

한우 체외 수정란 및 성 감별 수정란 이식에 의한 송아지 생산

민찬식, 송상현¹, 손귀동², 정우재², 노치원, 강양수, 박충생², 공일근^{1,2,*}
경상남도 농업기술원, ¹경상대학교 농업생명과학연구원, ²경상대학교 응용생명과학부

Production of Calves Following Transfer of Sexed Hanwoo Embryos and Hanwoo Embryos Cultured *In Vitro*

Chan-Sik Min, Sang-Hyun Song¹, Gwi-Dong Son², Woo-Jae Chung², Chi-Won Rho, Yang-Soo Kang, Choong-Saeng Park² and Il-Keun Kong^{1,2,*}

Gyengsnagnamdo Agriculture Research & Extension Services

¹Institute of Agriculture & Life Sciences, Gyeongsang National University

²Division of Applied Life Science (BK21), Graduate School of Gyeongsang National University

ABSTRACT

This study was carried out to examine the efficiency of biopsy methods, and the pregnancy rate, calving and abortion rates, gestation length and birth weight of Hanwoo calves following transfer of fresh, frozen and sexed Hanwoo embryos produced *in vitro*. The survivability of biopsied embryos was 80.0 and 90.0% using aspiration and punching methods at 24 h after culturing, respectively. The ratios of male and female embryos were 42.1 and 52.6%, respectively, and the percentage of sex unidentified was 5.3%. Pregnancy rates was not significantly different between hCG and control group (46.4 vs. 38.5%), fresh and frozen embryos (41.3 vs. 35.0%), and sexed and IVP embryos (27.5 vs. 41.2%) ($p>0.05$). Calving and abortion rates of IVP and sexed embryos were not significantly different in calving (85.0 vs. 87.0%) and in abortion (15.2 vs. 13.3%) ($p<0.05$). Gestation length of IVP and sexed calves were 281.3 and 288.2 days in female and 283.0 and 282.3 days in male, and the birth weight of IVP and sexed calves were 23.6 and 25.0 kg in female and 24.6 and 23.8 kg in male, respectively. There were no difference in gestation length and birth weight between IVP embryos and sexed embryos ($p>0.05$). Administration of hCG to recipients did not improve the pregnancy rate following transfer of Hanwoo embryos produced *in vitro* and sexed embryos. Although the production of calves derived from sexed Hanweoo embryos cultured *in vitro* can be obtained, the efficiency of sexed calves production need to be improved in biopsy methods and pregnancy rate. Further study should be focused on the improvement of pregnancy rates for commercial application of embryo transfer.

(Key words : embryo sexing, biopsy, PCR, embryo transfer)

서 론

수정란의 유전자 진단은 생쥐, 소, 양 등에서 보고되었는데, 가축에서는 수정란의 성 판정을 위하여 시행되고 있다(Chrenek 등, 2001; Park 등, 2001). 소 수정란의 성 감별을 수정란 이식, 가축 개량 프로그램과 조화시킬 경우 유우, 육우 생산에 많은 유익한 효과들이 있을 것이다(van Vleck 등, 1987). 수정란의 한 개 또는 그 이상의 할구세포를 biopsy한 후, 수정란의 성 감별 방법에는 성 염색체 검사법, x-염색체 특이 효소 측정법, 음성 특이 항체(Gordon 등, 2004), 연쇄 중합 반응(PCR), 형광직접 접합법(fluorescence in situ hybridization; FISH)을 이용하기도 한다. 소 수정란의 성감별에 이용되는 방법들 중

에 널리 이용되지 못하는 것은 정확도, 처리 속도가 낮기 때문 일 것이다. 그러나, PCR 방법은 거의 정확도가 100%에 가까우며, 처리 시간도 몇 시간 내에 성을 판정할 수 있으므로 널리 이용되고 있다.

