), 액체질소 침지전 최종냉각 온도(Farrand 등, 1985), 수정란의 동결속도(Bilton 등, 1979; Elsdon 등, 1982) 등이 관계된다. 본 연구는 국립종축원에서 사육하고 있는 젃소 공란우로부터 채란된 수정란을 즉시 이식, 또는 glycerol 3단계 평형을 이용하여 동결보존후 이식하였거나 미국에서 생산되어 glycerol 6단계 평형으로 동결된 수정란을 도입하여 이식함으로써 젃소 후대감정용 후보종모우 및 고능력 종빈우의 생산과 동결수정란 이식의 기술을 확립하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시축

본 시험에 이용된 공란우는 국립종축원에서 사육중인 305일 보정유량이 8,000kg 이상인 고능력 유우 5두였으며 공란종빈우의 인공수정에 사용된 정액은 우수한 유우종모우 3두로부터 채취된 것이었고 미국으로부터 도입된 동결수정란 35개가 공시되었다. 수란우는 국립종축원에서 사육하고 있는 유우 39두와 대관령지원에서 사육중인 유우 40두였다.

### 2. 공란우 과배란처리

공란우 발정주기 9~14일째에 직장검사를 하여 자궁 및 난소상태를 확인한 후 MOT액 50ml를 주입하고 그 다음날 부터 FSH-P (Burns-Biotech Laboratories, U.S.A.) 40mg을 5일간 12시간 간격으로 감량분할 주사하고 4일째에 PGF<sub>2</sub>α 제제인 dinoprost (Lutalyse, Upjohn, U.S.A.) 45mg을 2회 분할 주사하여 과배란을 유도하였다.

### 3. 공란우 인공수정

공란우 발정발현 12시간후 정액 2스트로 인공수정 및 LH RH (콘세랄, 동방, 한국) 200mcg을 근육주사하였으며, 그 후 12시간 간격으로 정액 2스트로, 1스트로를 주입하였다.

### 4. 수정란 채란

공란우 발정발현후 7~8일에 2% lidocaine으로 경막의 마취를 실시한 후 채란액 Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS, Gibco Laboratories, U.S.A.)+2% foetal calf serum (FCS)을 사용하여 foley catheter에 의한 경관경유법으로 채란하였다.

### 5. 수정란 경검

회수된 채란액을 직경 9cm 샤페에 옮겨 담아 14~84 배율의 실체현미경으로 수정란을 찾아 발육단계와 성상을 조사하였다.

### 6. 수정란의 동결

#### 가. 자체생산 수정란

회수된 수정란을 보존액(D-PBS+20% FCS)으로 3회 세척후 0.4, 0.8, 1.4M glycerol 용액에서 각 단계별로 10분씩 평형을 실시하였다. glycerol 평형이 끝난 수정란을 0.25ml plastic straw에 1개씩 옮겨 넣은 후 -6℃까지는 -1℃/분의 비율로 온도를 하강시킨후 -6℃에 이르렀을 때 식빙을 실시하고 10분간 정지하였다가 -35℃까지는 -0.3℃/분, -38℃까지는 -0.1℃/분의 비율로 온도를 하강시켜 -38℃에 이르렀을때 액체 질소에 침지하였다.

#### 나. 도입동결 수정란

도입동결 수정란은 미국(CryovaTech International Inc.)으로부터 도입된 것으로 glycerol 6단계법

(0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.3M)으로 평형시켜 실온에서  $-6^{\circ}\text{C}$ 까지는  $-2^{\circ}\text{C}/\text{분}$ ,  $-6^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 정지하여 식빙을 실시하고,  $-30^{\circ}\text{C}$ 까지는  $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{분}$ 의 비율로 온도를 하강시켜 액체 질소에 침지한 후 액체 질소통에 보존하여 국내에 수송되어졌다.

### 7. 동결수정란의 용해

수정란이 들어있는 스트로를 액체 질소통에서 꺼내어  $30\sim 32^{\circ}\text{C}$ 의 온수에서 약 10초간 급속 용해한 후 수정란을 샤페에 옮겨 동결시 역순으로 glycerol을 희석하였다. glycerol 희석이 끝난 수정란을 최종적으로 glycerol이 함유되지 않은 보존액에서 약 10분간 보존후 0.25ml 스트로에 장전하였다.

