

한국 재래산양의 난포란의 회수와 체외수정에 관한 연구

박희성[†] · 이지삼 · 정장용
진주산업대학교 축산학과

Studies on Oocyte Collection and *In vitro* Fertilization in Korean Native Goats

H. S. Park[†], J. S. Lee and J. Y. Jung

Dept. of Animal Science, Chinju National University, Chinju 660-758, Republic of Korea

SUMMARY

This study was undertaken to access the effects of collection method, room temperature at oocyte recovery and culture media on the oocyte quality, fertilization and cleavage rates of *in vitro* matured and fertilized oocytes of Korean native goats.

Ovaries obtained from a slaughterhouse were transported to the laboratory and were divided into 2 groups. One group of ovaries was maintained at 30 to 35°C of the room temperature and another group was remained at 20 to 25°C during oocyte recovery. The oocytes were recovered by follicle aspiration, slicing and aspiration+slicing methods from 3 groups of follicles according to size; <2 mm, 2 to 6 mm and >6 mm. The matured oocytes were inseminated with buck epididymal spermatozoa at a concentration of $3\sim 3.5\times 10^6/\text{ml}$ and fertilization was identified when 2 pronuclei were present in the cytoplasm.

Although the recovery rate per ovary obtained by the combination of follicle aspiration + slicing(19.6 ± 2.2) method was higher than aspiration(11.7 ± 1.1) and slicing(14.8 ± 1.8) collection, optimal recovery according to oocyte grades resulted from ovarian slicing compared to aspiration or combined methods($P<0.05$). However, no significant differences were found in the mean number(2.5 ± 1.8 ; 3.3 ± 3.3 ; 2.9 ± 2.4) and the proportion of favorable oocytes(Grades I, II and III) recovered(31.6% , 36.0% , 36.4% ,) according to follicle size(<2 mm; 2 to 6 mm; >6 mm). Fertilization rate was 60.0%, 67.7%, 60.6% and 56.4% and the proportion of embryos/zygotes was 11.1%, 7.1%, 5.0% and 2.8% in 20~25°C/BO, 30~35°C/BO, 20~25°C/TALP and 30~35°C/groups, respectively.

(Key words : oocyte, aspiration, slicing, fertilization, goat)

서 론

오늘날 수정란이식 기술은 가축의 개량 또는 증식의 한 방법으로서 널리 이용되고 있으나, 우리나라 재래산양은 다른 가축과는 달리 개량이나 증

식에 응용되고 있지 못한 실정이다. 능력이 우수한 개체의 미성숙 난포란을 회수하여 체외 성숙, 수정 및 이식하여 산자 생산이 정립이 되면 재래산양의 개량과 증식에 크게 기여할 수 있을 뿐만 아니라 수정란의 생리현상 규명과 나아가 형질전환동물의 생산, 복제동물의 생산에 있어서 기초 동물로서도

[†] Correspondence

매우 유용하게 사용되어질 수 있을 것이다.

산양의 체외수정에 관한 연구는 Song과 Iritani(1987, 1988)가 과배란 처리한 자아넨 미성숙산양의 난포로부터 난포란을 채취하여 체외성숙과 정소상체 미부정액을 이용하여 체외수정을 실시한 바 있다. 이후에 산양의 체외수정에 관한 연구는 과배란처리 후 미성숙 난자의 이용(Sakkas 등, 1989), 정자의 농도(Ling 등, 1992), 성숙란의 수정율(Martino 등, 1993; Mogan 등, 1997), 체외수정시의 배양액(Jufen 등, 1991; Younis 등, 1991), 체외배양액에 혈청의 첨가 여부(Pawshe 등, 1996) 및 온도에 따른 수정율(Smedt 등, 1992) 등이 있다. Wahid 등(1992)은 면양에서 난포란의 회수방법에 관한 연구에서 흡입방법과 세절방법을 실시하였을 때 세절방법이 월등히 높았다고 하였다.

그러나 우리 나라 재래산양의 체외성숙, 체외수정 및 체외수정란의 체외발달에 관한 연구는 거의 없는 실정이며, 앞으로 보다 체계적인 연구가 수행되어야 할 것이다.

