

초기배의 발달속도에 따른 후기배로의 배 발달을

공일근 · 주영국 · 이효중* · 궤대오** · 박충생

경상대학교 농과대학 축산학과

Effect of Cell Stage of Embryos at 48 Hours Post-Insemination on *In Vitro* Development of IVF Bovine Embryos

I.K. Kong, Y.K. Joo, H.J. Lee*, D.O. Kwock** and C.S. Park

Department of Animal Science, College of Agriculture, Gyeongsang National University

SUMMARY

This experiment was investigated the effect of cell stage of embryos at 48 hours post-insemination on *in vitro* development of IVF embryos. The ovaries of Korean native cows or heifers were obtained from an abattoir and kept on 25 to 28°C and transported to laboratory within 2 hrs. The oocytes were matured *in vitro*(IVM) for 24 hrs. in TCM-199 supplemented with 35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FSH, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LH, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ estradiol-17 β and granulosa cells at 39°C under 5% CO₂ in air. They were fertilized *in vitro*(IVF) by epididymal spermatozoa treated with heparin for 24 hrs. , and then the zygotes were co-cultured *in vitro*(IVC) with bovine oviductal epithelial cells for 7 to 9 days. At 48 hrs. post-insemination, the embryos were classified into 5 to 8-cell, 3 to 4-cell or 2-cell stage and then were co-cultured *in vitro*(IVC) with bovine oviductal epithelial cells until the embryos reached blastocyst stage. Embryos developed to blastocyst stage were stained with Hoechst 33342 for cell counting. The embryos of 5 to 8-cell stage at 48 hrs. post-insemination with grade I oocytes were significantly ($P < 0.05$) better developed to blastocysts(63.0%) than 3 to 4-cell(42.0%) and 2-cell stage(2.7%) embryos which delayed in the early cleavage, and those embryos cleaved faster in the very early stage seemed to develop to blastocysts earlier. These results indicate that the embryos cleaved faster at 48 hrs. post-insemination seemed to develop to blastocysts earlier.

Key words : bovine, *in vitro* fertilization and development

* 경상대학교 수의과대학(Department of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University)

** 경상대학교 사범대학 과학교육과(Department of Science Education, Gyeongsang National University)

서 론

체외성숙, 수정방법의 성공적인 발전은 체내수정 과정의 규명과 수정란생산을 위한 경제적인 발전과 가축개량을 위한 선발로 매우 유용하게 되었다. 현재 체외수정기법의 가장 유리한 점으로는 저렴하게 체외수정란을 대량 생산할 수 있다는 것이다 (Bavister 등, 1992). 이러한 체외수정란은 초기배 발달과 경제적인 송아지의 생산 등의 연구에 사용되어질 수 있으며, 가축의 유전적인 개량계획은 난포란의 체외성숙과 수정으로 세대간격을 줄일 수 있다 (Betteridge 등, 1989). 현재 난포란의 체외성숙, 수정방법으로 이식 가능한 후기배의 안전한 생산기법이 정립되어 있다 (Pinyopummintr 와 Bavister, 1991; Hernadez 등, 1993; Leibfried-Rutledge 등, 1989). 체외수정란의 생산을 위한 미성숙 난포란은 도축의 난소에서 채취하며 채취한 난포란의 성숙은 혈청과 hormone이 첨가된 성숙배양액에서 성숙시키며 (Fukui와 Ono, 1989; Fukui 등, 1991; Mochizuki 등, 1991) heparin 등으로 수정능 획득시킨 정자로 체외수정을 유도한다 (Parish 등, 1986). 그러한 체외수정란은 난구세포나 난관상피세포와의 공배양으로 8~16 세포기의 cell block을 극복하여 후기배로의 배발달을 유도한다 (Goto 등, 1988; Eyestone과 First, 1989; Rexroad, 1989). 일단 2-세포기까지 분할된 수정란은 상실배와 배반포기 배까지 20~40%의 배발달을 한다고 보고하였다 (Eyestone과 First, 1989; Younis 와 Brackett, 1990; Pollard 등, 1989; Kajihara 등, 1990). 체외수정란의 생산을 위한 성공적인 배발달에도 불구하고 체외수정란의 생리적인 중요한 면이 무시되어 왔는데, 수정후 초기배 발달속도에 따라 후기배로의 배 발달에 중요한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