Santos 등(2001)은 고능력 젖소의 인공 수정 후 5일째 3,300 IU hCG를 주사하여 부황체 형성을 유지하여 혈장 progesterone의 농도를 증가시켜 수태율의 개선 효과가 있었다고 하였다. 초기 황체기에 hCG를 처리하면 제1 난포주기의 우세난포를 배란시키고 기능 황체를 형성한다. Hasler(2001)는 신선란과 동결란의 수태율의 차이는 수정란의 질, 등급에 의한 것이며, 낮은 등급의 수정란을 동결하면 동결 과정중의 손상을 많이 받는 것이 수태율이 낮은 원인이라고 하였다. Sakaguchi

* 본 연구는 농촌진흥청 지역특화기술개발사업에 의해 지원되었음.

* Correspondence : E-mail : ikong@gnu.kr

등(2002)은 수정란 이식 후 20일경에 20%, 30일에 50%의 수정란의 조기 사멸이 발생하며, 이식 후 80일령에도 14%가 유산된다고 한다. Nishigai 등(2002)은 발정 후 6일째에 1,500 IU를 처리하고 수정란을 이식했을 때, 황체의 기능이 활성화되었으며, E₂의 농도가 낮아지는 것을 확인하였으며, 수태율도 향상되는 효과가 있었다고 한다. 화우에 hCG를 처리했을 때, 혈장 progesterone의 농도가 증가하면 수태율이 증가하였으나, E₂의 농도가 증가했을 때는 수태율이 저하되는 것을 확인하였다(Nishigai 등, 1998, 2000). 체외 수정란은 동결에 대해 아주 민감하며, 부적절한 체외 배양 체계에 의해 동결 수정란 이식 후 수태율이 낮아진다(Massip 등, 1995). 그러나 체외 수정란의 동결 용해 후 이식한 수태율은 신선란과 유의적인 차이가 없다(O'Keamey-Flynn 등, 1998). 또한, 체내 수정란 이식 후에도 신선란과 동결란의 수태율은 차이가 없었다(Smith와 Grimmer, 2002). Hasler(2001)는 신선란과 동결란의 수태율의 차이는 수정란의 질, 등급에 의한 것이며, 낮은 등급의 수정란을 동결하면 동결 과정중의 손상을 많이 받는 것이 수태율이 낮은 원인이라고 하였다. 쌍태인 경우, 단태에 비하여 생시 체중과 임신 기간이 단축되는 경향이 있으며, 쌍태는 단태에 비하여 생시 체중이 20% 정도 감소하였다. 또한, 체외 수정란 이식 후 태어난 송아지의 생시 체중은 인공 수정에 의해 태어난 송아지에 비하여 높았다(Sakaguchi 등, 2002).

본 연구에서는 수정란의 성 판정 및 수정란 이식 후 수태율을 개선하기 위하여 신선란과 동결란 이식 후 수태율, 수란수에 1,500 IU hCG 처리 효과가 수태율에 미치는 영향, 성감별 수정란의 수태율을 조사하고, 송아지의 생시 체중, 임신 기간을 조사하고자 한다.

재료 및 방법

1. 난자채란 및 체외 성숙

도축 한우 암소의 난소로부터 채취한 미성숙 난자는 0.1% PVA가 첨가된 TL-Hepes로 3회 정도 세척한 후, 실체 현미경(Olympus, Japan)하에서 검경하여 실험에 공시하였다. 체외 성숙 배양액은 10% fetal bovine serum(FBS)가 첨가된 TCM-199 배양액에 sodium pyruvate(56 µg/ml), streptomycin(100 µg/ml), penicillin G(100 units/ml)와 LH(10 µg/ml), FSH(10 µg/ml)

로 조성하였다. 체외 성숙은 500 µl의 체외 성숙 배양액이 들어 있는 4 well multi-dish(Nunc, Denmark)에 50개의 미성숙 난포란을 넣고 39°C, 5% CO₂ incubator에서 20~22시간 동안 배양하여 체외 성숙을 유도하였다.

2. 체외 수정

체외 수정을 위한 정자의 준비는 동결 정액을 35~37°C의 온수에서 1분 동안 용해하였다. 활력이 높은 정자를 채취하기 위하여 Percoll density gradient(90/45%)법으로 정자를 분리하여 사용하였다. 체외 성숙된 20~25개의 난자가 들어있는 체외 수정용 배양액 소척(50 µl)에 정자를 분주하였다. 정자의 최종 농도가 1~2 × 10⁶ sperms/ml이 되도록 농도를 조절하여 22~24시간 동안 39°C, 5% CO₂ incubator에서 체외 수정을 유도하였다.

