

재래돼지에서 수정란의 회수 및 동결보존에 관한 연구

손동수 · 연성흠 · 허태영 · 강석진 · 서국현 · 최선호 · 류일선 · 이규승* · 박창식*
농촌진흥청 축산연구소

Studies on Recovery and Cryopreservation of Embryos in Korean Native Swine

D. S. Son, S. H. Yeon, T. Y. Hur, S. J. Kang, G. H. Suh,
S. H. Choi, I. S. Ryu, K. S. Lee* and C. S. Park*

National Livestock Research Institute, R.D.A.

SUMMARY

For safe preservation of Korean Native Pigs (KNP) as an animal genetic resources and a means to maintain the genetic diversity, we performed to investigate the optimal hormone levels for superovulated gilts and establish the cryopreservation methods of embryos. The results were as follows;

1. The number of ovulated corpus luteums (CL) and follicles were 12.4, 13.6, 30.0 or 23.3 in hCG 500IU and PMSG 500, 750, 1,000IU or hCG 750IU and PMSG 1,000IU respectively. In the case of PMSG 1,000IU와 hCG 500IU, there showed highest number but were no significance among others. The recovery rate of embryos by the ovulated CL were 59.4~79.2%.
2. The morula stage embryos recovered on Day 4 after insemination were significantly higher than Day 5 ($P<0.01$), but blastocyst stage embryos recovered on Day 5 were significantly higher than Day 4 ($P<0.05$).
3. The survival rate of expanded blastocyst were 23.5% in conventional freezing with 1.4 M glycerol.

(Key words : cryopreservation, Korean Native Pig(KNP))

서 론

최근 동물유전자원의 보존이 세계적인 이슈로 대두되면서 가축의 개량 또는 생산성 향상을 위해 활용되어온 수정란이식 기술은 가축의 유전적 다양성을 장기간 저비용으로 안전하게 보존할 수 있는 수단으로 새롭게 평가받기 시작하였다.

가축을 살아있는 상태로 유지하면서 보존하기

위해서는 기본적으로 적절한 시설, 사료 및 관리인력이 투입해야 하는 등 많은 비용을 들여야 한다. 그러면서도 살아있는 집단은 전염병 등과 같은 질병이나 예상할 수 없는 사고 등의 위험에 취약하며, 집단의 크기가 적은 경우에는 근친교배를 피할 수 없기 때문에 유전적 다양성 보존은 항상 위협받을 수밖에 없다. 이러한 위험으로부터 가축유전자원을 장기적으로 안전하게 보존하는 수단은 생

본 연구는 농촌진흥청 대형공동연구과제(2000-2002) 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

*충남대학교 동물자원학부(Division of Animal Science, Chungnam National University)

† Correspondence : E-mail : sonds@rda.go.kr

식세포나 수정란을 동결시켜 영구적으로 보존하는 것이다.

우리나라의 재래돼지는 거의 멸종단계에서 수집되어 증식된 것이고, 집단 규모의 축산농장이 증가하면서 최근 외래품종과의 교잡이 성행하고 있는 상황에 있기 때문에 재래돼지의 생식세포나 수정란을 동결보존은 더욱 의의가 있다고 할 수 있다.

돼지에서 수정란이식은 호르몬 투여에 의한 과배란유기, 수정란 회수를 위한 외과적 개복수술, 마취, 난관 및 자궁 채란, 보존, 이식 등의 과정이 있다.

Hunter(1964)가 돼지에서 PMSG와 hCG의 투여로 과배란을 유기한 보고이후 개발된 품종에서 1,000IU 이상의 PMSG 투여에 의해 과배란이 유기된다고 보고했다(Dziuk와 Gehlbach, 1966; Baker와 Coggins, 1968). Day 등(1967)은 1,200IU PMSG와 500IU hCG를 투여하여 과배란을 유기했으며, 손 등(1987)은 altrenogest와 1,200IU PMSG와 750IU hCG를 투여하여 과배란을 유기하였다고 보고했다. 한편, Hazeleger 등(2000)은 PMSG 1,000IU로 과배란을 유기하여 회수한 수정란을 이식한 경우가 PMSG 1,500IU 투여로 회수한 수정란을 이식한 경우보다 수태율이 높았다고 보고함으로써 과도한 PMSG 투여는 과배란 유기에서 부적절함을 지적했다.