따라서 본 연구는 난포란의 체외수정 후 초기배 발달속도가 후기배로의 배 발달에 어떠한 영향을 미치는가를 조사하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공시난자의 채취

난소는 penicillin G(100 units/ml)와 streptomycin(100 µg/ml)이 함유된 생리식염수(25~28℃)에 넣어 2 시간 이내에 실험실로 운반하였다. 난포란은 중난포(직경 2~6 mm)에서 채취하였으며 4~5 회 기본용액(TCM-199 + 10% FCS)으로 세척하여 난포란의 선발은 Wiemer 등(1991)의 방법에 준하여 난구세포층과 세포질의 충실도에 따라 실시하였다.

즉, 도립현미경(Olympus, 일본) 하에서 4~5 층의 난구세포층이 충만하면서 균일한 세포질을 가진 것을 Grade I, 2~3 층의 난구세포층을 가진 것을 Grade II, 부분적으로 나화된 것을 Grade III으로 구분하였으며, Grade I 과 II의 난포란만을 실험에 공시하였다.

2. 난포란의 체외성숙 배양액 과 체외성숙

체외성숙 배양액은 TCM-199 배양액에 sodium pyruvate(56 µg/ml), streptomycin (100 µg/ml), penicillin G(100 units/ml)와 hormone으로는 LH(10 µg/ml), estradiol-17β(1 µg/ml), FSH(35 µg/ml)를 첨가하였고 혈청으로는 10~FCS를 첨가하였다. 이와 같이 준비된 체외성숙 배양액은 4-well dish에 1 ml씩 분주하여 5% CO₂, 98~99% 습도, 39℃ CO₂ incubator에서 18 시간 이상 전배양을 실시하여 평형을 유도하였다. 체외성숙시 과립막세포도 2~3×10⁶ cells/ml의 농도로 난포란과 같이 약 24~26 시간 동안 공배양을 실시하여 난구세포의 팽창과 세포질의 충실도 등으로 체외성숙을 판정하여 체외수정에 공시여부를 판단하였다.

3. 정자준비와 체외수정

체외수정을 위한 정자의 준비는 정소상체미부 정자로서 caffeine(10 µM)이 첨가된 세척용 B. O. medium으로 60 분 동안 swimming-up을 유도하여 부유된 상층의 정자만을 채취하여 500×g로 1 회 원심분리한 후, 수정능획득을 위하여 BSA(5 mg/ml), caffeine(5 mM) 및 heparin(10 µg/ml)이 첨가된 수정용 B. O. medium을 5 ml 첨가하여 다시 500xg로 원심분리한 후 약 1 ml의 수정용 B. O. medium을 첨가하여 CO₂ incubator에서 10~15분간 수정능

획득을 유도하였다. 체외수정은 성숙된 난포란을 수정용 B. O. medium으로 3~4 회 세척한 다음 수정용 B. O. medium 100 μ l drop 당 10~15 개의 난자를 옮긴 후 수정능이 획득된 활력도가 높은 정자의 최종농도가 $2\sim 3\times 10^6$ sperms / ml이 되게 첨가시켜 약 24시간 동안 CO₂ 배양기에서 수정을 유도하였다.

4. 수정란의 체외배양

체외수정 후 회수된 수정란을 TCM-199 배양액으로 4~5 회 세척하여 잔여 난구세포와 정자를 제거한 후에 단층을 형성하고 있는 난관상피세포와 공배양시키면서 48 시간마다 신선배양액으로 교환하였으며, 5 일이 경과한 monolayer cells은 신선한 monolayer cells로 교환하였다. 초기배 발달속도가 후기배로의 배 발달에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하기 위하여 수정 후 48 시간대에 5~8 cell, 3~4 cell 및 2 cell로 분류하여 수정 후 7~9 일까지 후기배로의 배 발달을 조사하였다.