3. 체외 배양

체외 수정된 수정란은 BSA 또는 FBS가 첨가되어 있는 SOF 배양액으로 3~4 회 세척 후 난구세포와 정자를 완전히 제거하여 체외 배양액에서 배양하였다. 배양 조건은 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ 및 39°C에서 수정란을 배양하였으며, 배양액은 48시간마다 신선한 배양액으로 교환했다.

4. 수정란 성 감별

Biopsy법은 손 등(2005)의 방법으로 punching 법으로 할구를 채취하거나, aspiration법으로 할구를 수정란으로부터 분리하였다. 상실배 수정란을 Ca²⁺, Mg²⁺ free D-PBS 100 µl의 미소적에서 micromanipulator(Narishige, Japan)가 부착된 도립현미경하에서 실시하였으며, 수정란의 할구를 채취한 후, 0.1% PVA가 첨가된 D-PBS에 3~4회 세척한 다음, 0.4% BSA가 첨가된 SOF에서 배양하였다. Genomic DNA를 추출하기 위하여 액체 질소와 37°C 온수에서 동결과 용해를 3회 반복하여 준비하였으며, 추출된 DNA는 PCR buffer와 primer가 들어 있는 PCR tube에 넣고 PCR 장치에서 반응을 유도하였다. 증폭 cycle의 횟수는 45 cycle로 매 cycle당 denaturation은 95°C에서 30 sec간, primer extension은 59°C에서 30 sec간, extension은 72°C에서 30 sec 동안 반복 수행하였다. 그리고 마지막 cycle은 extension 시간을 72°C에서 5 min 동안 연장 반응하였다. 반응이 끝난 후

Table 1. Oligonucleotide primer sequence for embryo sexing

Primer	Sequences	Product size (bp)
Bovine specific	5'-TGGAAGCAAAGAACCCCGCT-3" 5'-TCGTGAGAAACCGCACACTG-3"	216
Bovine X-chromosome specific	5'-GGATCCGAGACACAGAACAGG-3" 5'-GCTAATCCATCCATCCTATAG-3"	301

PCR 산물을 2% agarose gel에서 전기영동한 다음, ethidium bromide로 염색하여 UV illuminator에서 성을 판정하였다.

5. 수정란의 이식 및 임신 감정

수정란의 수송은 선발된 수정란을 10% FBS가 첨가된 D-PBS가 들어 있는 0.25 ml의 straw에 장착하여 시험관에 담아서 운반하였다. 수정란의 온도 shock을 줄이기 위해서 37~39℃가 유지될 수 있는 보온병에 담아 2~3 시간 내에 이식할 수 있는 지역에서 수정란을 수송·이식하였다. 이식하는 수정란은 발달 단계와 일령을 구분한 다음, 2개의 수정란을 10% FBS가 첨가된 D-PBS와 함께 0.25 ml straw에 장착하여 비외과적 방법으로 이식하였다. 임신 감정은 이식 후 50~60일경에 발정이 재귀되지 않은 수란우를 대상으로 임신 유무를 판정하였다.

6. 통계학적 분석

본 연구에서 얻어진 결과의 분석은 ANOVA를 통하여 분석하였으며, 처리간의 차이는 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. hCG 투여가 수정란 이식 후 수태율에 미치는 영향

수정란 이식 후 hCG투여가 수태율에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 발정 후 7일째에 hCG를 처리한 수란우가 무처리한 수란우에 비해 수태율이 각각 46.4%와 38.5%로서 높은 경향을 보였다.

