

한국 재래산양에서의 과배란유기와 외래유전자 주입에 적합한 수정란의 회수에 관한 연구

윤우식 · 이철상 · Igor Goldman* · 방남수** · 구덕본 · 한용만 ·
신상태*** · 유옥준**** · 박창식***** · 이경광
한국과학기술연구원 부설 생명공학연구소

Studies on the Superovulation and Collection of Microinjectable Embryos in Korean Native Goats (*Capra hircus aegagrus*)

Youn, W. S. , C. S. Lee, I. Goldman*, N. Z. Fang**, D. B. Koo, Y. M. Han,
S. T. Shin***, O. J. Yoo****, C. S. Park***** and K. K. Lee
Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST

SUMMARY

This study was carried out to determine the hormone treatment scheme for an efficient superovulation and optimal recovery time for obtaining pronuclear embryos suitable for DNA injectin in Korean native goats.

For a superovulation, FSH(5.6mg) was given over four days in twice daily injections with (FSH/hCG group) or without(FSH group) hCG(100 IU) co-injection at the time of 7th FSH injection. Estrus cycle was synchronized by norgestomet ear-implantation for 11 days and its removal at the time of 6th FSH injection. Among the treated goats, the percentage of ovulated goats, which were examined at 70 to 76 h following implant removal, was greater in FSH/hCG group than in FSH group (100% vs 36.4%) but there was no significant difference in the mean numbers of ovulation points and fertilization rates between the two groups.

To optimize hCG treatment scheme and recovery time, we injected hCG at the time of 7th (FSH/hCGa) or 8th(FSH/hCGb) FSH injection and then examined the developmental stage of the embryos recovered at different times after implant removal. In FSH/hCGa group, significant portions(31 to 44%) were beyond 1-cell stage, which was non-injectable, irrespective of their recovery time. However, in FSH/hCGb group recovered at 70 to 76 h after implant removal, great portions(69%) were fertilized and most of them(96.6%) were injectable 1-cell stage.

본 연구는 1996년도 과학기술처 선도기술개발과제 및 농림수산부 농림기술개발사업의 일환으로 수행되었습.

- * 러시아 축산연구소(All-Russian Research Institute of Animal Husbandry, Dubrovitsy, Moscow Region, Russia)
- ** 연변대학농학원 축산학부(Department of Animal Science, Yanbian University, China)
- *** 충남대학교 수의과대학(College of Veterinary Medicine, Chungnam National University)
- **** 한국과학기술원 생물과학과 생의학연구소(Department of Biological Sciences, BioMedical Research Center, KAIST)
- ***** 충남대학교 농과대학(College of Agriculture, Chungnam National University)

Considering together the fertilization rate and developmental stage of recovered embryos, it is recommendable to administrate hCG at the time of final 8th FSH injection and collect the embryos at 70 to 76 h after implant removal to obtain injectable embryos as many as possible in Korean native goats.

(Key words : Korean Native Goats, Superovulation, Micromanipulation, Embryos)

I. 서 론

형질전환 산양은 주로 외래유전자를 수정란의 핵내에 직접 주입하는 방법에 의해 생산되고 있다(Selgrath 등, 1990; Ebert 등, 1994). 따라서 외래유전자 주입에 적합한 전핵기 수정란을 다수 확보하는 것은 형질전환 산양 생산을 위한 필수적인 선결과제이다. 산양에서 다수의 수정란을 효과적으로 얻기 위해서는 발정동기화와 과배란유기가 이루어져야 한다. 발정을 동기화시키는 방법은 합성 progesterone이 함유되어 있는 ear-implant를 산양 귀의 피하에 삽입하는 방법(Pendelton 등, 1986; Ruttle 등, 1988; Selgrath 등, 1990; Akinlosotu 등, 1993; Krisher 등, 1994)을 이용하고 있으며, 과배란을 위해서는 pregnant mare's serum gonadotrophin(PMSG) 500~1,500IU를 1-2회 주사하는 방법(Alifaktotis 등, 1982; Ritar 등, 1984; Cameron 등, 1988; Selgrath 등, 1990), 또는 follicle stimulating hormone(FSH) 15~24mg을 3~4일간에 걸쳐 투여하는 방법(Selgrath 등, 1990; Rexroad 등, 1992; Krisher 등, 1994)등이 주로 이용되고 있다. PMSG 또는 FSH의 투여에 의한 산양의 과배란유기에 있어서 Armstrong 등(1986), Selgrath 등(1990), Mahmood 등(1991)과 박 등(1991)은 FSH가 PMSG보다 효과적으로 작용한다고 보고하였다. PMSG 또는 FSH와 더불어 과배란의 효과를 높이기 위하여 성선자극호르몬인 gonadotropin releasing hormone(GnRH; Krisher 등, 1994, Akinlosotu 등, 1993) 및 human chorionic gonadotropin(hCG; Laurincik 등, 1994; Majumdar 등, 1997)을 병용투여하기도 한다. Krisher 등(1994)은 산양에서 FSH와 함께 GnRH를 병용투여하므로써 FSH 단독처리구(60%)에 비해 높은 배란유기율(100%)을 얻을 수 있었으며, Akinlosotu 등(1993)도 LHRH를 병용투여하여 공시산양 모두를