5. 공배양을 위한 난관상피세포와 과립막세포의 준비

1) 과립막세포의 준비

대난포(직경 10 mm 이상)에서 난포액과 함께 과립막세포를 채취하여 TCM-199 배양액으로 500xg에서 5 분간 원심분리하여 상층액은 제거하고 나머지 pellet 부분은 다시 2 회 이상 세척하여 pellet 부분을 재부유시켜 $2\sim 3\times 10^6$ cells / ml의 최종농도로 조정하여 48 시간동안 배양시킴으로써 Fig. 3과 같이 monolayer cells의 형성을 유도하였다.

2) 난관상피세포의 준비

도축장에서 수집한 난관을 생리식염수에 담아 오염방지를 위하여 얼음위에서 실험실로 운반하여 항생제가 함유된 생리식염수로 세척하여 멸균된 휴지로 난관표면을 닦고 멸균된 수술기구로 결합조직과 지방덩이를 철저히 제거한 다음 다시 생리식염수로 세척하여 오염 가능성이 있는 양 끝부분의 약 1 cm 정도를 절단한 후에 난관협부에서 누두부쪽으로 10 ml syringe에 TCM-199 medium으로 약 1 ml을 관류시킨 후 핀셋으로 난관을 압착하면서 난관상피세

포를 채취하였다. 채취한 상피세포는 500xg에서 5 분간 원심분리시켜 상층액을 제거하고 나머지 pellet 부분을 2 회이상 세척하여 $2\sim 3\times 10^6$ cells / ml의 최종농도로 조정하여 48 시간동안 배양시킴으로써 monolayer cells의 형성을 유도하였다.

6. 체외수정란의 활구수 조사

체외수정란의 초기배 발달속도가 활구수에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하기 위하여 수정 후 7, 8 및 9 일째 배반포기까지 발달한 배를 fluorescent dye인 Hoechst 33342(Sigma Chem. Co., 미국)를 이용한 Pursel 등(1985)의 방법에 준하여 핵염색을 실시한 후 형광현미경(Nikon, 일본)의 200~400 배율 하에서 핵의 수를 조사하였다.

7. 통계학적 분석

실험결과와 통계학적 분석은 Microsta computer statistical program package를 사용하여 χ^2 -test 및 T-test를 이용하여 분산분석과 유의차를 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 초기배의 발달속도에 따른 후기배로의 배 발달

체외수정 후 48 시간대에 초기배 발달속도에 따라 5~8 cell, 3~4 cell 및 2 cell로 분류하여 후기배로의 발달을 유도한 결과는 Table 1, 2에서 나타난 바와 같다. Grade I 난포란에서 총 118 개를 수정시킨 결과 106 개(89.8%)가 분할하였고 그 중에서 5~8 cell(33 개 : 31.1%), 3~4 cell(50 개 : 47.2%) 및 2 cell(23 개 : 21.7%)로 분류되어 후기배로의 발달을 유도한 결과 각각 20 개(60.6%), 21개(42.0%) 및 5 개(21.7%)가 상실배기와 배반포기 배까지 발달하여 초기배 발달속도가 빠른 5~8 cell에서 유의적(P<0.05)으로 높은 배 발달율을 보였다. 이와 같은 결과는 Grade II 난포란에서도 비슷한 경향을 보였다. 그리하여 초기배 발달속도에 따른 배반포기 배까지의 발달속도를 조사하기 위하여 수정 후 48 시간대에 5~8 cell, 3~4 cell 및 2 cell로 분류하여 7, 8 및 9 일에 배반포기 배까지의 배

Table 1. Effect of cell stage of bovine embryos at 48 hours after IVF from Grade I oocytes on their subsequent development *in vitro*

Cell stage at 48 hrs post -insemination	No. of embryos cleaved	No. and (%) of embryos developed to /Cleaved		
		Morula	Blastocyst	Morula and Blastocyst
5~8 cell	33	5	15	20(60.6) ^a
3~4 cell	50	14	7	21(42.0) ^{ab}
2 cell	23	3	2	5(21.7) ^b
Total	106	22	24	46(43.4)

* Values with different superscripts in the same column were significantly (P<0.05) different.

