

## 체외성숙 난포란을 이용한 소배의 생산

박 수 봉

경북대학교 농과대학

## Production of Bovine Embryos Using Follicular Oocytes Matured In Vitro

S. B. Park

College of Agriculture, Kyungpook National University

### Summary

The technique for maturation of follicular oocyte has been devised to provide such a low cost and in plentiful number supply of bovine embryo. Some of problems concerning production of bovine embryo in vitro were discussed in this paper. Bovine follicular oocytes cultured in vitro achieved normal fertilization but cleavage rates to blastocyst were low compared to the oocyte matured in vivo. It has been concluded that a deficient cytoplasmic maturation occurs in the oocytes matured in vitro. These results indicate that the studies for maturation of bovine follicular oocytes in vitro need improvement of culture conditions and to define the characteristics that might be indicative of healthy oocyte.

### 서 론

현재 대부분의 포유동물의 체외수정 기술은 확립되어져 있고 hamster를 제외하고 체외수정후 수정란이 식에 의해 이들 동물의 산자가 얻어졌다. 최근 도살장에서 쉽게 얻어지는 난소의 난포란을 체외성숙·수정시킨 후 상실배 혹은 배반포기까지 발생시킨 후 비외과적 방법으로 이식하여 송아지의 임신 및 분만에 성공함으로써(Hanada, 1986; Crister 등, 1986; Xu 등, 1987; Goto 등, 1988; Utsumi 등, 1988; Lu 등, 1989) 체외수정기술의 발전과 더불어 체외성숙 난포란의 이용에 더욱 관심이 고조되어왔고, 정상적 발생능을 가진 수정란을 다량으로 생산할 수 있는 기술개발이 가능하게되면 과배란치리에 의해 제한된 수의 수정란을 얻고있는 소의 경우 유전공학적 연구 및 응용에 필요한 많은 수정란을 저렴한 가격으로 다량 생산이 가능하게 된다. 현재 이러한 목적을 위해 수많은 연구가 진행되고 있고 이러한 기술의 확립을 위해서는 더욱 더 많은 요인의 분석과 기술의 발전을 필요로 하고 있다.

본고에서는 소를 중심으로 지금까지 보고되어온

난포란의 체외성숙배양시 성숙 수정 및 발생능에 영향을 주는 요인에 대해 소개하고 난포란의 체외성숙과 관련된 연구 및 문제점에 대해 검토하고자 한다.

### 난포란을 이용한 배의 생산에 영향을 주는 요인

Mouse에서 배양조건 개선은 체내성숙난에 손색이 없는 정상적인 발생능을 가진 체외성숙란을 얻을 수 있고(Schroeder 와 Eppig, 1984), Follicle cell의 coculture에 의해 양의 체외성숙난포란의 정상적 발생능이 보고된(Staigmiller 와 Moor, 1984)이래 소의 체외수정 방법의 확립과 더불어 소난포란의 체외성숙·수정 및 발생에 관한 연구는 눈부시게 발전하여 체외성숙난포란으로부터 송아지 생산은 수많은 성공례가 보고 되어졌다(Leibfried-Rutledge 등, 1989 for review).

#### 1. 난포란의 체외배양의 요인

난포란의 배양조건은 성공적인 결과를 처음으로 보고한 양의 난포란 배양조건을 그대로 응용하고 있다(Staigmiller 와 Moor, 1984), 배양액으로는