Chagas와 Lopes(2005)는 부황체를 가진 수란우와 부황체가 없는 수란우에 수정란을 이식했을 때, 수태율은 부황체를 가진 수란우의 수태율이 유의적으로 높다고 한다. Santos 등(2001)은 고능력 젖소의 인공 수정 후 5일째 3,300 IU hCG를 주사하여 부황체 형성을 유기하여 혈장 progesterone의 농도를 증가시켜 수태율의 개선 효과가 있었다고 하였다. Nishigai 등(2001)은 배란 후 5일째에 1,500 IU의 hCG를 주사하여 황체의 발달을 촉진하고 제1난포기의 우세난포를 배란을 유기한 결과 progesterone의 농도가 증가하고 E₂의 농도가 감소하였다고 한다. 본 연구에서는 hCG처리가 수태율 개선에는 도움이 되었으나, 다른 연구자들과 같이 유의적인 차이는 나타

Table 2. Effect of administration of hCG to recipients on pregnancy rates following transfer of IVP bovine embryos

Treatment	No. of recipients	
	Transferred	Pregnant (%)
Control	52	20 (38.5)
hCG	28	13 (46.4)

나지 않았다.

2. 신선란과 동결란의 수태율

Table 3은 한우 체외 수정란과 동결 수정란을 젖소에 각각 이식한 결과로서, 신선란과 동결란을 각각 80두와 20두의 수란우에 이식한 수태율은 41.2%와 35.0%를 나타내었다. Hasler 등(1995)은 신선란과 동결란을 이식하여 신선란의 수태율이 높게 나타났으며, 이것은 동결 수정란은 동결 용해 후 수정란의 손상에 기인하며, 그밖에 수정란의 질, 수정란과 수란우의 동기화 등이 수태율에 영향을 미친다고 한다. 또한, 신선란이나 동결란을 경산우와 미경산우에 이식했을 때 미경산우의 수태율이 높다는 보고도 있으나(Hasler, 2001; Dochi 등, 1998;), 차이가 없거나(Callsen 등, 1994) 또는 같다(Broadbent 등, 1991)는 것은 경산우의 영양 상태와 연관이 있다고 한다. 본 연구에서는 신선란과 동결란 이식 후 수태율에는 유의적인 차이를 나타내지 않았으나, 향후에는 수정란의 동결 방법을 개선하거나, 수정란 이식 후 수태율 향상 방안을 모색해야 할 것으로 사료된다.

3. 수정란의 Biopsy 방법에 따른 수정란의 생존율

수정 후 6일째의 상실배를 aspiration 법과 punching 법으로 수정란의 할구를 biopsy한 결과는 Table 4와 같다. Aspiration으로 수정란의 할구를 채취한 다음 10%의 FBS가 첨가된 SOF 배양 후 생존율과 퇴화율은 각각 80.0와 20.0%였으며, punching 법에 의한 생존율과 퇴화율은 각각 90.0와 10.0%였다.

Biopsy는 수정란의 발달을 저해하는 효과가 있으며, 투명대를 관통하여 할구세포를 채취하여 수정란의 발달을 저해하지 않는 효율적인 방법의 개선이 요구된다(Chatzimeletiou 등,

Table 3. Pregnancy rate of recipients following transfer of fresh or frozen bovine embryos produced *in vitro*

Treatment	No. of recipients	
	Transferred	Pregnant (%)
Fresh embryo	80	33 (41.3)
Frozen embryo	20	7 (35.0)

Table 4. Survival rates of biopsied bovine embryos cultured *in vitro* by different biopsy methods

Biopsy methods	No. of embryos	No. and (%) of embryos	
		Survivability	Degeneration
Aspiration	25	20 (80.0)	5 (20.0)
Punching	20	18 (90.0)	2 (10.0)

2005). 초기 단계의 수정란을 biopsy하면 배반포까지의 발달을 감소하며, 이식 후 수태율도 낮아지지만, 수정 후 3~5일째의 수정란을 biopsy했을 때는 배반포 수정란까지의 발달에는 영향을 미치지 않는다고 한다(Lee 등, 2004; Park 등, 2001). Shea(1999)는 aspiration법에 의한 수정란의 biopsy는 성 감별에 필요한 할구세포를 충분하게 채취할 수 있을 뿐만 아니라, 추가적인 미세조작이 필요 없으므로 수정란의 손상을 최소화할 수 있다고 한다. 김 등(2000)은 초기, 중기, 확장 배반포 단계의 수정란을 bisection한 결과 생존율이 각각 75.0 88.9 및 91.1%로서 초기 배반포의 생존율이 낮았다고 한다. 본 연구에서는 여러 연구자들(Lee 등, 2004; Park 등, 2001)과 유사한 경향을 보였으며, 수정란의 질이 biopsy 후 수정란의 생존율에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

4. 수정란의 성 감별

152개의 한우 체외 수정란에서 biopsy하여 성 감별한 결과, 64개의 수정란이 female(216 bp), 80개의 수정란이 male(216, 301 bp)로 판정되었다(Fig 1). 또한, 8개의 수정란을 실험상의 착오로 인해 성 판정을 할 수가 없어 수정란의 암수의 비율은 42.1와 52.6%로 수 수정란의 비율이 높은 경향을 나타내었다.