Table 2. Effect of cell stage of bovine embryos at 48 hours after IVF from Grade II oocytes on their subsequent development *in vitro*

Cell stage at 48 hrs post -insemination	No. of embryos cleaved	No. and (%) of embryos developed to /Cleaved		
		Morula	Blastocyst	Morula and Blastocyst
5~8 cell	10	3	2	5(50.0) ^a
3~4 cell	29	3	6	9(31.0) ^{ab}
2 cell	41	4	2	6(14.6) ^b
Total	80	10	10	20(25.0)

* Values with different superscripts in the same column were significantly (P<0.05) different.

Table 3. Progression of cleavage to blastocyst stage by cell stage of bovine embryos at 48 hrs. after IVF from Grade I oocytes

Cell stage at 48 hrs post -insemination	No. of embryos cleaved	No. and (%) of embryos developed to /Cleaved			
		Day 7	Day 8	Day 9	Total
5~8 cell	27	9(33.3) ^a	7(25.9) ^a	1(4.0)	17(63.0) ^a
3~4 cell	40	6(15.0) ^{ab}	4(10.0) ^{ab}	5(12.5)	15(37.5) ^b
2 cell	40	3(7.5) ^b	1(2.5) ^b	0(0.0)	4(10.0) ^c
Total	107	18(16.8)	12(11.2)	6(5.6)	36(33.6)

* Values with different superscripts in the same column were significantly(P<0.05) different.

Table 4. Progression of cleavage to blastocyst stage by cell stage of bovine embryos at 48 hrs. after IVF from Grade II oocytes

Cell stage at 48 hrs post -insemination	No. of embryos cleaved	No. and (%) of embryos developed to /Cleaved			
		Day 7	Day 8	Day 9	Total
5~8 cell	5	2(40.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(40.0)
3~4 cell	8	1(12.5)	2(25.0)	1(12.5)	4(50.0)
2 cell	13	2(15.4)	0(0.0)	0(0.0)	2(15.4)
Total	26	5(19.2)	2(7.7)	1(3.9)	8(30.8)

발달을 조사한 결과는 Table 3, 4에서 나타난 바와 같다.

Grade I 난포란에서 5~8 cell, 3~4 cell 및 2 cell로 분류되어 7 일째에 각각 33.3, 15.0 및 7.5%가 배반포기 배까지 발달하였고, 9 일째까지 총 배반포기 배까지 발달율은 63.0, 37.5 및 10.0%로써 초기배 발달속도가 빠른 5~8 cell에서 7 일째 및 9 일째 까지의 배반포기 배까지 발달율이 유의적($P < 0.05$)으로 높은 것을 알 수 있었다. 또한 Grade II 난포란에서도 비슷한 경향을 보이고 있다. Van Soom 등(1992)은 수정 후 24, 30, 36, 42 및 48 시간대에서 2 cell로 발달한 수정란이 각각 46, 49, 37, 15 및 0%가 상질기 배까지 발달함을 보고하였다. Pollard 등(1991), Vergos 등(1989) 및 Plante와 King(1992)은 체외수정 후 24~48 시간대에 대부분 분할하는데 30 시간대에 분할된 2 세포기는 배반포기(65.7%)와 부화기(50.9%)까지의 배 발달율이 가장 높은 반면 48~62 시간대에 2 세포기로 분할된 것은 거의 배 발달이 일어나지 않았다고 보고하였다. 또한 Pollard 등(1991)과 Vergos 등(1989)은 수정 후 44~48 시간대에 4 세포기 이상 발달된 것은 배반포기 배까지의 배 발달율이 66.3%로서 0~3 세포기 일때 43.7% 보다 유의적으로 발달율이 높았는데 이와 같이 초기배 발달속도가 빠를수록 후기배로의 발달에 결정적인 영향을 미친다는 보고와 본 실험결과와는 비슷한 경향을 보였다.

