

## 한우 체외수정란의 체외배양, 동결보존 및 이식에 관한 연구

### Ⅲ. 한우 체외수정란의 이식

김일화 · 손동수 · 이호준 · 이동원 · 서국현 · 이광원 · 장인호\*

축산기술연구소

## Studies on *In Vitro* Culture, Freezing and Transfer of Korean Native Cattle Embryos Fertilized *In Vitro*

### Ⅲ. Transfer of Korean Native Cattle Embryos Fertilized *In Vitro*

I. H. Kim, D. S. Son, H. J. Lee, D. W. Lee, K. H. Seo,

K. W. Lee and I. H. Chang\*

National Livestock Research Institute

### SUMMARY

The present study was carried out to obtain the pregnancy and delivery rate following transfer of fresh and frozen-thawed Korean native cattle(KNC) blastocysts(1~4 embryos / head) produced *in vitro* to Holstein recipients.

The pregnancy rate of fresh and frozen-thawed KNC blastocysts produced *in vitro* was 50%(7/14 heads) and 38.5%(5/13 heads), respectively.

The pregnancy rate of frozen-thawed KNC blastocysts produced *in vitro* frozen using 1.5M ethylene glycol and 1.4M glycerol for cryoprotectant was 33.3%(2/6 heads) and 42.9%(3/7 heads), respectively.

Seven calves including 2 sets of twin were born from 5 pregnant recipients receiving eleven fresh blastocysts. Three pregnant recipients were aborted among four pregnant recipients receiving twelve frozen-thawed blastocysts and one calf was born from the rest of one pregnant recipient.

(Key words : transfer, KNC blastocysts , pregnancy, delivery)

### 서 론

가축에 있어서 체외수정 기술은 이식을 위한 충분한 수정란의 공급 뿐만 아니라 수정과정을 연구하거나 핵이식 또는 유전자이식과 같은 유전공학연구에 매우 유용하다(Aoyagi 등, 1990; Fukui와 Ono, 1988). 1981년 소의 난자를 체외수정 후 처음으로 송아지가 생산되었고(Brackett 등, 1982) 활

발한 연구가 계속되어 많은 연구자들이 송아지의 생산에 성공하였으며(Goto 등, 1988; Lu 등, 1987; Parrish 등, 1986; Sirard와 Lambert, 1986) 난구 세포, 난관상피세포 등의 체세포를 이용한 체외배양기법이 개발(Goto 등, 1988; Lu 등, 1988)됨에 따라 실험실내에서 수정란의 대량생산 및 체외수정란 이식의 산업화가 가능하게 되었다(Gordon과 Lu, 1990).

체외수정란이 야외에서 이용되기 위해서는 신선

\* 경북대학교 수의과대학(College of Veterinary Medicine, Kyungpuk National University)

수정란의 상태로 이식되거나 또는 수란우가 준비될 때까지 동결보존하였다가 이식되어져야 한다. 수정란의 동결보존을 위하여 지난 20년에 걸친 기초 및 응용 연구에서 포유동물 세포의 생존성에 대한 냉각 및 가온속도의 효과에 의해 개발된 완만동결법과 고농도의 동해방지제로 수정란을 평형, 탈수시켜 유리화시킴으로서 수정란의 냉각, 저장 및 가온 중 빙결정을 형성하지 않는 유리화 동결법이 최근에 이용되고 있는데, 완만동결법이 유리화 동결법에 비해 비용이 많이 소요되며 장시간이 걸리는 동결방법이나 아직까지 체내 생산 소 수정란의 대부분이 조절 완만동결법에 의해 동결보존되는데, 그것은 유리화 동결방법에서 요구되는 정확성이 불필요하기 때문이다(Mahmoudzadeh 등, 1994).

완만동결법에 이용되는 동해방지제로서 glycerol이 주로 사용되었으나(Rorie 등, 1990) 다단계회석법에 의한 번거로움 때문에 근래에는 1단계회석 또는 회석없이 직접 수정란이식이 가능한 ethylene glycol을 이용한 연구가 많이 이루어지고 있다(Suzuki 등, 1993; Voelkel과 Hu, 1992). Iwasaki와 Nakahara(1990)는 체외성숙 난자를 체외수정시킨 후 체외배양의 경우와 토끼의 난관에서 배양한 경우를 비교했을 때 체외배양된 수정란이 토끼의 난관에서 배양된 수정란에 비해 할구수가 반정도밖에 되지 않았으므로 체외수정란이 낮은 수태율을 보인 것은 세포수가 적은 것에 기인한다고 하였으며, Pollard와 Leibo(1994)는 소의 체외수정란은 체내수정란에 비해 냉각에 대해 민감하며 특히  $+10^{\circ}\text{C} \sim -5^{\circ}\text{C}$ 에서 극도로 민감하다고 하였는데 이러한 요인들이 체외수정란이식의 실용화에 불리한 점을 제공할 수 있다.