몇몇 연구자들은 발달 속도가 빠른 수정란이 male 수정란이라고 하였으며(Avery 등, 1991; Bredback와 Bredback, 1996), 조 등(2005)은 한우 체외 수정란의 경우 암수 비율은 유의적인 차이가 없었으나, Holstein의 경우 수컷 수정란의 비율이 유의적으로 높았다고 한다. 본 연구에서는 male 수정란의 비율이 약간 높게 나타나 다른 연구자들과 유사한 경향을 나타내었다.

5. 성 감별 수정란의 수태율

Table 6은 성 감별 수정란과 체외 수정란을 이식 후의 수태율을 조사한 결과로서, 성 감별하지 않은 수정란과 성 감별한 수정란의 수태율은 각각 41.2%와 27.5%로서, 성 감별 수정란

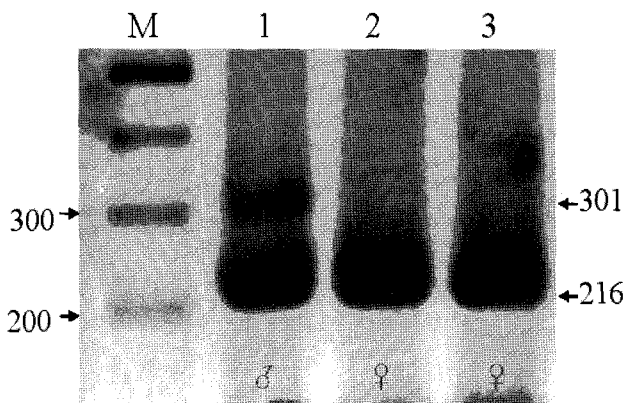


Fig. 1. Sex determination of Hanwoo embryos cultured *in vitro* by PCR.

Table 5. Sex ratio of bovine embryo produced *in vitro*

No. of embryos	No. and (%) of sexed embryo to		Ambiguity
	Female	Male	
152	64 (42.1)	80 (52.6)	8 (5.3)

이식에 의한 수태율이 낮은 경향을 보였다. Lopes 등(2001)은 성 감별한 수정란의 수태율은 intact한 수정란과 유의적인 차이는 없었으며, Shea(1999)는 수정란의 질에 따라 수태율에 영향을 미친다고 한다. Agaca 등(1998)은 성 감별 수정란 이식 후 수태율은 50%였으며, 성 감별된 동결 수정란을 이식하여도 신선란과 유의적인 차이가 없었다고 한다. 김 등(2003)은 성 감별된 수정란을 한우와 젖소 수란우에 각각 이식하여 24.3와 12.5%의 수태율을 나타내었으며, 손 등(2005)는 33.3%의 수태율을 얻었다고 한다. 본 연구 결과의 수태율은 국내 수태율과는 비슷한 경향을 보였으나, 외국의 수태율과는 많은 차이를 보여 수태율을 개선할 수 있는 방법을 모색해야 할 것으로 사료된다.

6. 성 감별된 수정란과 체외 수정란 유래 송아지의 분만율과 유산율

성 감별된 수정란과 성 감별하지 않은 수정란을 이식한 후, 송아지 분만율과 유산율은 Table 7과 같다. 성 감별하지 않은 수정란을 80두의 수란우에 이식한 33두의 임신우중 28두가 분만하였으며, 5두가 유산하여 분만율과 유산율은 각각 85.0와 15.2%였다. 성감별 수정란의 경우, 15두의 임신우중 13두가 분만하였으며, 2두가 유산하여 분만율과 유산율은 각각 86.7와 13.3%였다. 성 감별하지 않은 수정란과 성 감별한 수정란 이식 후의 분만율과 유산율은 유의적인($p>0.05$) 차이는 없었다.