배란시켰다고 보고하였다. 그러나 한국 재래산양에서는 Lee 등(1997)이 FSH를 이용하여 약 75%의 배란유기율을 얻어 낸 보고가 있을 뿐, 타 성선자극호르몬과의 병용투여 효과를 조사한 연구는 전무한 실정이다.

다수의 수정란을 확보하는 것과 더불어 형질전환 산양 생산에 있어서 더욱 중요한 요소는 전핵기 즉, 외래유전자 주입에 적합한 시기의 수정란을 회수하는 것이다. 전핵기 수정란을 회수하기 위하여 Selgrath 등(1990)은 Alpine종에서 ear-implant 제거후 72~79시간째에, Krisher 등(1994)은 Nubian종에서 ear-implant 제거후 68.5시간째에 다수의 1세포기 수정란을 얻을 수 있었다고 보고하였다.

따라서 본 연구는 progesterone 계열의 ear-implant로 발정기를 동기화 시킨 한국 재래산양에서 FSH와 hCG의 병용투여에 의한 효과적인 과배란유기법을 확립하고, 다수의 전핵기 수정란을 회수할 수 있는 채란시기를 결정하기 위하여 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

본 연구에서는 충남대학교 수의과대학 산양사육장에서 사육된 평균 12개월령(평균체중 20kg)의 한국 재래산양을 실험에 공시하였다.

2. 발정동기화

발정동기화를 위하여 norgestomet 3.0mg과 estradiol 5.0mg이 함유되어 있는 sesame oil 2ml를 근육에 주사하고, norgestomet 6mg이 함유되어 있는 ear-implant(Syncromate-B, Sanofi Animal Health, USA)를 산양 귀의 피하에 injector를 이용하여 주입하였다가 11일 후에 제거하였다.

3. 과배란유기

과배란유기를 위하여 본 연구에서는 PMSG(Pregnecol, Horizon Technology, Australia) 150 IU 1회, FSH(Ovagen, Immuno-Chemical Products, New Zealand) 5.6mg을 ear-implant를 제거하기 60시간 전부터 12시간 간격으로 4일간 0.7mg씩 8회 투여한 군과, 동일한 처리조건에서 ear-implant 제거후 12시간째 hCG(Chorionic Gonadotropin, Sigma, USA) 100 IU를 7회째의 FSH와 병용투여한 군과, ear-implant 제거후 24시간째 hCG 100 IU를 8회째의 FSH와 병용투여한 군으로 나누어 실시하였다.

4. 자연 교배

자연 교배는 ear-implant 제거후 24시간째부터 공란산양 1마리당 번식능력이 확인된 수컷과 4시간 간격으로 4회 이상 실시하였다.

5. 수정란의 회수

수정란은 ear-implant 제거후 62~84시간 사이에 외과적으로 회수하였다. 24시간 절식시킨 공란산양에 먼저 2% Xylazine(Rompun, Bayer, Korea)을 체중 10kg당 0.03ml 수준으로 근육주사 한 후 앙천자세로 보정하였다. 2% lidocaine(Lidocaine, Kwang Myung, Korea) 10ml를 보정된 산양의 복정중선에 주사하여 국부마취를 유도하였다. 복정중선을 4~6cm 절개하여 난소, 난관 및 자궁을 체외로 들어낸 후 관류관을 난관누두부 안쪽으로 삽입하여 고정하고, 10% FBS가 첨가된 Dulbecco's phosphate buffered saline(dPBS)을 자궁에서 난관으로 역관류하여 수정란을 회수하였다. 1-세포기 수정란의 수정 여부는 회수된 난자를 12,000 rpm에서 7분간 원심분리를 실시하여 전핵을 관찰하거나, 채관후 24시간 동안 modified synthetic oviduct fluid(m-SOF; Takahashi와 First, 1992) 배양액에서 배양한 후 분할구를 관찰

하므로써 확인하였다.