한편, Wilmut(1972)는 15~20℃로 냉각시킨 돼지 수정란은 이식후 임신되었지만 5~10℃까지 냉각시킨 것은 임신되지 않았다고 보고하여 돼지 수정란의 저온에 대한 감수성을 보고했으며, Polge(1977)는 돼지 수정란의 손상이 일어나는 임계온도를 15℃라고 하였고, Wilmut(1986)는 이 온도까지의 냉각속도는 수정란의 생존에 영향을 미치지 않는다고 하였다. Niemann(1985)은 항동해제를 처리해도 돼지수정란의 이러한 저온감수성이 개선되지 않았는데, 그것은 배반포배 이전의 돼지 수정란에 지질함량이 높기 때문일 것이라고 하였다.

돼지 수정란의 완만동결에 사용된 항동해제는 대부분 glycerol이었고(Cameron 등, 1992; Fujino 등, 1993; Kashiwasaki 등, 1991; Modi 등, 1996; Nagashima 등, 1992). Ethylene glycol(EG) 수정란

동결보존을 위한 항동해제로서 glycerol과 차이가 없고(Dochi 등, 1995; Nibart와 Humblot, 1977) 독성이 낮은 것으로 밝혀졌다(Sommerfeld와 Niemann, 1999).

수정란의 발달단계가 동결수정란의 생존성에 영향을 미쳐서 상실기와 초기배반포기는 동결에 견디지 못하지만 hatching 전후의 배반포기는 생존할 수 있는 것으로 밝혀졌으며(Cameron 등, 1992; Dobrinsky와 Johnson, 1994), 동결용해한 수정란을 이식하여 자돈을 생산하였으나 돼지 수정란 동결 결과는 일정하지 않았다고 하였다(Nagashima 등, 1994).

따라서 본 연구는 멸종위험이 큰 우리나라 재래돼지를 유전자원으로서 안전하게 보존하고, 유전적 다양성을 유지하기 위해 재래돼지에서 체내수정란의 동결보존을 위한 과배란처리 및 동결방법을 확립하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 과배란 처리 및 수정

본 시험에 공시된 재래돼지는 축산연구소에서 사육중인 12개월령 이상의 미경산돈으로 과배란 유기를 위해 altrenogest(Regumate[®], Intervet, France)를 1두당 1일 20mg씩을 발정주기와 관계없이 18일간 사료에 혼합하여 투여하고, altrenogest를 마지막 투여후 24시간에 PMSG(Follicon[®], Intervet, Netherland)를 처리수준에 따라 500, 750, 1,000IU를 피하주사하였으며, PMSG주사 80시간후에 hCG(Chorulon[®], Intervet, Netherland) 500 또는 750IU를 근육주사하였다. hCG 주사 다음날부터 발정 여부를 1일 2회씩 3일간 조사하였고, 발정이 관찰된 개체는 발정개시후 12시간과 24시간에 재래숫돼지로 자연교배 또는 재래숫돼지의 액상정액으로 인공수정하였다.

2. 수정란 채란

최종 수정후 4~5일째에 자궁으로부터 수정란을 회수하기 위하여 개복수술에 의한 외과적인 방법으로 채란하였다. 채란할 돼지는 수술 12시간 전부터 사료급여와 급수를 중지시켰다. 수술돼지는 체

중 kg당 atropine sulfate(Atropine[®], 광명약품) 0.04 mg과 azaperone(Stressnil[®], Janssen, Swiss) 1mg을 근육주사하여 진정(전마취)시켰고, 15분후 돼지 체중 kg당 ketamine HCl(Ketamine 50[®], 유한양행) 10mg과 xylazine HCl(Rompun[®], 바이엘코리아) 2mg을 정맥주사하여 전신마취시켰다.