37°C 5% CO<sub>2</sub>기상조건에서 pH 7.2~7.4의 TCM199가 널리 이용되어지고 있고 첨가물질로는 혈청, gonadotropin, steroid 등이 기본적으로 첨가되고 있다. 혈청은 FCS(fetal calf serum)와 ECS(estrus cow serum)이 널리 이용되고 있으며 성숙 및 수정에 큰 차를 가져오지 않으며 발생능에 있어서 ECS가 우수하다는 보고가 있으나 그 반대의 보고 역시 있는 것으로 보아 FCS와 ECS 어느 것이든 10% 정도의 첨가에 의해 만족스런 결과를 얻을 수 있다고 믿어진다. Gonadotropin으로서 LH와 FSH가 동시에 첨가되거나 LH만 첨가되고 있으며 성숙술에는 큰 영향이 없는 것으로 생각되며 FSH 첨가에 의한 cumulus cell의 팽화의 결과 sperm capacitation과 수정률의 증진을 가져올 수 있고(Ball등, 1983) 부가적으로 소정자의 motility를 증진시키며(Bradley 와 Garbers, 1983), cumulus cell의 hyaluronic acid는 소정소상체 정자의 acrosome reaction을 촉진시키나(Handrow등, 1982) 사출정자에서는 그러한 효과가 없다고 보고되었다(Handrow등, 1986). 성숙·수정후 배의 발생능에 있어서는 중요한 요인으로 간주되고 있으며 특히 LH는 첨가함량의 증가와 더불어 발생능 증진을 가져왔다(Brackett, 1989). 그러나 granulosa cell의 coculture의 경우에는 gonadotropin의 무첨가에 의해서도 좋은 발생능을 보여준다(Fukui 와 Ono, 1989). Steroid중 특히 17 $\beta$ -estradiol은 male pronucleus growth factor의 촉진에 중요하다고(Moor등, 1980) 보고된 이후 일반적으로 배양액첨가물로 이용되고 있으며 배발생에 중요하다고 인정되고 있다.

Granulosa cell의 coculture는 성숙 및 수정에는 큰 차이가 없는 것으로 생각되나 발생능 증진에는 중요한 요인으로서 주장되고 있다(Fukui 와 Ono, 1989). 일반적으로 in vitro에서는 in vivo에서 보다 난포란의 gap junction의 감소가 빨리온다. 그로인해 gap junction을 통한 성숙에 필요한 물질이동의 저해는 세포질성숙의 불완전성을 가져올 수도 있다(Motlik 등, 1986). 그러나 coculture되는 granulosa cell에 의해 분비되는 물질이 gap junction을 vi vivo와 마찬가지로 정상성을 유지시켜 줌으로서 배발생에 중요한 요인이 된다고 보고되었고(Mattioli등, 1988), LH surge 이후의 큰 follicle에서 채취된 granulosa cell이 발생능증진에 주요하다고 생각된다. 소난포란의 체외성숙배양시 난구세포의 존재는 성숙률에는 크게 영향하지 않으나 수정률 및 전핵형성률이

향상되며(Fukui 와 Sakuma, 1980; Lenz등, 1983) cumulus cell과 ooplasm membrane의 gap junction은 물질운반의 중요한 통로로서 난구세포의 존재는 필수적이라 생각되며 체외성숙시 난구세포가 치밀하게 부착된 난자가 가장 좋은 발생능을 얻는다(Yang 와 Lu, 1999). 배양액의 drop에서 배양되어지는 난포란의 수는 성숙률과 수정에 영향을 하며(Leibfried-Rutledge등, 1989), MII까지 성숙된 난포란은 시간의 경과와 더불어 activation이 일어나므로 수정적기를 고려하지 않는 경우 발생능의 감소를 가져오기 때문에 적정조건을 정하여야 한다.

일반적으로 소의 난포란 채취시 선택되어지는 1~5mm의 범위에서는 성숙률에 큰 차이가 없으나 대체로 난포크기의 증가에 의해 성숙률이 증가한다(Leibfried 와 First, 1979). 또한 estrus cycle의 stage와 난포의 크기에 의해 분류된 난포란의 체외성숙후 수정률은 큰 차이를 보여주지 않았고(Leibfried-Rutledge 등, 1985) 배발생에도 큰 차이가 없었다(Tang 와 Lu, 1990).

일반적으로 조직배양에 이용되는 배양온도는 37°C이나 소나 돼지의 복강내 온도는 38~39°C를 유지하는 것으로 알려져 있으며 소의 경우 37°C와 39°C에서 배양된 난포란은 성숙률에서 차가 없으나 수정률은 39°C에서 증진을 가져왔다(Lenz등, 1983). 최근 소의 난포란 성숙·수정 및 배발생은 39°C에서 행하는 것이 일반적이다.

난소채취후 시간경과와 보존온도는 난포란의 질에 크게 영향하며(Shioya등, 1988) 일반적으로 채취후 2시간 이내 35~38°C의 온도에서 유지시키는 것이 요망된다. 또한 난포란 채취시 외부온도에 의한 온도 쇼크와(Moor 와 Crosby, 1985) 채취시 이용되는 배양액의 pH변화에 의한 세포의 alkalization은 난자의 질을 떨어뜨린다(Bagger등, 1987).