2. 초기배의 발달속도에 따른 할구수 조사

초기배 발달속도에 따른 배반포기 배까지의 발달을 조사하기 위하여 배양 제 7, 8 및 9 일째에 핵염색을 실시하여 할구수를 조사한 결과는 Table 5에서와 같다. 수정 후 48 시간대에 5~8 cell, 3~4 cell 및 2 cell로 분류된 구에서 7 일째 할구수는 81.3 ± 8.4 , 71.1 ± 9.4 및 84.0 ± 0.0 개로 조사되어 7 일째에 배반포기 배까지 발달하는 것은 거의 비슷한 할구수를 보였다. 그러나 배반포기 배까지 발달하는 시간이 늦어질수록 할구수가 감소하는 경향을 나타내었다. 이와같은 결과에서 배반포기까지 일찍 도달하는 배에서 더욱 할구수가 많았으며 발달속도가 늦은 것일수록 할구수의 감소를 초래하는 것으로 사료되며, 초기배 발달속도가 빠르고 배반포기 배까지의 발달속도가 빠른 것일수록 배발달속도가 늦은 것보다 상대적인 할구수의 증가로 배의 질적인 평가에서 더 양호한 것으로 사료된다.

그러나 일정한 시기에 초기배 분할속도에 따른 후기배로의 배발달과 할구수를 조사하지 못하고 배반포기 배까지 발달한 것만 조사하였기 때문에 직접적인 비교는 되지 않았지만 일정한 시기에 배양하면 모든 수정란을 조사하였다면 초기배 발달속도가 빠를수록 분할속도가 빨라서 할구수의 증가를 확인할 수 있었으리라 생각된다.

Table 5. Effect of cell stage of bovine embryos at 48 hrs. after IVF on the number of blastomeres of embryos developed in vitro to blastocyst stage

Cell stage at 48 hrs post-insemination	No. of Day 7	No. and (%) of embryos developed to /Cleaved		
		Day 8	Day 9	
Grade I	5~8 cell	$81.3 \geq 8.4(7)$	$54.0 \geq 5.9(7)$	$61.0 \geq 0.0(1)$
	3~4 cell	$71.1 \geq 9.4(7)$	$73.7 \geq 11.9(6)$	$49.5 \geq 4.5(2)$
	2 cell	$84.0 \geq 0.0(1)$	$30.0 \geq 0.0(1)$	(0)
Grade II	5~8 cell	$79.0 \geq 10.0(2)$	(0)	(0)
	3~4 cell	$56.5 \geq 14.5(2)$	$63.0 \geq 17.0(2)$	$82.3 \geq 22.5(3)$
	2 cell	(0)	(0)	(0)

* Mean \geq S.E. The figures in parentheses indicate the number of embryos stained.

적 요

한우 난포란을 이용한 체외성숙과 체외수정을 유도하기 위하여 도축우의 난소로부터 채란한 난포란을 Grade I, II 등급으로 구분하여 TCM-199에 10% FCS와 LH(10 mg/ml), estradiol-17 β (1 mg/ml), FSH(10 mg/ml)가 첨가된 체외성숙 배양액에서 24 시간동안 체외성숙시켜 한우 정소상체 미부정자를 B. O. 배양액으로 수정능획득시켜 24 시간동안 수정을 유도하였다. 체외수정 후 48 시간대에 초기배발달속도에 따라 5~8 cell, 3~4 cell 및 2 cell로 구분하여 난관상피세포와 공배양을 실시하면서 이식 가능한 후기배로의 배 발달을 유도한 결과는 다음과 같다.

1. 체외수정 후 48 시간째에 분할속도에 따라 5~8 cell, 3~4 cell 및 2 cell 로 구분하여 배 발달을 유도한 결과 Grade I에서 106개의 분할난 중에서 5~8 cell(33개 : 31.1%), 3~4 cell(50개 : 47.2%) 및 2 cell(23개 : 21.7%)로 분류되어 각각 20개(60.6%), 21개(42.0%) 및 5개(21.7%)가 상실배와 배반포기 배로 발달하였고 Grade II에서는 각각 5~8 cell(10개 : 12.5%), 3~4 cell(29개 : 36.3%) 및 2 cell(41개 : 51.3%)로 분류되어 50.0%(5개), 31.0%(9개) 및 14.6%(6개)의 배 발달율을 보였다.

이와 같이 초기배 발달속도에 따른 배반포기 배까지의 발달속도는 7일째 33.3, 15.0 및 7.5%가 발달하여 9일째까지는 총 배반포기까지의 발달율이 63.0, 37.5 및 10.0%로써 초기배 발달속도가 빠른 5~8 cell에서 후기배로의 발달속도와 발달율에 유의적 ($P < 0.05$)으로 높은 결과를 얻었다.