### 8. 수란우의 발정동기화

수란우에  $\text{PGF}_2\alpha$  제제인 luprostiol (Prosolovin, Intervet, Holland 또는 reprodin, 한국 바이엘화학, 한국) 15mg을 1회 주사하거나 11일 간격으로 2회 주사하여 발정동기화를 유도하였으며, 주사 다음날부터 매일 3회(6시, 12시, 18시) 발정 상태를 관찰하였으며, 자연발정우도 수란우로 이용하였다.

### 9. 수정란이식

수란우에 2% lidocain으로 경막외 마취를 하고 0.25ml 스트로에 장전된 수정란을 비외과 이식기로 황체가 확인된 쪽의 자궁각 심부에 이식하였다.

### 10. 임신진단

이식후 60일에 직장검사에 의하여 임신 여부를 진단하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 수정란 회수 성적

공란우 5두중 3두는 1회, 2두는 2회 반복채란 하여 수정란을 회수한 성적은 표1과 같다. 과배란 처리된 공란우 7두에서 수정란이 24개 회수되어 평균 회수란수는 3.4개였으며 이식가능한 정상란은 18개(75.0%)로 평균 정상란수는 2.6개였다.

본 연구 결과는 Hasler 등(1983)이 보고한 평균 회수란수 10.3개, 평균 정상란수 6.4개와 Savage 등(1987)이 보고한 13.0개, 7.7개에 비해서 평균 회수란수, 평균 정상란수 모두 적었으며 Greve(1980)의 6.0개, 3.1개와 Delgado 등(1989)의 4.4개, 3.0개에 비해서는 평균 회수란수는 적었으나 평균 정상란수는 비슷하였다. 이와 같이 다른 연구자에 비해 수정란의 회수가 불량한 원인은 공란우의 호르몬제에 대한 미흡한 난소반응과 자궁의 하수에 의한 불완전한 수정란의 회수에 기인된 것으로 생각되며 다수의 수정란의 회수를 위해서는 공란우의 선발시 세심한 주의를 기울여야 할 것으로 사료된다. 수정란의 발육 단계별로는 배반포기가 10개(41.6%)로 가장 많았고 배반포 신장기 4개(16.7%), 상실기 3개(12.5%), 배반포 초기 1개(4.2%) 및 미수정란이 6개(25.0%)였다.

### 2. 수란우의 발정동기화후 발정발현을 조사

젖소 수란우 12두와 육우 수란우 40두에  $\text{PGF}_2\alpha$  제제로 1차 혹은 11일 간격으로 2차에 걸쳐 발정동기화를 실시한 후 발정발현율을 조사한 성적은 표2와 같다. 1차 동기화후 발정발현율은 젖소에서 83.3% (10/12두), 육우에서는 62.5% (25/40두)를 나타내

Table 1. Development stage of embryo recovered from superovulated donor

No. of donors	No. of embryos recovered	No. of transferable embryos(%)	Development stage of embryos* (%)					Total
			M	EB	B	E×B	UF	
7	24	18(75.0)	3	1	10	4	6	24
Mean ± S.D.	3.4 ± 2.4	2.6 ± 2.4	(12.5)	(4.2)	(41.6)	(16.7)	(25.0)	(100.0)

\* M: Morula, EB: Early blastocyst, B: Blastocyst  
E×B: Expanded blastocyst, UF: Unfertilized ovum

었고 2차 동기화후에는 젖소 71.4% (5/7두), 육우 69.2% (18.26두)였으며 발정발현시간은 주로 2~4일에 집중되었다.

### 3. 수태성적

수정란의 상태와 동결을 위한 glycerol 평형단계에 따른 수태율은 표3과 같다. 신선수정란은 2두중 1두가 수태되어 50.0%, glycerol 3단계법을 이용하여 동결된 자체생산 수정란은 19두중 10두가 수태되어 52.6%, 그리고 glycerol 6단계법으로 동결된 도입 수정란은 35두중 12두가 수태되어 34.3%였으며 전체적으로는 41.1%였다. 본 연구의 수태율(41.1%)은 Trounson 등(1978)의 40%, Chupin 등(1984)의 41.4% 및 Leibo(1986)가 보고한 42.4%와 비슷하였으며 Richards 등(1988)의 33%와 Leibo(1984)의 26.0% 보다는 높은 성적이었다.