본 연구는 한국재래산양의 체외수정에 있어서 체외수정기법의 체계를 확립하고자 도축되는 재래산양의 난소를 채집하여 난포로부터 난포란의 회수와 체외수정 및 체외발달을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 난소의 채취

실험에 사용된 난소는 도살 직후 난소를 채취 100units/ml penicillin G와 50 μ g/ml streptomycin sulfate가 첨가된 30~35°C의 생리식염수에 담아 1~2시간내에 실험실로 운반하였다. 운반된 난소는 지방조직 등을 제거한 후 항생제가 첨가된 30~35°C의 생리식염수로 3~4회 세척하여 실험에 사용하였다.

2. 난포란의 회수

채취한 난소는 항생제(100units/ml penicillin G + 50 μ g/ml streptomycin sulfate)가 첨가된 멸균 생리식염수로 3~4회 세척한 후 난포란의 회수는 1) 난소의 난포에서 흡입하는 방법, 2) 난소를 세절하는 방법, 3) 흡입후 다시 세절하는 방법으로 구분

하여 회수하였다. 또한 난포란의 회수시 난자의 모든 조작은 20~25°C와 30~35°C로 구분하여 실시하였다.

먼저 흡입법은 18G needle이 부착된 10ml 주사기로 기본배양액(TCM-199 + 5% FBS) 소량을 흡입 후 난포액과 난포란을 흡입하는 방법으로 미성숙 난포란을 채취하였다. 흡입된 난포액은 5% CO₂ 98~99% 습도 39°C 배양기내에서 5~10분간 정치시킨 후 상층액을 버리고 하층액만을 취하여 실제 현미경하에서 난포란을 회수하였다. 세절법은 난소의 표면에 부착된 항체, 대란포, 혈포 및 불필요한 조직을 제거를 하여 기본 배양액이 담겨 있는 85×15 mm dish에 난소를 반으로 절제하여 펼친 다음 난소 표면을 미세하게 세절하여 회수하였으며, 흡입후 세절법은 흡입한 난소를 다시 상기의 방법으로 세절하여 난포란을 회수하였다.

3. 난포란의 등급분류

흡입법, 세절법, 흡입 후 세절법에 의하여 회수한 난포란은 기본 배양액으로 3~4회 세척한 후 난포란의 등급분류는 난구세포의 부착정도와 세포질의 충실도에 따라 Wiemer 등(1991)의 소 난포란의 등급분류 방법에 준하여 4등급으로 분류하였다. 즉, 난구세포가 4층이고 세포질이 균일한 것을 Grade I, 난구세포가 2~3층은 Grade II, 난구세포가 1층이고 부분적으로 나화된 것을 Grade III, 그리고 나화되고 퇴화된 것은 Grade IV등급으로 분류하여 난자의 회수율을 조사하였다.

4. 난포란의 체외성숙

회수된 난포란은 TCM-199(Sigma, USA)배양액을 기본배양액으로 하여 10% fetal bovine serum (FBS), 10% goat serum, 10 μ g/ml luteinizing hormone(LH), 35 μ g/ml follicle stimulating hormone (FSH)와 1 μ g/ml estradiol 17- β 를 첨가하여 사용하였으며, 체외성숙용 배양액은 pH 7.4, 삼투압을 285mOsm/kg으로 조정하여 사용하였다. 체외성숙용 배양액을 4-Well dish(Nunc)에 각각 1ml 씩 분주를 하여 39°C 5% CO₂ incubator에서 약 20시간 전 배양을 실시하여 평형을 유도한 후 Well 당 15~20개의 난포란을 넣어 39°C 5% CO₂ incubator에

서 24시간 체외성숙을 실시하였다.

Goat serum의 제조는 재래산양의 혈액을 채혈하여 4°C 냉장고에 약 12시간 보관 후 1500×g로 원심분리를 실시하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 56°C water bath에서 30분간 비동화(inactivation) 처리를 하였으며, 0.22 μm millipore filter로 여과하여 멸균한 후 냉동보관하면서 사용하였다.