6. 통계처리

본 연구에서 나타난 결과들은 χ^2 검정을 통해 $P < 0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

III. 결 과

1. hCG 병용투여의 효과

hCG 병용투여가 재래산양에서의 과배란 유기에 미치는 영향을 알아보기 위해 ear-implant 제거후 70~76시간에 배란 유기를, 배란점의 수 및 회수율에 대해서 조사하였다(Table 1). FSH 단독처리군과 ear-implant 제거후 12시간째 hCG 100 IU를 병용투여한 처리군에서 배란이 유기된 산양의 비율은 각각 36.4% 및 100%를 나타내므로써, hCG 병용처리군이 유의하게 높은 배란 유기율을 보였다. 배란점의 수와 회수율에 있어서는 FSH 단독처리군은 개체당 평균 7.9개의 배란점과 55.1%의 회수율을, hCG를 병용투여한 처리군은 개체당 평균 9.7개의 배란점과 85.1%의 회수율을 나타냈다. 배란점의 수에 있어서는 hCG를 병용투여한 처리군이 다소 높았으나 유의차는 나타나지 않았다. 회수율에 있어서는 hCG 병용처리군이 높은 회수율을 나타냈다.

수정란을 생산한 재래산양에서의 hCG 병용투여가 수정율에 미치는 영향에 관해서 조사한 결과는 Table 2와 같다. 수정란을 생산한 재래산양에서 회수된 난자의 수정율은 FSH 단독처리군, hCG를 병용투여한 처리군에서 각각 66.0% 및 64.2%를 나타내므로써 유의한 차는 없었다.

회수된 수정란의 발달단계를 조사하므로써 hCG가 배란시간에 미치는 영향을 조사하였다(Table 3). 이들 수정란의 발달단계를 살펴보면 FSH 단독처리군에

Table 1. Effects of two different gonadotropin treatments on superovulation

Treatment	No. of goats	No. (%) of goats ovulated	No. of ovulation point (means)	No. of ovum collected (means)	Collection rates (%)
FSH	44	16 (36.4) ^a	127(7.9)	70(4.4)	55.1
FSH/hCG	18	18(100.0) ^b	174(9.7)	148(8.2)	85.1

^{a,b}Different superscripts within columns denote significant differences ($P < 0.05$).

FSH/hCG; hCG(100 IU) was single injected 12 h after ear-implant removal.

Table 2. Effects of two different gonadotropin treatments on fertilization

Treatment	No. of goats fertilized	No. of ovum collected	No. (%) of embryos fertilized
FSH	9	47	31(66.0)
FSH/hCG	15	133	95(64.2)

FSH/hCG: hCG(100 IU) was single injected 12 h after ear-implant removal.

Table 3. Developmental stages of fertilized eggs recovered from superovulated goats

Treatment	No. of eggs fertilized	Embryo stages(%)			
		1-cell	2-cell	4-cell	≥8-cell
FSH	31	31(100.0)	—	—	—
FSH/hCG	95	59(62.1)	31(32.6)	5(5.3)	—

FSH/hCG: hCG (100 IU) was single injected 12 h after ear-implant removal.

서는 모두가 1세포기 수정란이었으나, hCG를 병용투여한 처리구에서는 1세포기 수정란이 62.1%, 2세포기 수정란이 32.6%, 4세포기 수정란이 5.3%로 나타났다.

2. 수정란의 회수시간에 따른 배발달 상황

재조합 유전자의 미세주입에 적합한 전핵기 수정란을 효과적으로 회수할 수 있는 최적시기를 결정하기 위하여 hCG 병용처리시기를 달리하면서 수정란의 회수시간별로 수정란의 발달단계를 조사한 결과는 Table 4와 같다. Ear-implant 제거후 12시간째 hCG 100 IU를 병용투여한 처리구에서는 ear-implant 제거후 62~68시간째 회수하였을 때 1세포기 수정란의 비율이 69.0%, 2세포기 수정란의 비율이 31.0%였으며, 70~76시간째는 1, 2, 및 4세포기 수정란이 각각

62.1, 32.6 및 5.3%로서, 2세포기 이상의 수정란이 37.9%를 나타냈으며, 78~84시간째는 1세포기 및 2세포기 수정란이 각각 55.6 및 44.4%를 나타냈다. 수정율은 ear-implant 제거후 62~68시간째 59.2%, 70~76시간째 64.2%, 78~84시간째 50.0%를 나타냈다.