## 2. 체외수정의 요인

1981년 Brackett등에 의해 처음으로 소의 체외수정에 의한 송아지 생산에 성공한 이래 수 많은 체외수정란 이식에 의한 산자 생산이 보고되어져 왔고 다양한 방법의 체외수정기술이 개발되어 이용되어졌다. 초기의 연구에서는 사출정자를 이용해 왔으나 Parrish등(1986)에 의해 소 동결융해정자에 의한 수정방법이 보고된 이래 동결융해정자의 이용에 따른 편리함과 특정유전형질의 이용이란 측면에서 Table 1에서 제시

Table 1. In vitro fertilization of bovine oocytes using frozen-thawed sperm

Preparation of spermatozoa	Rates(%) of fertilization	References
TALF-Hepes + 10 $\mu$ g / ml Heparin Swim-up sperm separation	79	Parrish et al., 1986
BO medium + 10 $\mu$ g / ml Heparin 5mM Caffeine	68	Niwa and Ohgoda 1988
BO medium + 10mM Caffeine 0.1 $\mu$ M Ionophore A 23187	89	Aoyagi et al., 1988
BO medim + 10 $\mu$ g / ml Heparin 5mM Caffeine Percoll sperm separation	90	Park et al., 1990

된 동결융해정자의 체외수정방법이 개발되어 일반적으로 사용되고 있으며 반복성이 좋은 높은 수정률을 얻고 있다. 그러나 소의 체외수정에서의 문제점은 동일조건에서 처리된 정자의 수정률이 정자를 공시한 개체에 따라 9~75%의 상당한 차이를 보여줄 뿐만 아니라(Iritani, 1987) 배발생에도 상당한 차이를 가져온다(Eyestone 와 First, 1989; Shi등, 1990).

그러나 이러한 개체차에 의한 문제점은 우수한 개체를 선발하여 그 정자를 동결보존하여 이용함으로써 어느 정도 극복할 수 있으며(Niwa 와 Ohgoda, 1988), 정소상체 정자에 의한 체외수정의 결과 그러한 개체차가 없다는 것이 보고되어졌고(Goto등, 1989) 이러한 정소상체 정자를 이용하거나 동결보존후에 사용하는 것이 바람직하다고 생각된다.

### 3. 초기배 배양의 요인

포유동물의 초기배의 체외배양을 위해 각종의 배양액이 이용되고 있지만 일정시기에 발생이 정지하는 in vitro block이 나타나며 통상 소의 수정란은 체외배양에서 8~16세포기에서 발육이 정지된다. 체외성숙·수정된 소수정란의 비외과적 이식을 위해서는 상실배기 혹은 배반포기까지 배발생을 시켜야만 한다. 그래서 초기연구에서는 주로 면양이나 토끼난관 내에 이식하고 수일간 배양하여 배반포기까지 발육된 배를 얻었다. 그러나 이러한 방법은 상당히 불편하며 또한 난자회수의 어려움에 기인하는 손실률이 높아 비실용적이었다.

그러나 근년에 체외배양기술은 더욱 발전하여

Table 2. Stage of in vitro blocks to embryo development in cattle and pig

Species	Stage of block	Methods for overcoming block	Reference
Cattle	8 to 16 cell	coculture with	
		trophoblast vesicles	Camous et al., 1984
		oviductal cell	Eyestone et al., 1987
		granulosa cell	Critser et al., 1986
		cumulus cell	Goto et al., 1988
Pig	4 cell	delete pyruvate	Davis and Day, 1978
		coculture with oviductal cell	White et al., 1989
		organ culture in mouse oviduct	Krisher et al., 1989
		medium supplemented with oviductal fluid	Archibong et al., 1989

Table 2에서 나타나는 바와 같이 체내 또는 체외수정된 소 초기배는 다양한 somatic cell과 coculture함으로써 in vitro block을 극복하며 상실배나 배반포기까지 발육률이 높아졌고, 특히 세포수가 증가됨이 보고되었다(Eyestone 와 First, 1989).