5. 정자의 처리 및 체외수정

1) 수정용 배양액의 준비

체외수정용 기본 배양액은 B.O와 TALP를 사용하였다. 세척용 B.O 및 TALP 용액은 dish에 소적을 만들어 paraffin oil로 피복하여 CO₂배양기 내에서 전 배양을 실시하였다. 체외수정용 B.O용액은 10 μg/ml heparin, 5 mM caffeine 및 5mg/ml BSA를 첨가하여 사용하였고, Fert-TALP용액은 0.12g BSA를 첨가하여 수정용 배양액으로 소적을 만들어 paraffin oil로 피복한 다음 5% CO₂, 98~99% 습도, 39°C incubator내에서 24시간 전 배양을 유도하였다.

2) 정액의 준비 및 수정

체외수정을 위한 정자의 준비는 도축장에서 도살되는 재래산양의 정소로부터 수집한 정소상체미부를 채취한 후 실험실로 운반하여 항생제(Penicillin G 100units/ml + Streptomycin 50 μg/ml)가 첨가된 생리식염수로 3~4회 세척한 다음 정소상체미부의 표피를 절개하여 농후정자를 채취하여 사용하였다. 정자의 처리는 39°C 5% CO₂ incubator에서 1시간 정치한 후 하층액만을 취하여 200×g 10분간 원심분리를 실시하여 39°C 5% CO₂ incubator에서 다시 45분간 정치시켜 활력이 양호한 상층액 정자만을 취하여 사용하였다.

체외성숙이 완료된 난포란은 수정용 기본 배양액으로 3~4회 세척한 다음 수정용 소적에 15개 전후의 난포란을 넣고 전처리가 끝난 정자를 3~3.5×10⁶ sperms/ml 농도로 조정하여 수정용 소적에 넣어 약 12시간 동안 체외배양을 실시하여 수정을 유도하였다.

6. 수정란의 체외배양

체외수정이 이루어진 수정란은 기본배양액(TCM-199 + 5% FBS)으로 3~4회 세척하여 난구세포를 제거한 다음 배양용 dish에 10~15개의 수정란을 넣어 배양을 실시하였다. 48시간마다 신선한 배양액(TCM-199 + 10% FBS)으로 교환을 하면서 수정 후 5~6일까지 체외배양을 실시하여 후기 배로의 발달을 유도하였다.

7. 통계학적 분석

본 실험에서 얻어진 결과들의 통계학적 분석은 SAS package를 이용하여 각 요인의 유의성 검증을 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 난포란의 채란방법에 따른 회수율

채취한 난소의 난포(2~6 mm)에서 난포란을 흡입법, 세절법 및 흡입 후 세절법으로 채란을 실시하여 회수방법에 따른 회수율과 난구세포의 분포 정도에 따라서 등급별(grade I~IV)로 분류한 성적은 Table 1 및 Fig. 1에서 보는 바와 같다.

난포란의 회수방법별로 각각 12개씩의 난소로부터 회수한 난포란의 수는 흡입법이 140개, 세절법 117개 및 흡입 후 세절법이 235개였으며, 난소당 난포란의 회수율은 흡입후 세절법이 19.6±2.2개로서 흡입법(11.7±1.1)과 세절법(14.8±1.8)에 비하여 유의적(P<0.05)으로 높았다. 회수한 난포란의 등급은 Grade I 및 II(0.6%)는 거의 없었으며, Grade III(14.0~23.7%)과 Grade IV(72.3~85.1%)는 회수방법간에 유의적(P<0.05)인 차이는 있었으나, 대부분이 Grade III 및 IV 등급의 난포란이었다.