수정란의 동결시 동해방지제인 glycerol이 다른 농도로 함유된 동결배지에서 여러단계로 평형을 시키는 이유는 수정란의 세포들이 갑작스런 삼투압의 변화에 노출되었을때 손상이 일어나는 것을 방지하기 위해서이다(Franks 등, 1986). 그러나 몇 단계의 glycerol 평형이 수정란의 생존에 적합한지는 아직

밝혀지지 않은 상태이므로 본 연구의 glycerol 3단계로 평형한 수정란의 수태율이 glycerol 6단계로 평형한 수정란의 수태율보다 높았는지에 대한 원인규명이 어려우며 동결수정란의 수태율 향상을 위하여 glycerol의 평형 단계에 대한 더 계속된 연구가 필요하다고 생각된다.

수정란의 발육단계별 수태성적은 표4와 같다. 배반포기는 10개중 6개(60.0%), 상실기는 41개중 16개(39.0%), 배반포초기는 4개 중 1개(25.0%)가 수태되었으며 배반포신장기는 1개 이식하였으나 수태되지 않았다.

Wright (1985)는 배반포기 37.5%, 배반포초기 35.0%, 상실기 28.5%의 수태율을 보고하여 배반포기가 가장 높은 점은 본 연구의 결과와 일치하였으나 배반포초기의 수태율이 상실기보다 높은 것은 상이한 결과를 보였다. 그리고 Christie(1986)는 상실기, 배반포초기, 배반포기의 수태율이 61.6%~62.4% 범위, Leibo(1986)는 상실기 45%, 배반포초기 40.0%, 배반포기 42%의 수태율을 보고하여 본 연구자는 다른 결과를 나타내었다. 이와 같이 수정란의 발육단계에 따른 수태율은 연구자에 따라 성적에 상당한 차이가 있는바 앞으로 원인규명을 위하여 더 많은 연구가

Table 2. Induction of estrus in Holstein and beef cattle after PGF<sub>2</sub>α administration

Classification	First injection		Second injection	
	Holstein	Beef cattle	Holstein	Beef cattle
Total treated	12	40	7	26
No. of estrus				
On: 1st day	—	2	—	—
2nd day	4	7	5	10
3rd day	6	10	—	8
4th day	—	6	—	—
Total(%)	10 (83.3)	25 (62.5)	5 (71.4)	18 (69.2)

Table 3. Pregnancy rate according to embryo condition and glycerol steps of frozen embryos

Embryo condition	Glycerol steps	No. of recipients	No. of pregnant recipients (%)
Fresh		2	1 (50.0)
Frozen	3 steps	19	10 (52.6)
	6 steps	35	12 (34.3)
Total		56	23 (41.1)

Table 4. Effect of the development stage of embryos on pregnancy rate

Development stage	No. of recipients	No. of pregnant recipients (%)
Morula	41	16 (39.0)
Early blastocyst	4	1 (25.0)
Blastocyst	10	6 (60.0)
Expanded blastocyst	1	0
Total	56	23 (41.1)

Table 5. Effect of embryo quality on pregnancy rate

Embryo quality	No. of recipients	No. of pregnant recipients (%)
1	23	12 (52.2)
2	26	9 (34.6)
3	7	2 (28.6)
Total	56	23 (41.1)

필요하다.

수정란의 성상에 따른 수태성적은 표5와 같다. 1등급의 수정란은 23개 중 12개(52.2%), 2등급은 26개 중 9개(34.6%), 3등급은 7개 중 2개(28.6%)가 수태되어 수정란의 성상이 좋을수록 수태율이 높았다는 Donaldson(1985), Humblot 등 (1987), Elsdon et al. (1979), Hasler 등(1987)의 보고와 일치하였다.

공란우와 수란우의 발정동기화 시간의 차이에 따른 수태율은 표6에서 보는 바와 같다.

Table 6. Effect of donor-recipient synchrony on pregnancy rate

Synchrony(h)*	No. of recipients	No. of pregnant recipients (%)
-24	17	4 (23.5)
-12	5	1 (20.0)
0	20	11 (55.0)
+12	13	7 (53.8)
+24	1	0
Total	56	23 (41.1)

\* Estrus in recipients exhibited times after(+) or before (-) donor

수란우의 발정발현이 공란우와 일치되었을때가 55.0%로 가장 높았고 12시간 늦었을때 53.8%, 12시간 빨랐을때 20.0%, 24시간 빨랐을때 23.5%였으며 24시간 늦었을때는 1두 이식하였으나 수태가 되지 않았다. Leibo(1984)는 수란우의 발정발현 시간이 공란우에 비해 12시간 빨랐을때(40%)와 일치되었을 때(36%)가 24시간 빨랐을때(30%)와 12시간 늦었을 때(31%) 보다 높았다고 보고하였으며 양 등(1988)은 수란우의 발정발현 시간이 공란우에 비해 12시간 늦었을때(62.5%)가 일치되었을때(33.3%)와 12시간 빨랐을때(20%)보다 높았다고 보고하여 본 연구의 결과와 차이를 나타내었다. 이러한 결과는 연구자에 따라 성적에 차이를 나타내므로 원인 규명을 위해서는 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 결 론

