

한우 수정란의 동결보존 후 발달 효율 비교

조상래, 최창용, 김현중, 최선호, 손동수*
 농촌진흥청 축산과학원 가축유전자원시험장

Comparison of Developmental Efficiency Following Cryopreservation of Hanwoo Embryos

Sang-Rae Cho, Changyong Choe, Hyun-Jong Kim, Sun-Ho Choi and Dong-Soo Son*

Animal Genetic Resources Station, National Institute of Animal Science, RDA, Namwon 590-832, Korea

ABSTRACT

The cryopreservation of Hanwoo embryos has become an integral part of assisted reproduction in animal. The objective of this study was to assess the effect of The objectives of this study were: (1) to evaluate the influence of bovine embryo developmental stage on *in vitro* embryo development after freezing, (2) to study the efficiency compared with conventional freezed embryos at different embryo source. For conventional slow-freezing, day 7 or 8 expanded blastocysts were collected. The standard freezing medium was 1.8 M ethylene glycol (EG). Embryos were equilibrated in 1.8 M ethylene glycol(EG) with 0.1 M sucrose in Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS) supplemented with 0.5% bovine serum albumin. Embryos were then loaded individually into 0.25 ml-straw and placed directly into cooling chamber of programmable freezer precooled to -7°C , after 2 min, the straw was seeded, maintained at -7°C for 8 min, and then cooled to -35°C at $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$, plunged and stored in liquid nitrogen for at least 3 days. For thawing, the straw containing embryos were warmed in air for 10 sec and exposed to 37°C water for 20 sec. Straws were then removed from 37°C water. Rates of blastocyst survive and hatched were evaluated at 12 to 48h post-warming. The re-expansion and hatched rates of morula embryos were significantly lower than those obtained for blastocysts and expansion blastocysts (31.6%, 10.5% vs, 68.9%, 22.2% vs, 73.7%, 53.6%, respectively). No differences in re-expansion rates were found between *in vivo* and *in vitro* blastocysts. whereas hatched rates was significantly higher (51.2%) *in vivo* compared with *in vitro* embryos (18.6%). in conclusion, demonstrate that conventional freezing can be used successfully in cryopreservation of *in vitro* and *in vivo* bovine embryos, and that it might be considered for use in commercial programs and embryo preservation.

(Key words : bovine, embryos, *in vitro*, *in vivo*, cryopreservation)

서 론

수정란 동결에 대한 연구는 생명공학 분야뿐만 아니라 가축의 개량과 증식 그리고 보존분야에서도 그 중요성이 증가되고 있다. 기후 변화에 따른 지구의 식생 변화와 각국의 토종가축 또는 희소품종들을 보존하여 국가의 유전자원 확보를 위한 측면에서 종자의 보존은 곧 국가의 미래자산이기 때문이다. 현재 수정란의 동결 후의 생존성에 대한 연구수준은 상대적인 결과로 나타나고 있다, 특히 난자의 동결에서는 더욱더 동결의 기술이 요구된다(Chen 등, 1988; Yang 등, 1998). 그리고 또한 동결보존한 수정란은 많은 물리적 생리화학적 손상을 받을 수 있다. 이를 태면 세포내의 빙정 형성으로 인한 세포의 미세소기관의 비정상적인 활동과 손상(Gook 등, 1993; Baka 등, 1995)을 비롯하여 어떠한 조건하에서 급격하거나 비정상적인

삼투압, 온도의 변화, 동결보호제의 독특한 성분, 그리고, 동결보호제의 노출시간에 따른 pH 변화 등에 따라서 생존성에 영향을 주며, 수정란의 동결 방법에 따른 생존성에도 연구자들간의 각각 다른 보고를 하고 있다(Damien 등, 1990; Hunter 등, 1991, 1995). 소에 있어서 동결보존 방법은 수정란을 동결보존 후 용해하여 직접 이식하는 slow-freezing(완만동결) 방법과 보다 간편한 동결법인 vitrification(초차화동결) 방법을 이용하고 있다. Slow-freezing 방법은 ethylene glycol을 이용한 동결법으로 동결-용해 수정란의 임신율이 우수하여(Pereira 등, 2002) 동결란의 직접이식법으로 이용되고 있으나, vitrification 방법은 동결 후 용해하는 과정을 순차적이고 필수적으로 하여야 하므로 현장에 적용하는 것이 불가능하기 때문에 거의 이용되고 있지 않다. 그러나 동결 수정란을 사용하는 이유로서는 수정란의 수송이 용이하다는 점과 그리고 그들의 원종을 안전하게