전신마취된 돼지는 절개창 주위의 제모와 수세를 실시하고, 10% povidone iodide으로 소독한 다음 마지막 유두 사이의 중앙에서 전방으로 약 15cm의 피부를 절개하고, 피하지방을 절개창에 따라 좌우로 둔성분리한 다음 근육과 복막을 절개하였다. 복막절개 후 자궁을 복강 밖으로 노출시킨 다음, 각각의 난소에서 배란점을 확인하였다. 자궁각 분지점에서 난관쪽으로 5~10cm 이격된 자궁각을 장검자로 고정하고, 자궁각의 고정 부위 앞에 구멍을 뚫어 돼지 수정란 채란용으로 변형시킨 foley catheter를 넣은 다음, catheter balloon에 16~18ml의 공기를 주입하여 자궁강내 고정시켰다. Fetal bovine serum(FBS, Gibco, USA)이 5% 첨가된 Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS, Gibco, USA)의 관류액 50ml를 자궁각 상단부에 주입하고, 자궁각의 상단부에서 분지점쪽으로 부드럽게 마사지하며 관류시켜 50ml 원심분리관에 회수하였다. 반대측 자궁각도 동일한 요령으로 채란하였으며, 채란이 끝나면 복막과 복직근을 흡수성 봉합사로 연속봉합하였고, 근육과 피하조직도 흡수성 봉합사로 연속봉합한 다음, 피부는 비흡수성 봉합사로 단순결찰하였다.

3. 수정란 검사 및 체외배양

회수된 관류액을 실체현미경(Olympus SZH-10, Japan)하에서 검사하여 수정란을 회수하였다. 수정란은 신선한 관류액에 옮겨 발육단계와 상태를 검사한 다음, 발육단계에 따라 즉시 동결시키거나 적절한 발육단계에 이를 때까지 39°C, 5% CO₂ 및 포화습도의 CO₂ 배양기 내에서 FBS가 10% 첨가된 mNCSU-23(Petters와 Wells, 1993)으로 배양하였다.

4. 수정란 동결보존

항동해제로 glycerol을 이용한 처리에서는 FBS

가 20% 첨가된 D-PBS에 glycerol을 0.4, 0.8, 1.4M씩 넣은 용액을 만들어 각각 10분씩 단계별로 정치시켰다. 마지막 단계인 1.4M의 D-PBS에 정치시키는 동안 0.25ml straw에 수정란을 충전하고 프로그램동결기(CL863, Australia)를 이용하여 실험목적에 따라 18°C부터 -7°C까지 1°C/min의 냉각속도와 -7°C부터 -35°C까지 0.3°C/min의 동결속도(처리 1), 또는 2°C/min의 냉각속도와 0.5°C/min의 동결속도로 동결시켰다(처리 2). 또한 ethylene glycol을 항동해제로 이용한 처리에서는 FBS가 20% 첨가된 D-PBS에 ethylene glycol을 1.8M씩 넣은 용액을 만들어 15분간 평형시키고 0.25ml straw에 수정란을 충전하고 18°C부터 -7°C까지 1°C/min의 냉각속도와 -7°C부터 -35°C까지 0.3°C/min의 동결속도로 동결시켰다(처리 3). 이 과정에서는 -7°C에서 10분간 정지시켜 straw를 seeding 하였다. 이 수정란은 -35°C에서 액체질소에 넣어 보존하였다.

5. 동결수정란의 용해 및 생존성 검사

동결수정란의 용해는 37°C 수조에서 약 30초간 실시하였다. 항동해제로 glycerol을 이용한 수정란은 용해후 0.3M sucrose, 0.8M glycerol, 0.4M glycerol을 첨가한 D-PBS에 각각 10분씩 단계적으로 정치시킨 다음, 10% FBS 첨가 mNCSU-23으로 3회 세척했다. 항동해제로 ethylene glycol을 이용한 수정란은 용해후 즉시 D-PBS에 각각 10분간 정치시킨 다음, 10% FBS 첨가 mNCSU-23으로 3회 세척했다. 이들 수정란을 39°C, 5% CO₂ 및 포화습도의 CO₂ 배양기 내에서 FBS가 10% 첨가된 mNCSU-23로 48시간 배양하면서 생존 여부를 판단하였다.