우리나라에서도 소의 체외수정란이식에 의한 산자가 소수 보고되었으나 현재까지는 산자생산의 성공에 거의 국한되었으며 체외수정란의 이식에 따른 수태 및 분만성적에 대한 보고는 드문 상태이다. 따라서 본 연구는 한우 체외수정 배반포를 신선 수정란 상태로 또는 동결-용해 후 농가의 수란우에 이식하여 수태 및 분만성적을 조사하되로서 한우 체외수정란의 실용화 촉진에 기여할 자료를 얻고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 난포란의 체외성숙 및 체외수정

도축 직후 한우의 난소를 항생제(penicillin G 100 units/ml, streptomycin 100 $\mu\text{g}$ /ml)가 첨가된 25 $^{\circ}\text{C}$ 의 0.9% 생리식염수에 침적하여 4시간 이내에 실험실로 운반하여 항생제가 첨가된 생리식염수로 난소를 3-4회 세척하고 면도칼로 난소의 표면을 세절하여 TCM 199 기본배양액(TCM 199 + gentamicin 50 $\mu\text{g}$ /ml)으로 씻어내어 상층액을 제거한 후 40배의 실체현미경(Olympus, Japan)하에서 난포란을 회수하였으며 2~3층 이상의 난구세포층을 가진 난자를 선별하여 5 $\mu\text{g}$ /ml FSH(Sigma), 10IU/ml hCG(Chorulon, Intervet, Holland), 1 $\mu\text{g}$ /ml estradiol - 17 $\beta$ (Sigma), 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco, U.S.A.) 및 50 $\mu\text{g}$ /ml gentamicin(동신제약, 한국)이 첨가된 TCM 199 성숙배양액에서 3~4회 세척 후 TCM 199 성숙배양액을 4-well dish(Nunc, Denmark)에 0.5ml씩 분주하고 선별된 난자를 각각 10~15개씩 넣었으며 이때 직경 10~20mm의 대난포로부터 회수하여 원심, 세척한 과일막세포를  $1 \times 10^6$  cells/ml의 농도로 첨가하여 39 $^{\circ}\text{C}$ , CO<sub>2</sub>배양기에서 약 24시간 동안 공배양을 실시하여 체외성숙을 유도하였다.

축협중앙회 개량사업본부 한우개량부에서 생산된 한우 동결정액을 38 $^{\circ}\text{C}$ 의 온수에서 30초간 용해시킨 후 10mM caffeine(Sigma)이 첨가된 정자 세척용 BO배양액과 혼합하여 회석한 다음 200 $\times\text{g}$ 으로 5분간 2회 원심세척 후 5mM caffeine, 10 $\mu\text{g}$ /ml heparin(Sigma) 및 0.5% bovine serum albumin(BSA, Sigma)이 첨가된 수정능획득용 BO배양액으로 재부유하였으며 최종적으로 정자농도가  $1 \times 10^6$  정자/ml가 되게 조정하여 성숙난자의 체외수정에 사용하였으며 수정능획득 정자를 함유한 200 $\mu\text{l}$ 의 소적을 60 $\times$ 15mm 조직배양접시(Nunc, Denmark)에 적하한 후 멸균 mineral oil(Sigma, USA)로 피복하고 성숙된 난자를 체외수정용 BO배양액으로 3~4회 세척한 후 정자 소적당 10~15개씩 옮겨 10시간 동안 CO<sub>2</sub>배양기에서 체외수정을 유도하였다.

## 2. 수정란의 체외배양

### 1) 난관상피세포의 준비

도축장에서 채취한 소의 난관을 5℃로 유지하여 실험실로 옮겨 멸균된 수술기구로 결합조직과 지방 조직을 철저히 제거하고 70% 알코올로 소독한 후 난관 전체를 가볍게 문지른 다음 난관 깔때기에서 난관-자궁연결부쪽으로 TCM 199 기본배양액 2ml를 관류시켜 난관상피세포를 회수한 후 200×g으로 5분간 2회 원심 분리하여 세척하고 TCM 199 성숙배양액으로 재부유하여 난관상피세포의 최종 농도가  $1 \times 10^6$  cells/ml가 되도록 조정한 후 4-well dish에 0.5ml씩 분주하여 CO<sub>2</sub> 배양기에서 72시간 배양시켜 단층세포의 형성을 유도하였다.