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

보존할 수 있으며 그리고 질병의 관찰과 자연교미에 따른 질병전파를 방지하기 위한 장점을 지니고 있기 때문에 수정란의 동결 보존에 대한 다양한 연구는 지속적으로 이루어지고 있다 (Fahning 등, 1992). 소 수정란을 동결보존한 후 융해하였을 때 수정란의 생존성에 영향을 미치는 요인으로서 많은 연구자들에 의해서 보고되어 왔다. 즉, 수정란의 생산 일령과 발달단계 그리고 소 수정란 동결을 위한 동결보호 동결보호제의 종류 등과 관련이 있다. 그리고 수정란 동결을 위한 동결 보호제로는 종류로서는 세포내·외 침투성 및 비침투성의 보호제를 사용하게 되는데, 소에 있어서는 주로 침투성 동결 보호제를 사용하게 된다(Carvalho 등, 1995). 세포내에 침투하는 동결보호제로서는 분자량과 독성이 적고 세포내에 침투성이 강한 ethylene glycol의 동결보호제를 가장 많이 소 수정란 동결에 사용되고 있다(Rall 등, 1992; Wurth 등, 1994; Sommerfield and Niemann 등, 1999; Massip, 1995). Ethylene glycol을 비롯한 침투성 동결 보호제들의 특성으로서는 소 수정란내로 침투하는 성질이 동물 종간의 차이가 있는 것으로 알려져 있으나, 이와 비슷한 동결보호제로 사용되고 있는 DMSO와 glycerol보다는 현재 많이 사용되고 있다. 한편, 동결 보호제 glycerol은 수정란의 발달 단계에 따라서 즉, compact morulae와 blastocysts 단계의 수정란 동결에서 우수한 생존율을 나타내고 있다고 보고 하였다(Niemann, 1991). 한편 ethylene glycol은 DMSO보다도 수정란의 세포막을 천천히 침투하는 특성을 지니기 때문에 이 두 종류의 동결 보호제 간에는 침투계수가 다르기 때문에 동결보호제의 침투 정도도 각각의 요인에 따라서 즉, 세포의 침투계수, 세포내·외의 동결보호제, 농도변화, 온도 그리고 세포의 표면적에 따라서 수정란의 생존성이 좌우되기도 한다고 보고하였다. 그러나 일반적으로 ethylene glycol은 수정란이식 시 별도의 동결 보호제의 회색에 따른 융해 과정을 반복적으로 거치지 않고 수정란이 장착된 스트로우를 융해 후 직접이식하는 방법으로 주로 사용되는 동결 보호제이다. 이러한 직접이식의 장점으로서 융해과정이 별도의 과정이 필요치 않아 간단하며, 그리고 기술적인 실수를 줄일 수 있는 점을 가지고 있다는 것이다(Suzuki 등, 1993). 이러한 직접이식방법에서 성공적인 수정란이식을 위해서는 수정란의 삼투압의 영향으로 인한 세포의 손상을 막는 것이 중요한 사항이다. 일반적으로 삼투압의 손상을 줄이기 위해서는 세포막의 투과성이 높은 물질들은 대체로 분자량이 적기 때문에 단시간 내에 세포내로 침투하여 세포내·외의 농도 차이를 줄임으로서 수정란에 미치는 삼투압의 손상을 최소화 하게 된다. 그래서 이러한 삼투압의 손상을 최대한 줄이는 방법으로서 glycerol 또는 propylene glycol보다도 침투성이 더 높은 ethylene glycol을 사용하여 소의 자궁에다 직접이식하게 된다(Szell 등, 1989). 그리고 이외에 동결보호제로서 사용되는 것은 당류인 sucrose와 단백질류, 그리고 PVP(polyvinyl pyrrolidone) 등이 사용된다. 이러한 물질들은 고