인공 수정보다 체외 수정란 이식 후 수정란의 조기 사멸율이 높으며(McEvoy 등, 1995), Sakaguchi 등(2002)은 수정란 이식 후 20일경에 20%, 30일경에 50%의 수정란의 조기 사멸이 발생하며, 이식 후 80일령에도 14%가 유산된다고 한다. 본 연구에서도 수태율이 낮은 것은 biopsy에 의한 수정란의 손상에 의한 것으로 사료되며, 향후에는 biopsy 방법의 개선이 필요할 것으로 사료된다. 앞에서도 언급했듯이 punching 방법은

Table 6. Pregnancy rate of recipients following transfer of sexed embryos

Treatment	No. and (%) of recipients	
	Transferred	Pregnant
Control	80	33 (41.2)
Sexed embryo	80	22 (27.5)

Table 7. Calving rates and abortion rates of pregnant Hanwoo cows following transfer of sexed embryos produced *in vitro*

	No. and (%) of produced		
	Pregnant cows	Calved cows	Aborted cows
Control	33	28 (85.0)	5 (15.2)
Sexed embryos	15	13 (87.0)	2 (13.3)

Table 8. Gestation length and birth weight of calves derived from IVP and sexed embryos

	Gestation length (day)		Birth weight (kg)	
	♀ (n)	♂ (n)	♀ (n)	♂ (n)
Control	281.3±6.7 (12)	283.0±5.7 (15)	23.6±5.9 (12)	24.6±5.7 (15)
Sexed embryos	288.2±3.8 (4)	282.3±0.5 (6)	25.0±1.8 (4)	23.8±1.2 (6)

생존율은 좋지만, 내부 세포괴가 biopsy된다면, 이식 후 수태율에 영향을 미칠 것으로 사료된다.

7. 성 감별된 송아지의 임신 기간 및 생시 체중

한우 체외 수정란과 성 감별된 수정란 이식에 의해 생산된 송아지의 임신 기간은 암 송아지의 경우 281.3일과 288.2일이었으며, 수송아지의 임신 기간은 283.0일과 282.3일로 나타났다. 생시 체중의 경우, 한우 체외 수정란과 성 감별 수정란 이식에 의해 생산된 송아지는 암송아지가 23.6과 25.0 kg이며, 수송아지는 24.6과 23.8 kg으로 나타났다. 체외 수정란 이식 후 태어난 송아지의 생시 체중은 인공 수정에 의해 태어난 송아지에 비하여 높았다(Sakaguchi 등, 2002). Kruip와 den Dass (1977)는 인공 수정 유래 송아지 1%가 과체중인데 반하여 체외 수정란 유래 송아지의 14.4%가 과체중이었다고 한다. 본 연구에서 수송아지의 임신 기간이 짧은 것과 생시 체중이 암송아지에 비해 낮은 것은 수송아지의 경우 모두 쌍태였기때문인 것으로 사료된다.

적 요

본 연구는 한우 체외 수정란의 성 감별과 신선란, 동결란 및 성 감별 수정란을 이식한 후 수태율, 분만율과 유산율, 생시 체중, 임신 기간을 조사하기 위하여 수행하였다. Aspiration 과 punching법으로 biopsied한 수정란을 24시간 배양 후 생존율은 각각 80.0%와 90.0%로 유의적인(p>0.05) 차이는 없었다. 수정란을 성 감별한 결과, 음성 수정란과 자성 수정란의