6. 통계처리

본 연구에서 조사된 성적은 분산분석(ANOVA)을 실시했고, 분산분석 결과 유의성이 인정된 것에 대해서는 LSD에 의하여 처리간 차이를 구분했다.

결과 및 고찰

1. 과배란처리 난소반응 및 수정란 회수율

미경산 재래돼지의 PMSG와 hCG의 수준별 난소반응과 회수수정란수를 조사한 결과는 Table 1과 같다. hCG 500IU와 PMSG를 500, 750, 1,000IU 및 hCG 750IU와 PMSG 1,000IU를 각각 투여한 재래돼지의 배란황체와 미배란난포의 수는 각각 12.4, 13.6, 30.0 및 23.3개로 PMSG 1,000IU와 hCG 500 IU를 투여한 재래돼지가 다른 용량의 처리돼지보다 난소반응이 양호하였으나 유의적인 차이는 없었다. 한편 hCG 500IU와 PMSG를 500, 750, 1,000 IU 및 hCG 750IU와 PMSG 1,000IU를 각각 투여한 재래돼지의 회수된 수정란수는 각각 6.4, 8.0, 22.8 및 15.5개로 PMSG 1,000IU와 hCG 500IU를 투여한 재래돼지가 다른 용량의 처리돼지보다 난소반응이 양호하였으나 유의적인 차이는 없었으며, 배란황체수에 대한 회수율은 59.4~79.2% 수준이었다.

Ratky 등(2001)은 우리나라 재래돼지와 유사한 체중의 헝가리 재래종 Mangalica 미경산돈에 altrenogest 및 hCG 750IU와 PMSG를 각각 750, 1,000, 1,250IU 투여하여 배란황체는 각각 13.7, 24.2, 21.0개 였고, 미배란난포는 각각 1.8, 1.5, 1.8개로 본 연구의 결과와 유사한 성적을 보고하였으며, Mangalica 미경산돈의 과배란처리에 PMSG의 수준은 1,000IU가 적절하다고 하였다.

그러나 개량된 대형종의 돼지에 대해 과배란유기시 Baker와 Coggins(1968)는 PMSG 1,500IU와 hCG 500IU를 투여하였을 경우 배란점은 45.8개,

methallibure 및 PMSG 1,500IU와 hCG 500IU를 투여하였을 경우 28.3개라고 보고하였고, 김 등(2000)은 체중 100~120kg의 Yorkshire-Landrace×Duroc 3원교잡 미경산돈에 PMSG 1,500IU와 hCG 1,000 IU를 투여한 결과 배란점은 평균 8.1~13.9개라고 했으며, 손(1988)은 개량종 미경산돈에 altrenogest 및 hCG 500IU와 PMSG를 750, 1,200IU를 각각 투여하였을 때 배란점은 각각 14.0개와 30.7개로 PMSG의 투여량에 따라 차이가 있었다고 했다.

장 등(1995)은 랜드레이스 미경산돈에 altrenogest와 PMSG 및 hCG를 투여하여 과배란을 유기한 결과 배란황체수는 PMSG 1,000IU와 hCG 750IU를 투여한 경우 26.0개였고, PMSG 1,500IU를 투여한 경우 59.0개였으며, PMSG 1,000IU 시험구에서는 정상난자 회수율이 46.3%였으나 PMSG 1,500IU를 투여한 시험구는 과다한 호르몬 처리에 의해 난자의 정상율이 18.6%로 급격히 감소했다고 보고하였다.