분자화합물이면서 비침투성의 특징을 지니기 때문에 단독 또는 다른 동결 보호제와 병행하여 소 수정란의 동결 보존에 사용하고 있다. 그리고 고분자 화합물들은 주로 수정란의 발달 단계에 따른 동결보존에 이용되고 있다. 그리고 Leibo와 Loskutoff(1993)는 ethylene glycol에 당류들을 병행하여 수정란의 생존성을 보고하기도 하였다. Sucrose는 주로 동결시 동결 보호제에 노출되는 순간 삼투압의 영향을 많이 받기 때문에 이러한 삼투압의 손상을 줄이기 위한 완충제로서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 소 체내·외 수정란의 발달단계에 따른 동결 융해 후의 생존성 조사에 대한 보고 내용이 다소 미흡하여 본 연구는 이와같은 연구를 수행하여 효과적인 동결성을 조사하고자 한다.

재료 및 방법

1. 체외성숙

한우 도축 암소로부터 적출된 난소를 회수하여 실험실로 운반하여 실험에 공시하였다. 본 실험의 조건에 맞춘 난소 수송온도는 0.9% 생리식염수의 온도를 25℃ 이상의 조건으로 맞추어 보온병에 담아 실험실로 2시간 이내로 운반하였다. 직경이 2~6 mm의 난포로부터 난포란을 난포액과 함께 19 gauge 주사침이 부착된 10 ml 주사기를 이용하여 흡입방법으로 난포 세포를 채취하였으며, 체외성숙을 위한 난포세포는 1,2 등급(IETS 기준)만을 사용하였다. 체외성숙은 TCM199(Sigma, U.S.A)를 기본배양액으로 5% Fetal Bovine Serum(FBS, Gibco, U.S.A), 10 µg/ml LH(Sigma, U.S.A) 및 35 µg/ml FSH(Sigma, U.S.A)를 첨가하여 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 22시간 동안 실시하였다.

2. 체외수정

체외수정에 사용된 정액은 한우동결정액(KPN)을 이용하였으며, 정자분리는 BO medium을 이용하여 1,800 rpm에서 5분 동안 2회 원심분리 후 체외수정용 배양액에서 1회 원심 분리하여 체외수정에 사용하였다. 사용된 정액의 최종농도는 2 × 10⁶/ml 이었다. 체외성숙된 난포란의 난구세포 일부를 제거하기 위해서 0.1% PVA(polyvinyl alcohol)가 첨가된 D-PBS(Sigma) 배양액에서 약 10초간 vortexing 후 수정 배양액인 50 µl IVF 100(IFP, Japan) 미소적에 약 20개의 체외성숙된 난포란과 정자를 공동 배양하여 수정을 유도하였다.

3. 수정란의 체외배양

체외배양에 사용된 수정란은 체외수정 후 무혈청 배양액인 IVMD(IFP, Japan)와 TCM 199 배양액에 5% FBS를 첨가하여 난구세포와 공배양을 실시하였다. 체외수정 후 48 시간에 분할율을 확인하였으며, 72(3일)시간과 120(5일)시간에 신선한 배양액으로 배양액 교환을 하였으며, 배반포기배의 확인은 수

정 후 7일과 8일째 실시하였다.

4. 체내수정란 생산

체내수정란 생산을 위해서 한우 공란우의 처리는 발정발현과 무관하게 progesterone releasing intravaginal device인 CIDR (CIDR-plus, InterAg, New Zealand)를 질내에 삽입하고 CIDR 삽입 7~8일째부터 FSH(Antorin R-10^{ks}, Kawasaki, Japan) 28 AU를 감량법으로 12시간 간격으로 4일간 나누어서 근육주사를 실시하였으며, FSH 투여량은 5회째에 PGF_{2α} 제제인 Lutalyse^{ks} (Belgium)를 25 mg, 6회째에 15 mg을 근육 주사하였고 CIDR를 제거하였다. 발정징후를 나타내는 공란우는 12시간 간격으로 2회 인공수정을 실시하였다, 인공수정 후 7일째 비외과적인 방법으로 수정란을 채란하여 수정란 동결실험에 공시하였다.