2. 배 발달속도에 따른 할구수의 조사결과 초기배 발달속도가 빠를수록, 배반포기 배까지 발달하는 속도가 빠를수록 할구수가 많고 발달속도가 늦어질 수록 할구수가 감소하는 경향을 보였다.

이상의 실험결과에서 체외수정란의 안정적인 생산을 위하여 양호한 난포란을 선발하여 체외성숙 후 정소상체미부정자와 체외수정을 유도하여 난관

상피세포와의 공배양을 실시함으로써 후기배로의 배 발달율을 높일수 있다고 사료되며, 체외수정시 초기배 발달속도가 후기배로의 발달에 중요한 요인인 것으로 판단되며 아울러 초기에 질적인 평가와 후기배로의 발달율을 예상할 수 있다고 사료된다.

참고문헌

- Bavister BD, Rose-Hellekant TA and Pinyopummintr T. 1992. Development of *in vitro* matured /*in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media, Theriogenology 37:127-146.
- Betteridge KJ, Smith C, Stubbings RB, Xu RK and King WA. 1989. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes *in vitro*. J. Reprod. Fert. Suppl. 38:87-91.
- Eyestone WH and First NL. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium, J. Reprod. Fert. 85:715-720.
- Fukui Y and Ono H. 1989. Effects of sers, hormones and granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. J. Reprod. Fert. 86:501-506.
- Fukui Y, McGowan LT, James RW, Pugh PA and Tervit HR. 1991. Factors affecting the *in vitro* development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. J. Reprod. Fert. 92:125-131.
- Goto K, Kajihara Y, Koba M, Kosaka S, Nakanishi Y and K Ogawa. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes. J. Reprod. Fert. 83:753-758.
- Kajihara Y, Kometani N, Kobayashi S, Shitanaka S, Koshiba Y, Hishiyama K, Shiraiwa K and Goto K. 1990. Pregnancy

- rates and births after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes. *Theriogenology* 33:264(Abstract).
- Mochizuki H, Fukui Y and Ono H. 1991. Effect of the number of granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization and development of bovine oocytes. *Theriogenology* 36:973-987.
- Parrish, JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Crister ES, Eyestone WH and First ML, 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 25:591-600.
- Pinyopummitr T and Bavister BD. 1991. Development of bovine embryos derived from *in vitro* matured/fertilized oocytes into morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free culture medium. *Biol. Reprod.* 45:736-742.
- Plante L and King WA. 1992. Effect of time to first cleavage on hatching rate of bovine embryos *in vitro*. *Theriogenology* 37:274(Abstract).
- Pollard JW, Xu KP, Rorie R, King WA and Betteridge KJ. 1989. Influence of various oviductal epithelial cell culture system on the development of early cleavage stage embryos *in vitro*. *Theriogenology* 31:239(Abstract).
- Pollard JW, Scodras JM, Plante L, King WA and Betteridge KJ. 1991. Definition of the cleavage stages at which oviductal epithelial cells enable bovine embryos to pass through the *in vitro* 8-16 cell block. *Theriogenology* 35:256(Abstract).
- Pursel VG, et al. 1985. A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. *Theriogenology* 24:687-691.
- Rexroad CE. 1989. Co-culture of domestic animal embryos. *Theriogenology* 31:105-114.
- Van Soom A, Vlaenderen I, Mahmoudzadeh AR, Deluyker H and de Kruif A. 1992. Compaction rate of *in vitro* fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. *Theriogenology* 38:905-919.
- Vergos E, Kinis A, Gallagher M and Gordon A. 1989. Development of bovine embryos on an oviductal monolayer in relation to cell stage reached at 48 hours after *in vitro* fertilization. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 4:37 (Abstract).
- Wiemer KE, Watson AJ, Polanski V, McKenna AI, Fick GH and Schultz GA. 1991. Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 30:330-338.
- Younis AI and Brackett BG. 1990. *In vitro* development of bovine oocytes into morulae and blastocysts. *Theriogenology* 31:239(Abstract).