수정란 이식으로 우량유우를 생산코자 7두의 젖소 공란우에 발정주기 9~14일째 FSH 40mg을 5일간 분할 주사하고 4일째에 PGF<sub>2</sub>α 45mg으로 과배란을 유도하였다. 공란우의 발정발현 7~8일후에 수정란을 회수하여 발정이 동기화된 젖소 수란우에 신선수정란으로 이식하였거나 glycerol 3단계법을 이용하여 동결 보존 시켰으며, 미국으로 부터 glycerol 6단계법에 의해 동결된 수정란 35개를 도입하였다. 동결수정란은 동결 역순으로 glycerol을 제거한 후 발정이 동기화된 젖소 혹은 육우 수란우에 이식하였던 바 그 결과는 다음과 같다.

1. 과배란 처리된 공란우 7두에서 24개의 수정란이 회수되었으며 이식가능한 정상란은 18개(75.0%)였다.

2. 회수된 수정란의 발육단계는 상실기 3개(12.5%), 배반포초기 1개(4.2%), 배반포기 10개(41.6%), 배반포신장기 4개(16.7%) 및 미수정란 6개(25.1%)였다.

3. PGF<sub>2</sub>α 제제 주사에 의한 수란우의 발정발현율은 젖소에서 1차 주사후 83.3%, 2차 주사후 71.4%였으며 육우에서는 1차 주사후 62.5%, 2차주사후 69.2%였다.

4. 수란우 56두에 이식한 결과 23두가 수태(41.1%) 되었으며, 수정란의 상태에 따른 수태율은 신선

수정란 50.0%(1/2두), glycerol 3단계법을 이용한 동결수정란 52.6%(10/19두) 및 glycerol 6단계법을 이용한 도입 동결수정란은 34.3%(12/35두)였다.

5. 수정란의 발육단계별 수태율을 배반포기(60.0%)가 상실기(39.0%), 배반포초기(25.0%) 및 배반포신장기(0%) 보다 높았다.

6. 수정란의 성상에 따른 수태율은 1등급(52.2%) 이 2등급(34.6%) 및 3등급(28.6%) 보다 높았다.

7. 공란우와 수란우의 발정동기화 시간의 차이에 따른 수태율은 수란우의 발정이 공란우와 일치되었을 때(55.0%)와 12시간 늦었을때(53.8%)가 12시간 빨랐을때(20.0%), 24시간 빨랐을때(23.5%) 및 24시간 늦었을때(0%) 보다 높았다.