### 2) 체외배양

체외수정된 난자를 TCM 199 성숙배양액으로 3~4회 세척하여 난구세포와 정자를 제거하고 미리 준비한 난관상피 단층세포에서 9일간 CO<sub>2</sub> 배양기에서 공배양시켰으며 배양중에 48시간마다 배양액을 신선한 배양액으로 교환하였다.

### 3. 체외수정 배반포의 동결 및 융해

체외수정 및 난관상피세포에서 체외배양 후 배반포로 발육시킨 수정란을 배지에서 꺼내 FBS가 20%첨가된 D-PBS 보존액으로 옮겨 10분간 평형시킨 후 계속해서 1.8M ethylene glycol 동결배지 또는 1.4M glycerol 동결배지에서 20분간 평형시킨 후 0.25ml 스트로에 수정란을 1개씩 주입하여 -6℃로 냉각된 수정란 동결기(Cryogenic, Australia)의 cryo chamber에 넣고 2분 뒤 식빙(seeding)하였으며 식빙 8분 후 -30℃까지 -0.3℃/min 또는 -0.6℃/min 속도로 냉각시킨 뒤 액체질소에 침지하여 동결보존하였다. 동결수정란의 융해는 액체질소통에서 수정란이 들어있는 스트로를 꺼내어 실온의 공기중에서 5초간 융해 후 20℃의 온수에서 15초간 급속융해하였다. Ethylene glycol을 동해방지제로 이용하여 동결시킨 수정란은 융해직후 바로 D-PBS보존액에 침지하여 10분간 정체시킴으로써 ethylene glycol을 제거하였으며, glycerol 동결배

지를 이용하여 동결시킨 수정란은 융해직후 0.8, 0.4M glycerol 동결배지 및 D-PBS 보존액에서 각각 10분씩 정체시킴으로써 glycerol을 제거하였다.

### 4. 수란우의 준비

이식 수란우는 충남 천안시 소재 소규모 젖소 사육농가에서 사육중인 Holstein 미경산우를 사용하였으며 자연발정 후 6일째 직장검사를 실시하여 배란쪽 난소의 황체가 뚜렷하게 형성된 개체를 선발하였다.

### 5. 수정란이식

수란우 검사 다음날 신선 체외수정란 또는 동결-융해 체외수정란 1~4개를 비외과이식기(Cassau gun, IMV, France)에 장착하여 이식농가에 1시간 이내 옮겨 이식전 rompun(림푼, 바이엘, 한국) 0.4ml를 수란우의 꼬리정맥에 주사하여 진정시킨 후 2% lidocaine(리도카인, 제일제약, 한국) 6ml로 경막외마취를 하고 비외과이식기를 이용, 황체가 존재하는 자궁뿔 선단부에 수정란을 이식하였다.

### 6. 임신진단

체외수정란을 이식한 후 36~95일에 초음파진단 장치(Sonoace 88P, Medison, Korea) 및 직장검사를 통하여 임신여부를 확인하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 신선 또는 동결-융해 한우 체외수정 배반포 이식에 따른 수태성적

체외수정 후 난관상피세포에서 7~9일간 공배양으로 발육된 배반포를 신선수정란 상태로 혹은 완만동결법으로 동결 후 융해한 수정란을 농가의 Holstein 미경산우에 1~4개씩 비외과적으로 황체가 존재하는 쪽의 자궁뿔 선단부에 이식한 후 36~95일에 초음파 진단장치와 직장검사로 임신진단한 결과 신선수정란 1~4개씩을 14두의 수란우에 이식한 경우 7두가 수태되었으며(50.0%), 동결-융해 수정란 2~4개씩을 13두의 수란우에 이식한 경우에는 5두가 임신되었다(38.5%, Table 1). 신선 또는 동결-융해 수정란의 수란우당 이식 수에 따른 수태성적

Table 1. Transfer of fesh and frozen -thawed KNC blastocysts produced *in vitro* to Holstein heifers