이러한 결과는 지금까지 사용되어 온 배양액의 성분이 수정란의 발육에 충분치 않고 무엇인가 세포유래의 요인이 필요하다는 것을 시사해주며 금후 이들 요인에 대해 많은 연구가 필요하다고 사료되고 특히 난관과 관련하여 최근에 돼지의 1 cell stage난자를 적출한 mouse난관에 이식하여 organ culture를 함으로서 78.1%의 상실배기 난자를 얻는데 성공했을 뿐만 아니라(Krisher등, 1989) 난관액이 첨가된 배양액에서 수일간 배양하여 90% 이상의 배반포기 난자를 얻는데 성공하고 있다(Archibong등, 1989).

## 결 론

Table 3에서 보는 바와 같이 지금까지 연구결과에서 얻어진 난포란의 체외성숙, 체외수정, 양의 난관이식 및 배양과 수정란이식등의 효율성을 고려할 때 체외성숙및 수정단계에서는 어느정도 만족스런 결과를 얻고 있으나 1 cell stage에서 배반포기까지 발생

시킬 수 있는 효율성을 회수율과 함께 고려하면 40% 정도에 그치고 있다. 이러한 문제는 최근 somatic cell과의 coculture에 의해 많은 개선을 가져오고 있고(Ellington등 1989), 세포유래의 배발생 촉진물질에 대한 연구에 의해 많은 개선이 되리라 믿는다.

그러나 현재 가장 큰 제한은 난포란의 체외성숙이다. 소의 경우 체내·체외 성숙된 난포란을 동일조건으로 수정·배양한 결과 수정률에는 차이가 없으나(73%/70%) 융성전핵형성률에서는 차이가 나타나며

Table 3. Efficiency of each step involved in successful in-vitro fertilization of cow oocytes

	Efficiency (%)	% of original 100 oocytes
Oocyte maturation	80	80
Sperm penetration	80	64
2 Pronuclei	80	51
Sheep oviduct recovery	80	41
1 Cell-blastocyst	55	23
Transfer pregnancy	60	14
Calves	80	11

From First & Parrish(1987)

Table 4. Division of collected follicles corresponding to stage of the cycle, size and quality

Size of the follicle	Stage of the oestrous cycle								
	Early luteal stage			Late luteal stage			Follicular stage		
	NA	LA	A	NA	LA	A	NA	LA	A
2-5 mm(A)	5	9	18	27	58	50	24	67	86
5.1-8 mm(B)	13	29	26	45	41	33	6	16	33
8.1-11 mm(C)	14	17	7	20	16	9	6	9	11
> 11 mm(D)	7	4	3	23	31	7	11	17	9

From Kruij & Dieleman (1985)

(88%/69%), 배발생에 있어서는 많은 차이를 보여(40%/3%) 준다(Leibfried등, 1987). 이러한 결과는 체외성숙배양에 의해 핵의 성숙은 정상적으로 유기되나 융성전핵형성 및 배발생에 중요한 세포질성숙의 부전에 기인하는 것이다. 이는 난포세포의 성숙기구에 대한 많은 이해와 성숙 배양조건의 검토에 의해 어느정도 개선을 가져오리라 생각된다. 그러나 Table

4에서 보여지는 것과같이 도살장에서는 얻어지는 난소의 난포는 대부분 atretic follicle이며, 이러한 난포로부터 채취된 난포란을 선별할 수 있는 유일한 기준은 cumulus cell과 난세포질의 균질성을 현미경적 관찰에 의존하고 있기 때문에 난포란의 질을 가늠하는 객관적 방법의 개발은 정상적 발생능을 가진 배를 생산하기 위해 가장 중요한 과제라 생각된다.