5. 수정란의 동결보존

수정란의 완만동결을 위한 동결 보호제로서는 1.8M ethylene glycol(EG), 그리고 평형 배양액은 D-PBS(Sigma, U.S.A) 배양액에 0.5% bovine serum albumin(BSA, Sigma, U.S.A)을 첨가하여 사용하였다. 그리고 수정란의 장착을 위해서 1.8 M EG에 0.1M sucrose가 혼합된 동결보호제에 수정란을 침지시켜 실온에서 약 15분간 평형을 시킨다. 그리고 0.25 ml 수정란 이식용 플라스틱 스트로우내에 수정란을 장착하였다. 수정란의 동결은 수정란 자동 동결기(CL 863, U.S.A)를 사용하여 실시하였다. 스트로우를 동결기의 chamber에 넣고 3분간 정지(-7℃, 10분)한 후 seeding을 실시하고, 최종 동결 온도인 -35℃까지 도달하기 위해서 0.3℃/분 속도로 온도를 하강시킨 후 액체질소에 침지를 한다. 그리고 스트로우를 캐니스터에 담아 액체질소에 보관한다.

동결된 수정란의 생존성을 확인하기 위하여 스트로우를 보관고에서 꺼내어 공기 중에 약 10초간 노출시킨 후 37℃로 가온된 온수에서 약 20초간 용해하여 HEPES-Buffer 배양액에서 3회 세척한 후 체외배양액으로 옮겨 1회 세척한 다음 48시간과 72시간 동안 배양을 실시하여 수정란의 재확장 및 부화 여부로 생존성을 판단하였다.

6. 통계처리

수정란의 동결 후 체내 및 체외 수정란의 재확장율과 부화율 조사에 대한 결과 비교는 Chi-square test 방법을 이용하여 유의성 검정($p < 0.05$)을 실시하였다.

결과 및 고찰

Table 1은 체외에서 수정 후, 7, 8, 9일째 배양된 수정란을 이용하여 완만 동결하였을 때 생존성을 조사한 실험 결과이다. 수정란의 발달 단계에 따른 내용성을 확인하기 위하여 완

Table 1. Survivability of frozen-thawed blastocysts produced *in vitro* by at different embryo stages

Embryo stage	No. of used embryos	No. of embryos (%)	
		Re-expansion	Hatched
Morula	38	12 (31.6) ^a	4 (10.5) ^a
Blastocysts	45	31 (68.9) ^b	10 (22.2) ^b
Expansion Blastocysts	38	28 (73.7) ^b	15 (53.6) ^c

^{a,b} Values with different superscripts in the same column were significantly different ($p < 0.05$)

Replicate 4.