비율은 각각 42.1%와 52.6%였으며, 5.3%는 수정란의 성을 판정하지 못하였다. hCG를 처리한 수란우의 수태율은 46.4%로서 무처리구(38.5%)에 비하여 높은 경향이였으나, 처리구간의 유의적인 차이는 없었다. 신선란과 동결란을 수정란 이식 후 수태율은 각각 41.3와 35.0%로서 유의적인 차이는 없었다. 성 감별된 수정란과 성 감별하지 않은 체외 수정란 이식 후 수태율은 각각 27.5와 42.1%로 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 성 감별 된 수정란과 성 감별하지 않은 체외 수정란 유래 송아지의 분만율은 각각 85.0와 87.0%이었으며, 유산율은 각각 15.2와 13.3%로서 분만율과 유산율은 유의적인 차이는 없었다. 성 감별된 수정란과 성 감별하지 않은 체외 수정란 유래 송아지의 임신 기간은 각각 281.3일(♀), 283.0일(♂)과 288.2일(♀), 282.3일(♂)이었으며, 생시 체중은 각각 23.6(♀), 24.6(♂)과 25.0(♀), 23.8 kg(♂)로 유의적인 차이는 없었다. hCG 처리한 수란우는 한우 수정란 이식 후 수태율 개선 효과는 있는 것으로 판단된다. 성 감별 수정란 이식에 의해 송아지는 생산되었으나, 수정란의 biopsy 방법, 수정란 이식 후 수태율 개선과 같은 송아지 생산 효율을 개선해야 할 것으로 사료된다. 수정란 이식의 산업화가 정착하기 위해서는 동결란과 신선란 이식 후 수태율의 개선에 대한 노력이 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

Agca Y, Monson RL, Northry DL, Preschel DE, Schaefer DM and Rutledge JJ. 1998. Normal calves from transfer of biopsied sexed and vitrified IVP bovine embryos. *Theriogenology* 50:129-145.

Avery B, Madison V and Greve T. 1991. Sex and development in bovine *in vitro* fertilized embryos. *Theriogenology* 35: 953-963.

Breadback K and Bredback P. 1996. Glucose controls sex related growth rate differences of bovine embryos produced *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 106:169-172.

Broadbent PJ, Stewart M and Dolman DF. 1991. Recipient management and embryo transfer. *Theriogenology* 35:125-139.

Callesen H, Bak A and Greve T. 1994. Embryo recipients: dairy cow or heifer? *Proc. of the 10th Scientific Meeting of the AETE, Lyon, France*, pp. 125-135.

Chagas SJ and Lopes LC. 2005. Luteotrophic influence of early bovine embryos and the relationship between plasma progesterone concentrations and embryo survival. *Theeriogenology* 64:49-60.

Chatzimeletiou K, Morrison EE, Panagiotidis Y, Prapas N, Parapas Y, Rutherford AJ, Grudinskas G and Handyside AH.