Embryos	No. of embryos transferred	No. of recipients	No. of pregnant recipients	Pregnancy rate (%)
Fresh embryos	1	2	1	
	2	8	4	
	3	2	1	
	4	2	1	
	Subtotal	14	7	50.0
Frozen -thawed embryos	2	5	2	
	3	5	2	
	4	3	1	
	Subtotal	13	5	38.5
Total	27	12	44.4	

은 이식 두수가 적어서 수태율의 비교가 어려웠으나, 비슷한 성적을 나타내었다. 소 체외수정란의 이식 후 수태율은 13~60%로 연구자에 따라 매우 다양하게 보고되었다(Agea 등, 1994; Wurth 등, 1994; Kuwayama 등, 1992; Jiang 등, 1991; Fukuda 등, 1990; Lu 등, 1990; Takada 등, 1990; Goto 등, 1988). Goto 등(1988)은 신선 체외수정 배반포를 2~5개씩 수란우에 이식하여 50.0%의 수태율을 보였고, 동결-융해 배반포를 2~3개씩 수란우에 이식한 결과 45.5%의 수태율을 보였다고 보고하여 본 연구의 결과와 비슷하였다. Agea 등(1994)은 신선 체외수정 배반포와 동결 체외수정 배반포를 수란우에 이식한 결과 각각 63%의 동일한 수태율을 보고하였으며 Wurth 등(1994)은 신선 체외수정란(42%)이 동결-융해 체외 수정란(14%)에 비하여 상당히 높은 수태성적을 보였다고 하였다. 본 연구의 신선 수정란의 수태율은 Fukuda 등(1990), Takada 등(1990) 및 Lu 등(1990)의 수태율 50%와 동일 하였으며 Prokofiev 등(1992)의 12.9%에 비해서는 높았다. 또 동결-융해 수정란의 수태율은 Kuwayama 등(1992)의 60%, Ishimori 등(1992)의 50%에 비하여 낮았으나 Jiang 등(1991)의 16.7% 보다는 높았다. 본 연구에서 체외수정란 이식에 의한 수태율이 평균 44.4%로 체내수정란의 수태성적(Leibo, 1986; Niemann 등, 1985)과 비슷하게 나타나 한우 체외수정란을 이용한 수정란이식도 농가에 실용화될 수 있다는 가능성을 보여주었다고 생각된다.

## 2. 동해방지제의 종류에 따른 배반포의 동결-융해 후 이식시 수태성적

한우 체외수정 배반포를 동해방지제로 1.8M ethylene glycol 또는 1.4M glycerol을 이용하여 평형하고 완만동결 속도로 동결 후 융해하여 수란우에 이식한 결과의 수태성적은 1.8M ethylene glycol로 평형시킨 수정란은 6두중 2두가 임신 되었고(33.3%) 1.4M glycerol로 평형시킨 수정란은 7두중 3두가 임신되었다(42.9%). 종전까지 상업화에 이용된 소 수정란의 동해방지제로는 glycerol이 주로 사용되어 3단계 융해절차에 따라 시간이 소요되는 단점이 있었으나 최근에는 glycerol에 비해 분자량이 적어 1단계로 희석이 가능한 여러가지 glycols을 이용한 연구들이 많이 이루어지고 있다(McIntosh와 Hazeleger, 1994; Suzuki 등, 1990). Voelkel과 Hu(1992)는 1.5M ethylene glycol과 1.4M glycerol을 동해방지제로 이용하여 동결-융해 후 수란우에 이식한 결과 모두 50%의 수태율을 보여 ethylene glycol이 소 수정란의 동결에 보다 간편한 방법으로 이용될 수 있음을 보여주었는데, 본 연구에서는 이식두수가 적어 수태성적의 비교가 어려웠으나 큰 차이가 없는 것으로 나타나 계속적으로 ethylene glycol을 이용한 간편 융해, 이식법에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 3. 임신 수란우의 분만성적

Table 1의 임신 수란우 12두 중 현재까지 임신중

Table 2. Pregnancy rate of frozen-thawed KNC blastocysts produced *in vitro* frozen using 1.8M ethylene glycol and 1.4M glycerol for cryoprotectant

Cryoprotectant	No. of recipients	No. of pregnant recipients	Pregnancy rate(%)
Ethylene glycol	6	2	33.3
Glycerol	7	3	42.9