Ear-implant 제거후 24시간째 hCG 100 IU를 병용투여한 처리구에서는 ear-implant 제거후 62~68시간째 회수하였을 때 1세포기 수정란의 비율이 100%였다. 70~76시간째는 1세포기 및 2세포기 수정란이 각각 96.6 및 3.4%를 나타냈으며, 78~84시간째는 1, 2 및 4세포기 수정란이 각각 57.1, 28.6 및 14.3%로 2세포기 이상의 수정란이 42.9%로 높게 나타났다. 수정율은 ear-implant 제거후 62~68시간째 30.0%, 70~76시간째 69.0%, 78~84시간째 82.4%로 증가하였

Table 4. Embryo stages recovered at different time after ear-implant removal from hCG-treated goats

FSH / hCG	Hours post ear-implant removal	No. of eggs collected	No. (%) of eggs fertilized	Embryo stages(%)		
				1-cell	2-cell	4-cell
12 h	62~68	49	29(59.2)	20(69.0)	9(31.0)	—
	70~76	148	95(64.2)	59(62.1)	31(32.6)	5(5.3)
	78~84	36	18(50.0)	10(55.6)	8(44.4)	—
24 h	62~68	10	3(30.0)	3(100.0)	—	—
	70~76	84	58(69.0)	56(96.6)	2(3.4)	—
	78~84	17	14(82.4)	8(57.1)	4(28.6)	2(14.3)

12 h: hCG (100 IU) was single injected 12 h after ear-implant removal.

24 h: hCG (100 IU) was single injected 24 h after ear-implant removal.

다. 1세포기 수정란의 회수율은 각 시간대에서 100%, 96.6% 및 57.1%로 감소하는 반면 수정율은 30%, 68%, 및 82%로 증가하였다. 따라서 적정 수정율을 유지하면서 다수의 1세포기 수정란을 얻기 위해서는 ear-implant 제거후 24시간째 hCG 100 IU를 병용투여한 후 70~76시간째 채란하는 것이 효과적임을 알 수 있었다.

IV. 고 찰

한국 재래산양에서 과배란을 유기함에 있어서 FSH 단독처리구와 hCG 병용처리구를 비교한 결과, 배란이 유기된 산양의 수에 있어서는 각각 36.4%와 100%로 hCG 병용처리구가 유의하게 높게 나타났으며, 배란점의 수와 수정율에 있어서는 두 처리구간에 유의한 차는 나타나지 않았다. 따라서 hCG 병용처리는 배란점의 수와 수정율에는 영향을 미치지 않는 반면, 배란을 유기시키는데 있어서는 효과적으로 작용한다고 할 수 있다. Majumdar 등(1997)이 FSH(Superov, 20 units)와 hCG 500 IU를 사용하여 공시산양 8두에서 6두(75.0%)가 배란이 유기되었으며, 개체당 평균 7.2개의 배란점을 얻어냈다고 보고한 결과와 비교해 볼 때, ear-implant 제거후 12시간째 hCG 100 IU를 병용투여한 처리구에서의 배란유기율 100%와 개체당 평균 배란점 9.7개는 다소 높은 결과였다. 또한, Lee 등(1997)이 한국재래산양에서 FSH-p 20mg을 4일간 점감투여하여 얻어낸 배란 유기율 75%(25/33)와 개체당 평균 배란점 10.08개와 비교할 때, 배란유기율에 있어서는 높은 결과를 나타냈으며, 배란점의 수에 있어서는 비슷한 결과였다. 따라서 hCG의 병용투여는 한국산 재래산양에서 배란을 유기시키는데 있어서 효과적으로 작용한다고 할 수 있다.