과배란유기시 PMSG를 1,500IU 투여한 처리는 1,000IU 투여한 처리보다 수정란이식후 수태율이 감소하는 등 수정란의 질에 나쁜 영향을 미친다는 Hazeleger 등(2000)의 보고를 고려할 때, PMSG 투여수준은 과배란반응을 유도하는 최소수준으로 결정하는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

Ratky 등(2001)은 Mangalica 미경산돈으로부터 수정후 5일에 개복수술적 방법과 복강경 방법으로 자궁에서 수정란을 회수한 결과 각각 91.5%와

Table 1. Effects of PMSG and hCG levels on recovery rates of embryos and ovary response in Korean native gilts

Dosage (IU) of		No. of treated gilts	No. of			
PMSG	hCG		Corpus lutea	Non-ovulated follicles	Total (Min.~Max.)	Embryos recovered (%)*
500	500	3	10.7±3.3	1.7±0.7	12.4±2.9 (9~18)	6.4±3.8 (59.4)
750	500	3	12.3±1.8	1.3±0.3	13.6±1.5 (11~16)	8.0±3.0 (64.9)
1,000	500	5	28.8±6.6	1.2±0.4	30.0±6.6 (17~50)	22.8±8.0 (79.2)
1,000	750	4	21.8±7.5	1.5±1.5	23.3±6.8 (11~42)	15.5±6.2 (71.3)
Total		15	20.0±3.4	1.4±0.4	21.4±3.3 (9~50)	14.6±3.5 (73.0)

* The percentages were calculated by number of embryos recovered / number of corpus lutea ×100.

71.4%로 개복수술방법에 의한 회수율이 높았다고 했다.

Ducro-Steeverink 등(2004)은 PGF_{2α}, PMSG 및 hCG에 의해 배란을 유기한 6~8개월령의 미경산 교잡돈으로부터 자궁을 적출하여 16.5개의 배란황체를 확인하고, 회수된 난자는 13.8개로 84%의 회수율을 나타내었다고 했다.

Hazeleger 등(2000)은 eCG와 hCG를 투여하여 과배란을 유기한 경산돈에서 수정란회수율은 eCG를 1,000IU와 1,500IU를 투여한 시험구에서 수정란 회수율은 각각 84% 및 80%로 eCG를 나타내었다고 했다.

따라서 배란된 황체수에 따른 수정란의 회수율이 투여호르몬의 수준에 따라 다소 차이가 있으나 이는 수정란 회수의 기술적인 문제로 추정된다.

2. 회수 수정란의 발육단계

과배란처리하여 수정후 4일과 5일에 수정란을 회수하여 발육단계를 조사한 결과는 Table 2와 같다. 4일후 회수된 수정란의 발육단계는 상실기 8.8개, 배반포기 3.2개로 대부분이 상실기에서 초기배반포기의 수정란이 회수되었으나 5일후 회수된 이식가능수정란수의 대부분은 확장배반포기로 10.6개, 배반포기가 3.0개였다. 즉, 상실기의 수정란은 수정후 4일이 5일보다 유의적으로 많이 회수되었으며($P<0.01$), 배반포기의 수정란은 수정후 5일이 4일보다 유의적으로 많이 회수되었다($P<0.05$).

Hazeleger 등(2000)은 hCG 투여후 36~42시간에

수정시키고 hCG 투여후 7일에 자궁으로부터 회수한 확장배반포기의 비율은 회수된 수정란 16.3~31.0개에서 50~63%라고 했다.

Ducro-Steeverink 등(2004)은 hCG 투여후 30~39시간에 수정시키고 hCG 투여후 160시간에 회수한 수정란의 대부분은 확장배반포기의 수정란이었다고 했다.

김 등(1990)은 과배란처리된 공란돈에서 발정발현후 4일에 수정란을 회수한 경우 100%가 16세포기 이하였으며, 발정발현후 5일에는 2~4세포기 10.5%, 8~16세포기 37.6%, 상실기 25.0%, 배반포기 13.0%였고, 발정발현 후 6일에는 16세포기 이하 9.3%, 상실기 5.9%, 배반포기 44.3%, 탈출배반포기 16.8%라고 보고했다.

Ratky 등(2001)은 Mangalica 미경산돈으로부터 상실기와 배반포기 수정란을 두당 평균 17.3개를 회수하였으며, 미수정란 및 변성란은 1.4개가 회수되었다고 했다.

Besenfelder 등(1997)은 미경산돈에서 수정후 3일에 개복수술 또는 도살직후 회수한 난자수는 두당평균 22.0개였고, 그중 수정란수는 14.1개라고 했다.