만 동결 방법에 따른 수정란의 생존성을 평가하였다. 수정란에 관한 성공적인 동결방법은 동물들의 종류를 비롯하여 다양한 발달 단계에 따라서 적용된다(Leibo 등, 1996; Pugh 등, 2000). 실험 결과에서 상실배 수정란을 동결 후 용해하였을 때 형태적인 생존율 즉, 재확장율은 31.6%로서 배반포 및 확장배반포 수정란보다 유의적으로($p < 0.05$) 낮은 결과를 나타내었다. 그러나, 배반포 및 확장배반포의 수정란은 형태학적으로 재확장된 수정란의 비율은 68.9%와 73.7%의 결과를 나타내었다. 확장배반포에서 다소 높은 발달율을 보였다. 그러나 수정란이 재확장된 후 부화배반포기까지의 발달율에서는 유의적인 차이를 나타내지 않았으나, 상실배에서는 10.5%로서 배반포 및 확장배반포 수정란의 22.2, 28.9% 보다는 낮은 부화율을 보였다. Leibo 등(1996)은 상실배 단계 수정란을 용해하였을 때 약 13%의 부화율을, 그리고 초기 배반포일 때는 약 38%, 확장 배반포일 때는 75%의 결과를 보고하였다. 확장 배반포가 다른 발달 단계에 비해서 높은 결과를 보고하였다. 이러한 결과에서 알 수 있듯이 수정란의 발달 초기에는 동결에 대한 손상이 절대적으로 영향을 미치는 것으로 나타났다. 발달을 거듭할수록 수정란의 동결에 대한 손상을 줄일 수가 있어 재확장 후 부화 단계까지 도달하는 비율도 유의적으로($p < 0.05$) 높은 비율을 나타내었다. 이러한 결과는 수정란의 발달 단계에 따른 특성과 동결 보호제의 유독한 성분 그리고 동결 온도 및 냉각 속도를 비롯한 동결의 전반적인 기술과도 관련이 있어 다양한 동결생리학적 특징을 이해하는 것이 필요하다(Niemann, 1991; Rall, 1992; Massip 등, 1995). Iwasaki 등(1994)에 의하면 소 수정란의 동결에 대한 손상은 내부 세포피와 영양막 세포의 대부분이 손상을 받았기 때문이라고 보고하였으며, 체외 수정란의 생존성을 향상시키기 위해서는 배양액의 조성의 변화로 동결에 대한 생존율을 개선시킬 수가 있었다(Semple 등, 1995). 따라서 수정란의 발달단계가 초기배일 때는 동결에 대한 손상이 많아 생존성에 영향을 미칠 수 있으므로 후기배 즉 확장 배반포 단계일 때

가 동결성을 유지하는데 효과적인 것으로 나타났다.

Table 2는 체내 수정란과 체외수정란을 동결 융해하였을 때의 생존성을 나타낸 결과이다(Fig. 1). 체내 수정란과 체외수정란을 비교할 때 안정적인 생존성을 보이고 있다. 이러한 결과는 수정란 생산을 위한 배양체계에 따라서 수정란의 질적인 차이로 인하여 생존율에도 영향을 미칠 수 있다(Massip 등, 1995). 본 연구에서도 체내수정란이 81%, 체외생산된 수정란이 69%의 결과를 보여 체내 수정란이 더 높은 발달율을 보였다. 그러나 본 실험에서는 동결 융해 후 재확장율에는 유의적인 차이를 나타내지 않았으나, 융해 후 24시간 이상 배양하였을 때 부화율은 체내수정란이 51.2%로서 체외수정란에 비해 (18.6%) 유의적으로($p < 0.05$) 높은 발달율을 보였다. 재확장율과 부화율에서 체내수정란이 높은 결과를 보인 것은 동결 후의 내성에 관한 세포내의 초위성체를 통한 관찰을 통해서도 확인이 가능한 부분이다(Papadopoulos 등, 2002). 동결 융해 후의 생존성의 향상에 기인하는 원인으로서 가장 중요한 것은 수정란의 질적인 부분이다. 질 좋은 수정란은 동결 융해 후의 생존성과 수란우에 이식하였을 때 착상을 향상에 중요한 영향을 줄 수 있으므로 적절한 배양액의 선택과 배양체계를 확립하여 할 것이다(Rizos 등, 2002). 본 연구에서 체내수정란을 동결 융해 후 수란우에 이식하였을 때의 결과를 보면 수정란을 과배란 처리 후 15개의 수정란을 융해하였다. 12시간 이상 배양하였을 때 재확장된 수정란은 13개로서 86.6%의 결과를 나타내었다. 그 중에서 재확장되어 확장배반포 단계까지 도달한 수정란을 수란우 5마리에 이식하여 60일 후에 직장 검사를 실시하여 임신진단을 실시한 결과 3마리에서 임신을 확인하였다. 한편, Mermillod 등(1997)은 체외수정란이 상대적으로 높은 임신율(54%)을 나타내었으나, 임신 42일과 56일령에 유산을 일으켰다는 보고를 하여 체외수정란에서 알려지지 않은 메커니즘을 다시 한번 확인이 가능하였다. 현재의 연구 결과로 미루어 볼 때 가축번식 생리와 조기배 생리학 분야에 대한 연구는 새롭고 더 진보되고, 그리고 상된 도전적인 문제들로 다가오고 있기 때문에 이러한 동결생리학적 문제들도 분자 생