인 3두를 제외한 9두의 분만성적은 Table 3에서 보는 바와 같다. 신선수정란 11개가 이식된 5두의 임신우에서는 쌍태 2두, 단태 3두로 모두 7두의 송아지가 분만되었으며, 동결수정란 12개가 이식된 4두의 임신우에서는 3두(이식후 36~45일 2두, 6개월 1두)가 유산되었으며 나머지 1두의 임신우에서 단태 송아지가 분만되었다(Fig. 1, Fig. 2). 본 연구에서 신선수정란이 이식된 임신우에서는 유산이 없었으나 동결수정란이 이식된 임신우에서는 4두중 3두가 유산되었는데 그 중 2두는 임신 36~45일 초음파 임

Table 3. Calving result following transfer of fresh and frozen-thawed KNC blastocysts produced *in vitro*

Embryos	No. of pregnant recipients	No. of embryos transferred	No. of aborted recipients	No. of delivered recipients	No. of calves		
					Single	Twin	Total
Fresh embryos	5	11	0	5	3	2	7
Frozen-thawed embryos	4	12	3	1	1	0	1
Total	9	23	3	6	4	2	8



Fig. 1. Korean native twin calves born following transfer of fresh KNC blastocysts produced *in vitro* to a Holstein recipient.



Fig. 2. Korean native calf born following transfer of frozen-thawed KNC blastocysts produced *in vitro* to a Holstein recipient.

신진단직후 유산이 발생되었다. Wurth 등(1994)은 임신 32~53일 사이 초음파임신진단에 의한 임신우 87두중 11두(12.6%)가 53~96일에 직장검사시 임신되지 않았음이 밝혀져 초음파에 의한 임신진단시 주의를 요한다고 하였는데 본 연구에서의 임신초기 중의 2두의 유산에 대한 정확한 원인은 밝혀지지 않았지만 초음파진단시의 물리적인 자극이 영향을 주었을 것으로 추측된다. 또 Hasler 등(1995)은 체외 수정에 대한 연구의 초기에는 유산율이 24%였으며 대부분이 100일 이내에 발생되고 있어 체외수정란의 이식 결과 초래되는 높은 유산율을 감소시키기 위해서 지속적인 연구가 필요하다고 하였다.

## 적 요

한우 미성숙 난포란을 체외성숙, 수정 및 배양하여 발육된 신선 배반포 또는 동결-융해 배반포를 농가의 Holstein 미경산우에 1~4개씩 이식하여 얻은 결과는 다음과 같다.

신선 수정란을 이식한 수란우는 14두중 7두가 수태(50.0%)되었으며 동결-융해 수정란을 이식시에는 13두중 5두가 수태(38.5%)되었다.

배반포의 동결시 동해방지제로 1.8M ethylene glycol 또는 1.4M glycerol을 이용하여 평형 후 완만동결 속도로 동결-융해하여 수란우에 이식한 수태성적은 1.8M ethylene glycol로 평형시킨 수정란은 6두중 2두가 임신 되었으며(33.3%) 1.4M glycerol로 평형시킨 수정란은 7두중 3두가 임신되었다(42.9%).

신선수정란 11개가 이식된 5두의 임신우에서는 쌍태 2두, 단태 3두로 모두 7두의 송아지가 분만되었으며, 동결수정란 12개가 이식된 4두의 임신우에서는 3두가 유산되었고 나머지 1두의 임신우에서 단태 송아지가 분만되었다.

## 참고문헌

- Agea Y, Monson RL, Northey DL, Mazni OA and Rutledge JJ. 1994. Post-thaw survival and pregnancy rates of *in vitro* produced bovine embryos after vitrification. *Theriogenology*, 41:154.
- Aoyagi Y, Fukui Y, Iwazumi Y, Urakawa M and Ono H. 1990. Effects of culture systems on