3. 동결수정란의 생존성

재래돼지 수정란의 동결보존을 위해 수정란의 발육단계와 관행의 완만동결법(Gly-normal speed, 처리 1), 냉각속도와 동결속도를 변경한 방법(Gly-double speed, 처리 2) 및 항동해제를 변경한 방법

Table 2. Developmental stages of recovered embryos according to the collected day in Korean native gilts

Collection No. of days	No. of pigs	No. of embryos recovered (%)						Total
		Unfertilized	2~8 cell	Morula**	Blastocyst	Expanded Blastocyst*	Hatched Blastocyst	
4	8	0.0±0.0 (0.0)	1.3±0.5 (9.1)	8.8±2.0 (61.5)	3.2±2.8 (22.4)	1.0±1.0 (7.7)	0.0±0.0 (0.0)	14.3±4.4 (100.0)
5	7	0.8±0.5 (5.3)	0.0±0.0 (0.0)	0.3±0.3 (2.0)	3.0±1.0 (20.0)	10.6±4.3 (70.7)	0.3±0.3 (2.0)	15.0±5.9 (100.0)
Total	15	0.4±0.2 (2.7)	0.7±0.3 (4.8)	4.8±1.6 (32.9)	3.1±1.5 (21.2)	5.5±2.4 (37.7)	0.1±0.1 (0.7)	14.6±3.5 (100.0)

* $P<0.05$, ** $P<0.01$.

(EG-normal speed, 처리 3)에 따른 동결융해후 생존율을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 확장배반포기를 제외한 모든 수정란이 융해후 생존하지 못하였으며, 확장배반포기도 1.4M glycerol의 항동해제를 이용하여 관행의 완만동결법으로 동결한 처리에서만 생존하였다. 이러한 결과는 상실기와 초기 배반포기는 동결처리로 생존하지 못한 반면 탈출 전후의 배반포배기는 동결처리에 견딜 수 있다는 Cameron 등(1992) 및 Dobrinsky와 Johnson(1994)의 보고와 일치하였다. 또한 항동해제로 1.5M glycerol을 이용하여 관행의 완만동결법으로 돼지 수정란을 동결한 결과 배반포기는 전혀 생존하지 않았지만 확장배반포기는 24%가 생존했다는 Nagashima 등(1992)의 보고나 관행의 완만동결법에 의한 확장배반포기의 동결융해후 생존율이 22%였다는 Modl 등(1996)과도 같은 결과를 나타냈다.

따라서 glycerol을 이용한 관행의 완만동결법은 확장배반포기 이상의 돼지수정란을 보존할 수는 있지만 그 생존율은 아직도 더 개선할 필요성이 있으며, 완만동결법을 이용할 경우 EG는 적합하지

Table 3. Effects of survival rates on cryopreservation methods and developmental stages of embryos in Korean native gilts

Treat*	Development of embryo	No. of embryos		Survival rate (%)
		Frozen-thawed	Survived	
1	Morula	2	0	0.0
	Blastocyst	13	0	0.0
	Expanded blastocyst	74	19	25.3
2	Morula	4	0	0.0
	Blastocyst	14	0	0.0
	Expanded blastocyst	40	0	0.0
3	Blastocyst	2	0	0.0
	Expanded blastocyst	2	0	0.0

* Treat 1 : conventional freezing with glycerol.

Treat 2 : double speed of conventional freezing with glycerol.

Treat 3 : conventional freezing with ethylene glycol.

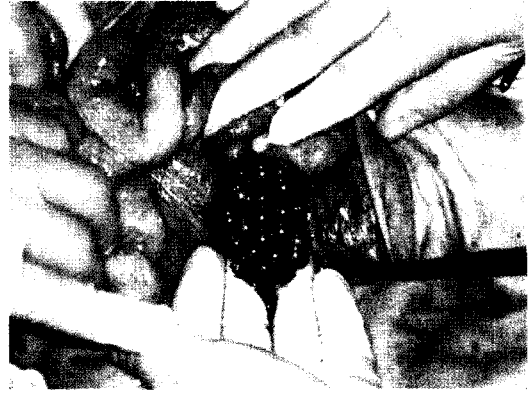


Fig. 1. The corpus lutea on 5 day after insemination in superovulated Korean native gilts.