Table 2. *In vitro* survival rates of bovine embryos conventional frozen with different embryo source

Embryo	No. of used embryos	No. of embryos (%)	
		Re-expansion	Hatched
<i>In vivo</i>	43	35 (81.4)	22 (51.2) ^a
<i>In vitro</i>	75	52 (69.3)	14 (18.6) ^b

^{a,b} Values with different superscripts in the same column were significantly different ($p < 0.05$)
Replicate 7.

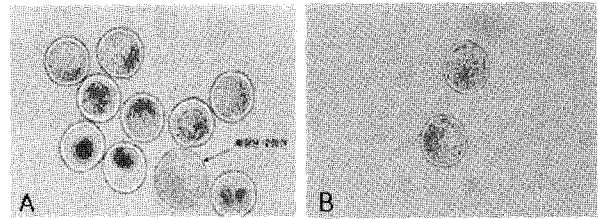


Fig. 1. Survival of bovine *in vivo* derived embryos at 12h post-warmed (before(A) and after (B) embryo freezing, x 100, Olympus IX 71)

화학적 특성을 비롯한 포유동물의 난자와 수정란에 대한 다양한 특성에 대한 지속적인 연구가 수행되어야 할 것으로 보인다. 결론적으로 완만 동결방법에 따른 수정란의 발달 단계에 따른 생존율은 상실배보다는 배반포 및 확장 배반포 수정란이 효과적이었으며, 체내수정란이 체외수정란보다 높은 부화율을 보여 수정란을 이용한 산업적 이용에 효과적인 지표로서 이용 가능할 것으로 사료된다.

결 론

한우 체외수정란에 대한 동결보존 방법은 생명공학 분야뿐만 아니라 다양한 분야에서 그 중요성은 대두되고 있다. 특히 축산연구에서는 수정란의 동결 효율을 증진시켜 유전자원 보존과 산업적인 이용에 적극 활용하는 방법 중의 하나이다. 본 연구에서는 수정란의 동결성을 조사하기 위하여 체외수정란의 발달 단계에 따른 동결 방법을 조사하였다. 그 결과, 체외수정란을 동결한 후 재확장 비율은 상실배에서 유의적으로($p < 0.05$) 낮은 결과를 보였으나, 배반포 및 확장 배반포 단계에서는 차이를 보이지 않았다. 그리고 부화율 조사에서는 확장배반포가 상실배와 배반포단계 수정란보다 유의적으로 높은 53.6%로 가장 높은 발달율을 보였다. 그리고 체내·외 수정란의 동결 효율성에서 융해 후 재확장율은 차이가 없었으나 부화율에서는 체내수정란이 유의적으로($p < 0.05$) 높은 발달율을 보였다 (51.2% vs, 18.6%). 수정란의 발달 단계에 따른 동결성은 확장 배반포 단계에서 그리고 체내수정란이 부화율에서 높은 발달율을 보였다. 이상의 결과로 볼 때 수정란의 동결 보존시 수정란은 확장 배반포 단계의 수정란을 이용하는 것이 수정란을 효율적으로 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

Baka SG, Toth TL, Veeck LL, Jones Jr HW, Muasher SJ and Lanzendorf SE. 1995. Evaluation of the spindle apparatus of *in vitro* matured human oocytes following cryopreservation. Hum.