## 참 고 문 헌

- Aoyagi, Y., Fujii, K., Irsazumi, Y., Furudote, M., Fukui, Y. and Ono, H. 1988. Effects of two treatments on semen from different bulls on in vitro fertilization results of bovine oocytes. *Theriogenology*, 30:973-985.
- Archibong, A. E., Petters, R. M. and Johnson, B. H. 1989. Development of porcine embryos from one and two cell stages to blastocysts in culture medium supplemented with porcine oviductal fluid. *Biol. Reprod.*, 41:1076-1083.
- Bagger, P. V., Byskov, A. G. and Christiansen, M. D. 1987. Maturation of mouse oocytes in vitro is influenced by alkalization during their isolation. *J. Reprod. Fert.*, 80:251-255.
- Ball, G. D., Leibfried, M. L., Lenz, R. W., Ax, R. L., Bavister, B. D. and First, N. L. 1983. Factors affecting successful in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. *Biol. Reprod.*, 28:717-725.
- Brackett, B. G., Younis, A. I. and Fayrerhosken, R. A. 1989. Enhanced viability after in vitro fertilization of bovine oocytes matured in vitro with high concentration of luteining hormone. *Fert. Steril*, 52(2):319-324.
- Bradley, M. P. and Garbers, D. L. 1983. The stimulation of bovin caudal epididymal sperm forward motility by bovine cumulus egg complexes in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 115:777-787.
- Camous, S., Heyman, Y., Mejiou, W. and Menezo, Y. 1984. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. *J. Reprod. Fert.*, 72:479-485.
- Crister, E. S., Leibfried-Rutledge, M. L., Eyestone, W. H., Northey, D. L. and First, N. L. 1986. Acquisition of developmental competence during maturation in vitro. *Theriogenology*. 25:150. Abstr.
- Davis, O. L. and Day, B. N. 1978. Cleavage and blastocyst formation by pig eggs in vitro. *J. Anim. Sci.*, 46:1043-1053.
- Ellington, J. E., Curney, E. W. and Foote, R. H. 1989. Comparison of media in an early bovine embryo and oviduct epithelial cell coculture system. *Theriogenology*. 31:189. Abstr.
- Eyestone, W. W., Vignieri, J. and First, N. L. (1987). Coculture of early bovine embryos with oviductal epithelium. *Theriogenology*. 27:228. Abstr.
- Eyestone, W. H. and First, N. L. 1989. Variation in bovine embryo development in vitro due to bulls. *Theriogenology*. 31:191. Abstr.
- First, N. L. and Parrish, J. J. 1987. In vitro fertilization of ruminants. *J. Reprod. Fert., Suppl.*, 34:151-165.
- Fukui, Y. and Ono, H. 1989. Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for in vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 86:501-506.
- Fukui, Y. and Sakuma, Y. 1980. Maturation of bovine oocytes cultured in vitro: Relation to ovarian activity, follicular size, and the presence or absence of cumulus cells. *Biol. Reprod.*, 22:669-673.
- Goto, K., Kajihara, Y., Kosaka, S., Koba, M., Nakanishi, Y. and Ogawa, K. 1988. Pregnancies after coculture of cumulus cells with bovine embryos derived from in vitro fertilization of in vitro matured follicular oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 83:753-758.
- Goto, K., Kajihara, Y., Koba, M., Kosaka, S., Nakanishi, Y. and Ogawa, K. 1989. In vitro fertilization and development of in vitro matured bovine follicular oocytes. *J. Anim. Sci.*, 67:2181-2185.
- Hanada, A. (1986). In vitro fertilization of bovine oocytes. *Consultant for Animal Science*. 258:10-15.
- Handrow, R. R., Lenz, R. W. and Ax, R. L. 1982. Structural comparisons among glycosaminoglycans to promote in acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 107:1326-1332.
- Handrow, R. R., Parrish, J. J. and Susko-Parrish, J. J. 1986. Effect of glycosaminoglycans on capacitation and the acrosome reaction of bovine and hamster sperm. *Biol. Reprod.*, 34(Suppl.1):3. Abstr.
- Iritani, A. 1987. A recent advances in embryology and embryo manipulation and their potential contribution