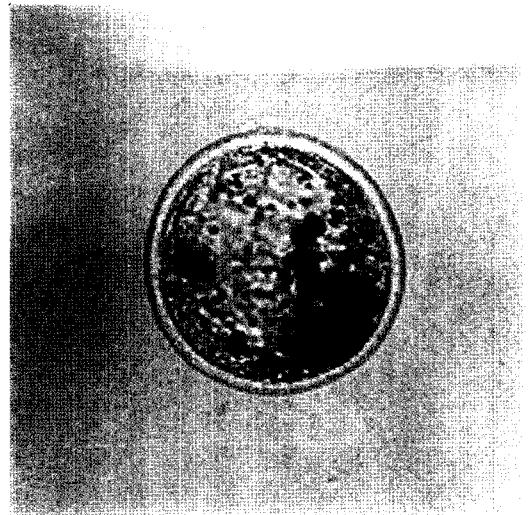


Fig. 2. Expanded blastocyst recovered on 5 day after insemination.

않은 것으로 추정된다.

이상의 결과로 미루어 보아 제래 미경산돈의 과배란처리를 위한 PMSG와 hCG 투여량은 각각 1,000IU와 500IU가 적당한 수준인 것으로 추정되며, 수정란의 동결보존을 위해서는 수정후 5일에 채란하여 확장배반포기를 회수하는 것이 효과적일 것으로 사료된다.

적 요

멸종위험이 큰 우리나라 제래돼지를 유전자원

으로서 안전하게 보존하고 유전적 다양성을 유지하기 위한 수단으로 수정란을 채취하여 동결보존하기 위해서 미경산 재래돼지에서 과배란 유기를 위한 적정 호르몬의 수준과 수정란의 회수 및 동결보존 방법을 확립하고자 수행한 결과는 다음과 같다.

1. hCG 500IU와 PMSG를 500, 750, 1,000IU 및 hCG 750IU와 PMSG 1,000IU를 각각 투여한 재래돼지의 배란황체와 미배란난포의 수는 각각 12.4, 13.6, 30.0 및 23.3개로 PMSG 1,000IU와 hCG 500IU를 투여한 재래돼지가 다른 용량의 처리돼지보다 난소반응이 양호하였으나 유의적인 차이는 없었으며, 배란황체수에 대한 수정란 회수율은 59.4~79.2% 수준이었다.
2. 과배란처리된 공란돈에서 수정후 4일에 회수된 수정란의 발육단계는 상실기의 수정란이 수정후 5일보다 유의적으로 많이 회수되었으며($P<0.01$), 수정후 5일에 회수된 배란포기의 수정란은 수정후 4일보다 유의적으로 많이 회수되었다($P<0.05$).
3. 확장배란포기 수정란을 1.4M glycerol의 항동해제를 이용하여 관행의 완만동결법으로 동결한 처리에서 생존율은 25.3%였다.