- Reprod. 10:1816-1820.
- Carvalho RV, Del Campo MR, Palasz AT, Plante Y and Mapletoft RJ. 1996. Survival rates and sex ratio of bovine IVF embryos frozen at different developmental stage on day 7. *Theriogenology* 45:489-498.
- Chen C. 1988. Pregnancies after human oocyte cryopreservation. *Ann. NY Acad. Sci.* 541-549.
- Damien M, Luciano AA and Peluso JJ. 1990. Propanediol alters intracellular pH and developmental potential of mouse zygotes independently of volume change. *Hum. Reprod.* 5:212-216.
- Fahning ML and Garcia MA. 1992. Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. *Cryobiology* 29:1-18.
- Gook DA, Osborn SM and Johnston WI. 1993. Parthenogenetic activation of human oocytes following cryopreservation using 1,2-propanediol. *Hum. Reprod.* 10:654-658.
- Hunter JE, Bernard A, Fuller B, Amso N and Shaw RW. 1991. Fertilization and development of the human oocyte following exposure to cryoprotectants, low temperatures and cryopreservation: a comparison of two techniques. *Hum. Reprod.* 6:1460-1465.
- Hunter JE, Fuller BJ, Bernard A, Jackson A and Shaw RW. 1995. Vitrification of human oocytes following minimal exposure to cryoprotectants; initial studies on fertilization and embryonic development. *Hum. Reprod.* 10:1184-1188.
- Iwasaki S, Yoshikane Y, Li X, Watanabe S and Nakahara T. 1994. Effects of freezing of bovine preimplantation embryos derived from oocytes fertilized *in vitro* on survival of their inner cell mass cells. *Mol. Reprod. Dev.* 37:272-275.
- Leibo SP, Martino A, Kobayashi S and Pollard JW. 1996. Stage-dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. *Anim. Reprod. Sci.* 42:45-53.
- Leibo SP and Loskutoff NM. 1993. Cryobiology of *in vitro* derived bovine embryos. *Theriogenology* 39:81-94.
- Massip A, Mermillod P and Dhmyes A. 1995. Morphology and biochemistry of *in-vitro* produced bovine: implications for their cryopreservation. *Hum. Reprod.* 10:3004-3011.
- Mermillod P, Trialdi AL, Guerin Y, Poulin N, Massip A and Cognie Y. 1997. Successful vitrification of *in vitro* produced ovine embryos. In: Proceedings of the 13th Scientific Meeting of the European Embryo Transfer Association (AETE) Lyon. pp. 182.
- Niemann H. 1991. Cryopreservation of ova and embryos from livestock current status and research needs. *Theriogenology* 35:109-124.
- Papadopoulos P, Rizos D, Duffy P, Wade M, Quinn K, Boland MP and Lonergan P. 2002. Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, *in vivo* or *in vitro* produced ovine blastocysts. *Anim. Reprod. Sci.* 74:35-44
- Pereira PV, Dayan A, Watanabe MR, Avila FM, Marchizeli JC, Accorsi M F and Watanabe YF. 2002. Pregnancy rate following transfer of cryopreservation *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology* 57:475.
- Pugh PA, Tervit HR and Niemann H. 2000. Effect of vitrification medium composition on the survival of bovine *in vitro* produced embryos, following in straw-dilution, *in vitro* and *in vivo* following transfer. *Anim. Reprod. Sci.* 58:9-22.
- Rall WF. 1992. Cryopreservation of oocytes and embryos: methods and applications. *Anim. Reprod. Sci.* 28:237-245.
- Rizos D, Lonergan P, Ward F, Papadopoulos S and Boland MP. 2002. Developmental, qualitative and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 62:320-327.
- Semple ME, Betteridge KJ and Leibo SP. 1995. Cryopreservation of *in vitro*-derived bovine embryos produced in a serum-free culture system. *Theriogenology* 43:320.
- 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.
- Suzuki T, Takagi M, Yamamoto M, Boediono A, Saha S, Sakakibara H and Ooe 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.
- Széll A, Shelton JN and Széll K. 1989. Osmotic characteristics of sheep and cattle embryos. *Cryobiology* 26(3):297-301.
- Wurth YA, Reinders JMC, Rall WF and Kruij TAM. 1994. Developmental potential of *in vitro* produced bovine embryos following cryopreservation and single-embryo transfer. *Theriogenology* 42:1275-1284.
- Yang DS, Dhlohm PL, Winslow L and Cramer L. 1998. A twin pregnancy after microinjection of human cryopreserved oocyte with a specially developed oocyte cryopreservation regime. *Fertil. Steril.* 70:S239.