- to agriculture. Proc. 4th AAAP Anim. Sci. Cong, New Zealand, 126-130.
- Krisher, R. L., Petters, R. M., Johnson, B. H., Bavister, B. D. and Archibong, A. E. 1989. Development of porcine embryos from the one cell stage to blastocyst in mouse oviducts maintained in organ culture. *J. Exp. Zool.*, 249:235-239.
- Kruip, A. M. and Dieleman, S. J. 1985. Steroid hormone concentrations in the fluid of bovine follicles relative to size, quality and stage of the oestrus cycle. *Theriogenology*. 24:395-408.
- Leibfried, L. and First, N. L. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J. Anim. Sci.*, 48:76-86.
- Leibfried, M. C., Crister, E. S., Eyestone, W. H., Northey, D. L. and First, N. L. 1987. Development potential of bovine oocytes matured in vivo and in vitro. *Biol. Reprod.*, 36:376-383.
- Leibfried-Rutledge, M. L., Crister, E. S. and First, N. L. 1985. Fertilization potential of follicular oocytes classified by stage of cycle and size of follicle. *Theriogenology*, 23:753-759.
- Leibfried-Rutledge, M. L., Critser, E. S., Parrish, J. J. and First, N. L. 1989. In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*. 31:61-74.
- Lenz, R. W., Ball, G. D., Leibfried, M. L., Ax, R. L. and First, N. L. 1983. In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature-dependent processes. *Biol. Reprod.*, 29:173-179.
- Lu, K. H., MacDonnell, H. F. and Gordon, I. 1989. Birth of calves after in vitro maturation and fertilization of follicular oocytes. *Theriogenology*, 31:222. Abstr.
- Lu, K. H., Gordon, I., Gallaher, M. and McGovern, H. 1982. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilization of oocytes matured in vitro. *Vet. Rec.*, 121:259-260.
- Mattioli, M., Galeati, G., Bacci, M. L. and Seren, E. 1988. Follicular factors influence oocyte fertilizability by modulating intercellular cooperation between cumulus cells and oocyte. *Gamete Res.*, 21:223-232.
- Moor, R. M. and Crosby, Z. M. 1985. Temperature-induced abnormalities in sheep oocytes during maturation. *J. Reprod. Fert.*, 75:467-473.
- Moor, R. M., Polge, C. and Willadsen, S. M. 1980. Effect of follicular steroids on the maturation and fertilization of mammalian oocytes. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 56:319-335.
- Motlik, J., Fulka, J. and Flechon, J. E. 1986. Changes in intercellular coupling between pig oocytes and cumulus cells during maturation in vivo and in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 76:31-37.
- Niwa, K. and Ohgata, O. 1988. Synergistic effect of caffeine and heparin on in vitro fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology*. 30:733-741.
- Park, S. B., Shu, T. K. and Park, S. B. 1990. Developmental capacity of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. Proc. 5th AAAP Anim. Sci. Cong, Taiwan, in press.
- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., Leibfried-Rutledge, M. L., Critser, E. S., Eyestone, W. H. and First, N. L. 1986. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*. 25:591-600.
- Schroecker, A. C. and Eppig, J. J. 1984. The developmental capacity of mouse oocytes that matured spontaneously in vitro is normal. *Dev. Biol.*, 102:493-497.
- Shi, D. S., Lu, K. H. and Gordon, I. 1990. Effects of bulls on fertilization of bovine oocytes and their subsequent development in vitro. *Theriogenology*. 33:324. Abstr.
- Shioya, Y., Kawayama, M., Ueda, S., Saitou, S., Ota, H. and Hanada, A. 198. Effect of the time between slaughter and aspiration of follicles on the developmental capability of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *Jap. J. Anim. Reprod.*, 34:39-44.
- Staigmiller, R. B. and Moor, R. M. 1984. Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. *Gamete Res.*, 9:221-229.
- Tang, S. J. and Lu, K. H. 1990. Effects of different

- oestrus stages of ovaries and sizes of follicles on generation of bovine embryos in vitro. *Theriogenology*. 33:335. Abstr.
- Utsumi, H., Katoh, H. and Iritani, A. 1988. Developmental ability of bovine follicular oocytes matured in culture and fertilized in vitro. *Theriogenology*. 29:320. Abstr.
- White, K. L., Hehnke, K., Rickords, L. F., Southera, L. H., Thompson, D. L. and Wood, T. C. 1989. Early embryonic development in vitro by coculture with oviductal epithelial cells in pigs. *Biol. Reprod.*, 41:425-430.
- Xu, K. P., Greve, T., Callesen, H. and Hyttel, P. 1987. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 81:501-504.
- Yang, Y. B. and Lu, K. H. 1990. The influence of bovine oocyte type on in vitro fertilization and subsequent development in vitro. *Theriogenology*. 33:355. Abstr.