## 인 용 문 헌

- Bilton, R. J. and W. B. Moore, 1979. Factors affecting the viability of frozen stored cattle embryos. *Aust. J. Biol. Sci.* 32:101-107.
- Christie, W. B. 1986. Deep freezing of cattle embryos. *Proc. 5th Annu. Conv. Am. Embryo Transfer Assoc.* pp. 33-42.
- Chupin, D., B. Florin and R. Procureur. 1984. Comparison of two methods for one-step in-straw thawing and direct transfer of cattle blastocysts. *Theriogenology.* 21:455-459.
- Delgado, A. R. P., R. P. Elsdén and G. E. Seide. 1989. Effects of GnRH on superovulated cattle. *Theriogenology.* 31:317-321.
- Donaldson, L. E. 1985. Matching of embryo stages and grades with recipient oestrous synchrony in bovine embryo transfer. *Vet. Rec.* 117:489-491.
- Elsden, R. P., G. E. Seidel, T. Takeda and G. D. Farrand. 1982. Field experiment with frozen-thawed bovine embryos transferred nonsurgically. *Theriogenology.* 17:1-10.
- Elsden, R. P., L. D. Nelson and G. E. Seidel, Jr. 1979. Embryo transfer in fertile and infertile cows. *Theriogenology.* 11:17-25.
- Farrand, G. D., R. P. Elsdén and G. E. Seidel. 1985. Effect of slow cooling end point temperature on survival of frozen bovine embryos. *J. Ani. Sci.* 61: 460-465.
- Foote, R. H. 1987. In vitro fertilization and embryo transfer in domestic animals: applications in animals and implications for humans. *J. In Vitro Fertilization and Embryo Transfer.* 4:73-88.
- Franks, G. C., S. L. Coley, B. Betterbed and R. D. Page. 1986. The effect of freezer type, cryoprotectant, and processing methods on viability of frozen embryos. *Theriogenology.* 26:135-144.
- Garcia, M. A., M. L. Fahning and E. F. Graham. 1986. In vitro culture, freezing, thawing and transfer of bovine embryos versus transfer of fresh embryos from the same collection: preliminary results. *Theriogenology.* 26:803-812.
- Greve, T. 1980. Embryo transplantation in cattle non-surgical recovery of embryos from repeat breeders. *Acta. Vet. Scand.* 21:26-33.
- Hasler, J. F., A. D. Mccauley, E. C. Schermerhorn and R. H. Foote. 1983. Superovulatory responses of Holstein cows. *Theriogenology.* 19:83-99.
- Hasler, J. F., A. D. Mccauley, W. F. Lathrop and R. H. Foote. 1987. Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology.* 27:139-168.
- Humblot, P., J. Perrin, N. Jeanguyot, M. Nibart and M. Thibier. 1987. Effect of age and quality of thawed embryos, synchronization and corpus luteum function on pregnancy rates of bovine embryo recipients. *Theriogenology.* 27:240.
- Leibo, S. P. 1984. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology.* 21:767-790.
- Leibo, S. P. 1986. Commercial production of pregnancies from one-step diluted frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology.* 25:166.
- Lindner, G. M. and R. W. Wright. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology.* 20:407-416.
- Looney, C. R., A. J. Oden, J. M. Massey, C. A. Johnson and R. A. Godke. 1984. Pregnancy rates following HCG administration at the time of transfer in

- embryo-recipient cattle. *Theriogenology*, 21:246.
- Nelson, C. F. and L. D. Nelson. 1988. Cryopreservation of 7- to 9- day bovine embryos. *Theriogenology*, 29:281.
- Newcomb, R. 1979. Surgical and non-surgical transfer of bovine embryos. *Vet. Rec.* 105:432-434.
- Prather, R. S., M. F. Spire and R. R. Schalles. 1987. Evaluation of cryopreservation techniques for bovine embryos. *Theriogenology*, 28:195-204.
- Renard, J. P., Y. Heyman, P. Leymonie and J. C. Plat. 1983. Sucrose dilution: a technique for field transfer of bovine embryos frozen in the straw. *Theriogenology*, 19:145.
- Richards, D. W., J. D. Sikes and C. N. Murphy. 1988. Nonsurgical transfer and survival of frozen-thawed bovine embryos supplemented with raffinose. *Theriogenology*, 29:205.
- Rowe, R. F., M. R. Del campo, J. K. Critser and O. J. Ginther. 1980. Embryo transfer in cattle: nonsurgical transfer. *Am. J. Vet. Res.* 41:1024-1028.
- Savage, N. C., W. Howell and R. J. Mapletoft. 1987. Superovulation in the cow using estradiol 17 $\beta$  or GnRH in conjunction with FSH-P. *Theriogenology*, 27:383-394.
- Schneider, H. J., R. S. Castle berry and J. L. Griffin. 1980. Commercial aspects of bovine embryo transfer. *Theriogenology*, 13:73-85.
- Sreenan, J. M., D. Beehan and P. Mulvehill. 1975. Egg transfer in the cow: factors affecting pregnancy and twinning rates following bilateral transfers. *J. Reprod. Fert.* 44:77-85.
- Sreenan, J. M. 1983. Embryo transfer procedure and its use as a research technique. *Vet. Rec.* 112:494-500.
- Trounson, A. O., B. F. Shea, G. W. Ollis and M. E. Jacobson. 1978. Frozen storage and transfer of bovine embryos. *J. Anion. Sci.* 47:677-681.
- Wilmot, I. and L. E. A. Rowson. 1973. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet. Rec.* 92:686-690.
- Wright, J. M. 1985. Commercial freezing of bovine embryos in straws *Theriogenology*, 23:17-29.
- 양보석, 오성종, 유승환, 김희석, 정연후, 이상근. 1988. 환우에 있어서 다배란의 반복처리 및 동결수정란 이식에 관한 연구. *한국수정란이식연구회지*, 3:38-42.