2005. Comparison effects of zona drilling by non-contact infrared laser or acis Tyrode's on the development of human biopsied embryos as revealed by blastomere viability, cytoskeletal analysis and molecular cytogenetics. *Reprod. Biomed.* 11:697-710.
- Chrenek P, Boulanger L, Heyman Y, Uhrin P, Laurinicki J, Bulla J and Renard JP. 2001. Sexing and multiple genotype analysis from a single cell of bovine embryo. *Theriogenology* 55:1071-1081.
- Dochi O, Yamamoto Y, Saga H, Yoshida N, Kano N, Maeda J, Miyata K, Yamaguchi A, Tominaga K, Oda Y, Nakashima T and Inohae S. 1998. Direct transfer of bovine embryos frozen-thawed in the presence of polyethylene glycol or ethylene glycol under on-farm conditions in an integrated embryo transfer program. *Theriogenology* 49:1051-1058.
- Gordón JC, Agüera S and Castejón F. 2004. Sexing *in vitro* produced bovine embryos, at different stages of development, using rat H-Y antiserum. *Theriogenology* 62:35-43.
- Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, Mower SA, Neely B, Dhuey LS, Stokes JE and Trimmer SA. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 43:141-152.
- Hasler JF. 2001. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* 56:1401-1415.
- Kruip TAM and den Dass JHG. 1997. *In vitro* produced and cloned embryos: effects on pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology* 47:43-52.
- Lee JH, Park JH, Lee SH, Park CS and Jin DI. 2004. Sexing single blastomere derived from IVF bovine embryos by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Theriogenology* 62:1452-1458.
- Lopes RF, Forell F, Oliveira AT and Rodrigues JL. 2001. Splitting and biopsy for bovine embryo sexing under field conditions. *Theriogenology* 56:1383-1392.
- Massip A, Mermillod P and Dinneys A. 1995. Morphology and biochemistry of *in vitro* produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. *Hum. Reprod.* 10:3004-3011.
- McEvoy JD, Mayne CS and McCaughy WJ. 1995. Production of twin calves with *in vitro* fertilised embryos: Effects on the reproductive performance of dairy cows. *Vet. Rec.* 136:627-632.
- Nishigai M, Kamomae H, Tanaka T and Kaneda Y. 1998. Pregnancy rate and blood progesterone concentrations on the previous day and the day of frozen embryo transfer in parous recipient cows of Japanese Black. *J. Reprod. Dev.* 44:413-419.
- Nishigai M, Kamomae H, Tanaka T and Kaneda Y. 2000. The relationship of blood progesterone and estrogen concentrations on the day before and the day of frozen-thawed embryo transfer to pregnancy rate in Japanese Black cattle. *J. Reprod. Dev.* 46:235-243.
- Nishigai M, Kamomae H, Tanaka T and Kaneda Y. 2001. The effect of administration of human chronic gonadotropin in enhancing bovine corpus lutea luteinization and luteal function. *J. Reprod. Dev.* 47:283-294.
- Nishigai M, Kamomae H, Tanaka T and Kaneda Y. 2002. Improvement of pregnancy rate in Japanese Black cows by administration of hCG to recipients of transferred frozen-thawed embryos. *Theriogenology* 58:1597-1606.
- O'Kearney-Flynn M, Wade M, Duffy P, Gath V, Boland MP and Dorbinsky JR. 1998. Effect of cryopreservation on IVP cattle embryo development *in vitro* and *in vivo*. *Theriogenology* 49:178 (Abstract).
- Park HJ, Lee JH, Choi KM, Joung SY, Kim JY, Chung GM, Jin DI and Im KS. 2001. Rapid sexing of preimplantation bovine embryo using consecutive and multiplex polymerase chain reaction (PCR) with biopsied single blastomere. *Theriogenology* 55:1843-1853.
- Sakaguchi M, Geshi M, Hamano S, Yona M and Nagai T. 2002. Embryonic calving losses in bovine mixed-breed twins induced by transfer of *in vitro* produced embryos to bred recipients. *Anim. Reprod. Sci.* 72:209-221.
- Santos JE, Thatcher WW, Pool L and Overton MW. 2001. Effect of human chronic gonadotropin on luteal function and reproductive performance of high-producing lactating Holstein dairy cows. *J. Anim. Sci.* 79:2881-2894.
- Shea BF. 1999. Determining the sex of bovine embryos using polymerase chain reaction results: a six year retrospective study. *Theriogenology* 51:841-854.
- Smith AK and Grimmer SP. 2002. Pregnancy rates for grade 2 embryos following administration of synthetic GnRH at the time of transfer in embryo-recipient cattle. *Theriogenology* 57:2083-91.
- van Vleck LD, Pollak JE and Brandford-Oltenacu EA. 1987. *Genetics for Animal Science*. New York: Freeman WH. 287-313.
- 김용준, 이창민, 정구남, 이해리, 조성우, 김용수, 신동수, 홍유미, 유일정. 2003. 성 감별된 한우 체외 수정란 이식. *한국*

수정란이식학회지 18:97-108.

김용준, 정구남, 이해이, 조성우, 김용수, 유일정. 2000. 한우 체외 수정란 Biopsy 후 PCR 기법을 이용한 성 판정과 성 감별 수정란의 이식. 한국수정란이식학회지 15:219-230.

손동수, 조상래, 최창용, 최선호, 한만희, 김현중, 조창연, 진현주, 김영근, 정연길, N. Saito, S. Kageyama, 최상용. 2005. 한우 체내수정란의 성판별 후 이식으로 우수 송아지 생산.

한국수정란이식학회지 20:163-168.

조상래, 최선호, 김현중, 한만희, 최창용, 정연길, 손동수. 2005. LAMP방법에 의한 소 수정란의 성 판별과 biopsy에 따른 수정란의 발달. 한국수정란이식학회지 20:169-176.

(접수일: 2008. 3. 10 / 채택일: 2008. 3. 25)