과배란 유기후 수정란의 발달단계를 조사한 결과, ear-implant 제거후 70~76시간에 회수된 수정란의 발달단계는 FSH 단독처리구에서는 모두 1세포기 수정란이었으나, ear-implant 제거후 12시간째 hCG 100 IU를 병용투여한 처리구에서는 2세포기 이상의 수정란이 37.9%였다. 따라서 hCG의 병용투여는 FSH 단독처리구에 비해서 배란시기를 앞당기는 것으로 판단된다.

hCG 병용처리구에서 전핵기 수정란을 회수할 수

있는 최적시기를 알아보기 위해서 hCG 병용처리시기를 달리하면서 ear-implant 제거후 채란하기까지의 시간에 따른 수정란의 발달단계를 조사하였다. 그 결과 ear-implant 제거후 12시간째 hCG 100 IU를 병용투여한 처리구에서는 ear-implant 제거후 회수시간대별로 1세포기 수정란의 비율이 각각 69.0%, 62.1% 및 55.6%로 낮아졌다. 그리고 수정율은 각각 59.2%, 64.2%, 및 50.0%를 나타냄으로써 수정율에서는 큰 변화를 보이지 않았다. Ear-implant 제거후 12시간째 hCG 100 IU를 투여하면 1세포기의 수정란을 다수 얻기가 어려울 뿐만 아니라, 수정란의 회수시기를 늦추어도 수정율이 높아지지 않는 것을 볼 때 수정능력이 없는 난자가 다수 배란된 것으로 생각된다. Ear-implant 제거후 24시간째 hCG 100 IU를 병용투여한 처리구에서는 ear-implant 제거후 회수시간대별로 1세포기 수정란의 비율이 100%, 96.6%, 그리고 57.1%였으며, 수정율은 각각 30.0%, 69.0% 및 82.4%였다. 1세포기 수정란의 비율이 100%인 시기는 ear-implant 제거후 24시간째 hCG 100 IU를 병용투여한 처리구에서 ear-implant 제거후 62~68시간째였으나, 이때의 수정율은 30%로 저조하였다. 이에 반하여 70~76시간째는 1세포기 수정란의 비율이 96.6%, 수정율이 69.0%로 높게 나타났다. 이러한 결과는 Selgrath 등(1990)이 Alpine dairy goat에서 ear-implant 제거후 72~79시간에 100%의 1세포기 수정란을 회수한 결과와 비슷하였으며, 약 52.7%의 수정율 보다는 높은 수정율을 나타냈다. 그리고 Krisher 등(1994)이 Nubian dairy goat에서 ear-implant 제거후 68.5시간에 1세포기 수정란을 얻어낸 결과와도 유사하였다.

따라서 한국 재래산양에서 PMSG, FSH와 hCG를 이용하여 외래유전자 미세주입에 적합한 1세포기 수정란을 다수 확보하기 위해서는 ear-implant 제거후 24시간째 hCG 100 IU를 병용투여하고 ear-implant 제거후 70~76시간째에 수정란을 회수하는 것이 효과적이라고 판단된다.

V. 적 요

한국 재래산양에서 과배란을 유기함에 있어서 FSH와 hCG의 병용투여 및 그 병용투여의 시기가 과배란

유기율, 수정율 및 배발달 단계에 미치는 영향에 대하여 조사하였다.

Ear-implant 제거후 70~76시간에 수정란을 회수하였을 때 FSH 단독처리구와 hCG 병용처리구에서 개체당 평균 배란점의 수와 회수된 난자의 수정율에서는 hCG의 처리유무에 관계없이 유의한 차이가 없었으나 배란유기율은 FSH 단독처리구(36.4%)에 비해 hCG 병용처리구가 높은 성적(100%)을 보임으로써 FSH를 hCG와 병용투여하는 것이 산양에서의 과배란 유기에 효과적임을 알 수 있었다. hCG를 7회 또는 8회째 FSH와 병용투여한 후 채란시기를 달리하면서 채란된 수정란의 발달단계를 조사하였을 때, 채란시기가 늦어짐에 따라 2세포기 이상의 수정란 빈도가 높아졌다. 따라서 수정율과 1세포기 수정란의 비율을 고려할 때 외래유전자 주입에 적합한 다수의 1세포기 수정란을 얻을 수 있는 과배란 처리방법 및 채란시기는 hCG를 8회째의 FSH와 병용투여하고 ear-implant 제거후 72~76시간째에 채란하는 것이 가장 효과적임을 알 수 있었다(수정율 70%, 1세포기 수정란 회수율 96.9%).