참고문헌

- Baker RD and Coggins EG. 1968. Control of ovulation rate and fertilization in prepubertal gilts. *J. Anim. Sci.*, 27:1607-1610.
- Besenfelder U, Modl J, Muller M and Brem G. 1997. Endoscopic embryo collection and embryo transfer into the oviduct and the uterus of pigs. *Theriogenology*, 47:1051-1060.
- Cameron RDA, Lising R, Nagashima H and Blackshaw AW. 1992. Cryopreservation of cultured and uncultured porcine embryos with glycerol and trehalose. *Proc. 12th Int. Pig Vet. Soc., Hague, Netherlands*, pp. 476.
- Day BN, Longenecker DE, Jaffe SC, Gibson EW and Lasley JF. 1967. Fertility of swine following superovulation. *J. Anim. Sci.*, 26:777-780.
- Dobrinsky JR and Johnson LA. 1994. Cryopreservation of porcine embryos by vitrification: A study of *in vitro* development. *Theriogenology*, 42:25-35.
- Dochi O, Imai K and Takakura H. 1995. Birth of calves after direct transfer of thawed bovine embryos stored frozen in ethylene glycol. *Anim. Reprod. Sci.*, 38:179-185.
- Ducro-Steeverink DWB, Peters CGW, Maters CC, Hazeleger W and Merks JWM. 2004. Reproduction results and offspring performance after non-surgical embryo transfer in pigs. *Theriogenology*, 62:522-531.
- Dziuk PJ and Gehlbach GD. 1966. Induction of ovulation and fertilization in the immature gilt. *J. Anim. Sci.*, 25:410-413.
- Fujino Y, Ujisato Y, Endo K, Tomizukz T, Kojima T and Oguri N. 1993. Cryoprotective effect of egg yolk in cryopreservation of porcine embryos. *Cryobiology*, 30:299-305.
- Hazeleger W, Bouwman EG, Noordhuizen JPTM and Kemp B. 2000. Effects of superovulation induction on embryonic development on day 5 and subsequent development and survival after nonsurgical embryo transfer in pigs. *Theriogenology*, 53:1063-1070.
- Hunter RHF. 1964. Superovulation and fertility in the pig. *Anim. Prod.*, 6:189-194.
- Kashiwasaki N, Ohtani S, Nagashima H, Yamakawa H, Cheng WTK, Lin AC, Ma RCS and Ogawa S. 1991. Production of normal piglets from hatched blastocysts frozen at -196°C . *Theriogenology*, 35:221.
- Modl J, Reichenbach HD, Wolf E and Brem G. 1996. Development of frozen-thawed porcine blastocysts *in vitro* and *in vivo*. *Vet. Rec.*, 139:208-210.
- Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Grupen CG, Seamark RF and Nottle MB. 1994. Recent

- advances in cryopreservation of porcine embryos. *Theriogenology*, 41:113-118.
- Nagashima H, Yamakawa H and Nieman H. 1992. Freezability of porcine blastocysts at different peri-hatching stages. *Theriogenology*, 37:839-850.
- Nibart M and Humblot P. 1997. Pregnancy rates following direct transfer of glycerol sucrose or ethylene glycol cryopreserved bovine embryos. *Theriogenology*, 47:371.
- Niemann H. 1985. Sensitivity of pig morulae to DMSO/PVP or glycerol treatment and cooling to 10°C. *Theriogenology*, 23:213.
- Petters RM and Wells KD. 1993. Culture of pig embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 48:61-73.
- Polge C. 1977. The freezing of mammalian embryos: perspectives and possibilities. In: Ciba Foundation Symp. New York: Excerpta. Medica, pp.3-18.
- Ratky J, Brussow KP, Solti L, Torner H and Sarlos P. 2001. Ovarian response, embryo recovery and results of embryo transfer in a hungarian native pig breed, *Theriogenology*, 56:969-978.
- Sommerfeld V and Niemann H. 1999. Cryopreservation of bovine *in vitro* produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology*, 38:95-105.
- Wilmot I. 1972. The low temperature preservation of mammalian embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 31: 513-514.
- 김희석, 小島敏之, 相馬正. 1990. 돼지의 수정란 이식에 관한 연구 I. 체란시기 및 반복체란이 수정란의 생산에 미치는 영향. *한축지*, 32:9-14.
- 손동수, 이광원, 최진성, 김경남, 강만석, 지설하, 박창식. 1987. 돼지 수정란 이식에 관한 연구. I. 발정동기화 및 과배란유기. *한축지*, 29:549-551.
- 손동수. 1988. 돼지의 수정란이식에 관한 고찰. *한국수정란이식연구회지*, 3:6-12.
- 장원경, 이진우, 박진기, 박수봉, 이장형, 박용윤. 1995. Altrenogest 투여가 미경산돈의 발정동기화 및 과배란에 미치는 영향. *농업논문집*, 37:489-492.

(접수일: 2004. 8. 11 / 채택일: 2004. 10. 17)