- development of *in vitro* fertilized bovine ova into blastocysts. *Theriogenology*, 34:749-759.
- Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF and Dressel MA. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol. Reprod.*, 27:147-158.
- Fukuda Y, Ichikawa M, Naito K and Toyoda Y. 1990. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells *in vitro* up to the blastocyst stage. *Biol. Reprod.*, 42:114-119.
- Fukui Y and Ono H. 1988. In vitro development to blastocyst of *in vitro* matured and fertilised bovine oocytes. *Vec. Rec.*, 122:282.
- Gordon I and Lu KH. 1990. Production of embryos *in vitro* and its impact on livestock production. *Theriogenology*, 33:77-87.
- Goto K, Kajihara Y, Kosaka S, Koba M, Nakanishi Y and Ogawa K. 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.
- Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, Mower SA, Neely B, Shuey LS, Stokes JE and Trimmer SA. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, 43:141-152.
- Ishimori H, Miki Y, Kishi M and Saeki K. 1992. Vitrification of bovine embryos. *Theriogenology*, 37:228.
- Iwasaki S and Nakahara T. 1990. Cell number and incidence of chromosomal anomalies in bovine blastocysts fertilized *in vitro* followed by culture *in vitro* or in vivo in rabbit oviducts. *Theriogenology*, 33:669-675.
- Jiang JY, Zhong S and Fan BQ. 1991. Calf born after the transfer of frozen-thawed embryos from follicular oocytes matured, fertilized and developed *in vitro*. *Theriogenology*, 35:217.
- Kuwayama M, Hamano S and Nagai T. 1992. Vitrification of bovine blastocysts obtained by *in vitro* culture of oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 96:187-193.
- Leibo SP. 1986. Commercial production of pregnancies from one-step diluted frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 25:166.
- Lu KH, Gordon I, Gallagher M and McGovern H. 1987. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in-vitro* fertilization of oocytes matured *in-vitro*. *Vet. Rec.*, 121:259-260.
- Lu KH, Gordon I, Chen HB, Gallagher M and McGovern H. 1988. Birth of twins after transfer of cattle embryos produced by *in vitro* techniques. *Vet. Rec.*, 122:539-540.
- Lu KH, Jiang HS, Wang WL and Gordon I. 1990. Pregnancies established in cattle by transfer of fresh and frozen embryos derived from *in vitro* maturation and fertilization of oocytes and their subsequent culture *in vitro*. *Theriogenology*, 33:278.
- Mahmoudzadeh AR, Soom A, Ysebaert MT and Kruif A. 1994. Comparison of two-step vitrification versus controlled freezing on survival of *in vitro* produced cattle embryos. *Theriogenology*, 42:1389-1397.
- McIntosh A and Hazeleger NL. 1994. The use of ethylene glycol for freezing bovine embryos. *Theriogenology*, 41:253.
- Niemann H, Sacher B and Elsaesser F. 1985. Pregnancy rates relative to recipient plasma progesterone levels on the day of non surgical transfer of frozen/thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 23:631-639.
- Parrish JJ, Susuko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Crister ES, Eyestone WH and First NL. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with

- frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 25: 591-600.
- Pollard JW and Leibo SP. 1994. Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology*, 41:101-106.
- Prokofiev MI, Ernst LK, Suraeva NM, Lagutina IS, Udavlennikova NN, Kesyan AZ and Dolgohatskiy AI. 1992. Bovine oocytes maturation, fertilization and further development *in vitro* and after transfer into recipients. *Theriogenology*, 38:461-469.
- Rorie RW, Xu KP and Betteridge KJ. 1990. Effect of culture on the post-thaw viability of cryopreserved, *in vitro* fertilized bovine embryos. *Theriogenology*, 33:311.
- Sirard MA and Lambert RD. 1986. Birth of calves after *in vitro* fertilisation using laparoscopy and rabbit oviduct incubation of zygotes. *Vet. Rec.*, 119:167-169.
- Suzuki T, Yamamoto M, Ooe M, Sakata A, Matsuoka M, Nishikata Y and Okamoto K. 1990. Effect of sucrose concentration used for one-step dilution upon *in vitro* and *in vivo* survival of bovine embryos refrigerated in glycerol and 1,2-propanediol. *Theriogenology*, 34:1051-1057.
- Suzuki T, Takagi M, Yamamoto M, Boediono A, Saha S, Sakakibara H and Oe M. 1993. Pregnancy rate and survival in culture of *in vitro* fertilized bovine embryos frozen in various cryoprotectants and thawed using a one-step system. *Theriogenology*, 40:651-659.
- Takada N, Ohisa N, Numabe T and Ishikawa Y. 1990. Conception rate after transfer of Japanese Black cattle embryos produced *in vitro*. *Vec. Rec.*, 126:581-582.
- Voelkel SA and Hu YX. 1992. Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females. *Theriogenology*, 37 :687-697.
- Wurth YA, Reinders JMC, Rall WF and Kruijff AM. 1994. Developmental potential of *in vitro* produced bovine embryos following cryopreservation and single-embryo transfer. *Theriogenology*, 42:1275-1284.