VI. 인용문헌

1. Akinlosotu, B. A. and C. D. Wilder. 1993. Fertility and blood progesterone levels following LHRH-induced superovulation in FSH-treated anestrus goats. *Theriogenology*, 40: 895-904.
2. Alifaktiotis, T., I. Michailidis and G. Gravriliadis. 1982. Induced breeding in anestrus milking ewe of dairy breeds comparison of norgestomet, medroxyprogesterone and fluorogestone in two regimen of PMSG. *Theriogenology*, 17: 603-610.
3. Cameron, A. W. N., K. M. Battye and A. O. Trounson. 1988. Time of ovulation in goats (*Capra hircus*) induced to superovulate with PMSG. *J. Reprod. Fertil.*, 83: 747-752.
4. Ebert, K. M., J. P. Selgrath, P. DiTullio, J. Denman, T. E. Smith, M. A. Memon, J. E. Schindler, G. M. Monastersky, J. A. Vitale and K. Gordon. 1991. Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: Generation of transgenic goats and analysis of expression. *Bio/Technology*, 9: 835-838.
5. Ebert, K. M., P. DiTullio, C. A. Barry, J. E. Schindler, S. L. Ayres, T. E. Smith, L. J. Pellerin, H. M. Meade, J. Denman and B. Roberts. 1994. Induction of human tissue plasminogen activator in the mammary gland of transgenic goats. *Bio/Technology*, 12: 699-702.
6. Krisher, R. L., G. C. Gwazdauskas, R. L. Page, C. G. Russell, R. S. Canseco, A. E. T. Sparks, W. H. Velandar, J. L. Johnson and R. E. Pearson. 1994. Ovulation rate, zygote recovery and follicular populations in FSH-superovulated goats treated with PGF_{2α} and/or GnRH. *Theriogenology*, 41: 491-498.
7. Laurincik, J., P. Hyttel, D. Rath and J. Pivko. 1994. Ovulation, fertilization and pronucleus development in superovulated gilts. *Theriogenology*, 41: 447-452.
8. Lee, W. K., Y. M. Han, S. T. Shin, D. H. Lee, O. J. Yoo and K. K. Lee. 1997. *In vitro* development of DNA-injected embryos cocultured with goat oviduct epithelial cells in Korean Native Goats (*Capra hircus aegagrus*). *Theriogenology*, 47: 1115-1123.
9. Mahmood, S., G. L. Koul and J. C. Biswas. 1991. Comparative efficacy of FSH-p and PMSG on superovulation in Pashmina Goats. *Theriogenology*, 35: 1191-1196.
10. Majumdar, A. C., S. D. Kharche, S. Tyagi and G. Taru Sharma. 1997. Effect of pretreatment with hCG and estradiol-17β on superovulation and embryo recovery in goats. *Theriogenology*, 47: 176(abstr).
11. Park, C. S., H. Y. Choe, H. J. Lee, and J. S. Lee. 1991. Studies on the technological development of embryo transfer and manipu-

- ation in goats: III. Induction of superovulation with PMSG or FSH in goats. Korean J. Anim. Sci., 33(4): 288-293.
12. Pendleton, R. J., C. R. Youngs, R. W. Rorie, M. A. Memon and R. A. Godke. 1986. The use of norgestomet implants for the synchronization and superovulation of dairy goats. Theriogenology, 25: 180(abstr).
 13. Rexroad, C. E. Jr. and A. M. Powell. 1991. FSH injections and intrauterine insemination in protocols for superovulation of ewes. J. Anim. Sci., 69: 246-251.
 14. Ritar, A. J., W. M. Maxwell and S. Salamon. 1984. Ovulation and LH secretion in goats after intravaginal progestagen sponge-PMSG treatment. J. Reprod. Fertil., 72: 559-563.
 15. Ruttle, J., S. Lucero, M. Daniels, F. Rodriguez and H. S. Yim. 1988. Ovine estrus synchronization and superovulation using Norgestomet B and FSH-pituitary. Theriogenology, 30: 421-427.
 16. Selgrath, J. P., M. A. Memon, T. E. Smith and K. M. Ebert. 1990. Collection and transfer of microinjectable embryo from dairy goats. Theriogenology, 34: 1195-1205.
 17. Takahashi, Y and N. L. First. 1992. *In vitro* development of bovine one-cell embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. Theriogenology, 37: 963-978.
- (접수일자 : 1997. 11. 15. / 채택일자 : 1997. 12. 5.)