Wahid 등(1992)은 면양에서 도축장으로부터 채집한 난소로부터 흡입법과 세절법으로 회수하였을 때 난소당 회수율은 4.0 및 6.4개였다고 하였다. 회수한 난포란의 등급도 난구세포층이 3층 이상, 3층 이하 및 난구세포층이 없는 것으로 구분하여 회수하였을 때 흡입법은 37.9, 23.7 및 38.4%였으며, 세절법은 74.9, 11.5 및 13.6%로서 흡입법보다는 세절법이 유의적(P<0.05)으로 높은 등급의 난

Table 1. Effects of collection methods on yield(mean±SEM) and grade of goat follicular oocytes

Method of collection	No. of ovary	No. of oocytes recovered	No. of oocytes recovered per ovary	No. of oocytes classified by grade(%)			
				Grade I	Grade II	Grade III	Grade IV
Aspiration	12	140	11.7 ^c ±1.1	0(0.0) ^a	2(1.4) ^a	25(17.9) ^{ab}	113(80.7) ^{ab}
Slicing	12	177	14.8 ^b ±1.8	1(0.6) ^a	6(3.4) ^a	42(23.7) ^b	128(72.3) ^b
Aspiration +slicing	12	235	19.6 ^a ±2.2	0(0.0) ^a	2(0.9) ^a	33(14.0) ^a	200(85.1) ^a

*Values with same superscripts in the same column were significantly(P<0.05) different.

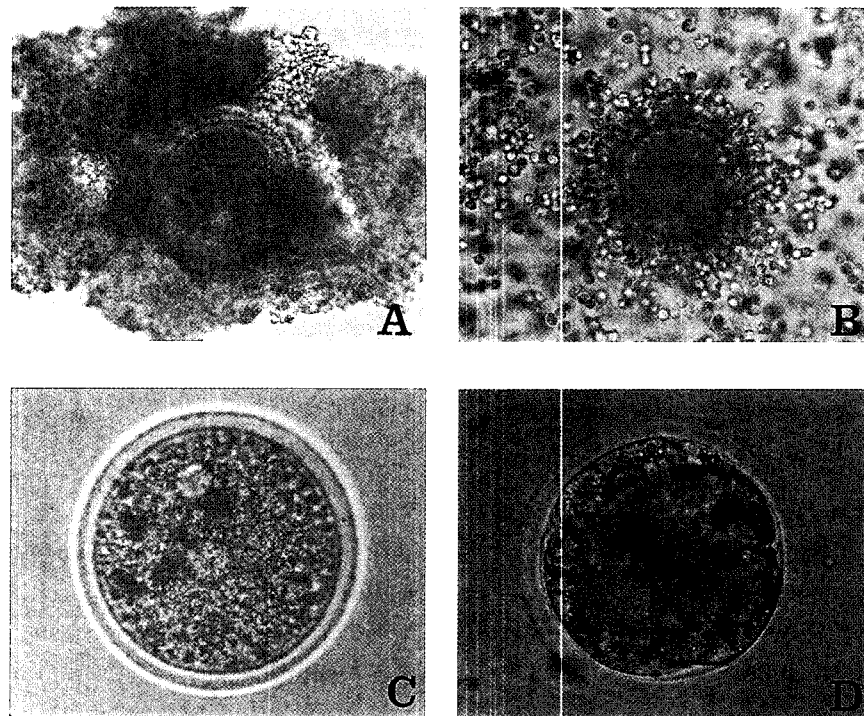


Fig. 1. Recovery oocyte and *in vitro* fertilized embryos in goat

- A) Recovered follicular oocyte, B) *in vitro* matured oocyte
C) *in vitro* fertilized oocyte, D) *in vitro* fertilized 8-cell embryo

포란을 회수하였다고 보고하였다. 박 등(1999)은 돼지의 난소에서 난소당 난포란의 회수율은 흡입법(37.5개)과 세절법(50.8개)에 비하여 흡입 후 세절법(103.5개)이 유의적(P<0.05)으로 회수율이 높았다고 하였으며, 회수한 난포란의 등급은 본 연구에서와 같이 1~2등급은 전체적으로 매우 낮았다고 보고하였다. Lonergan 등(1991)도 소에서 흡입

법과 세절법으로 난포란을 회수하였을 때 66.4%와 92.2%로서 세절법이 흡입법보다는 높은 회수율을 얻었으며, 회수한 난포란의 등급도 세절법이 양호하다고 보고하였다.

이상의 결과를 볼 때 산양에 대한 보고가 없어서 직접적으로 비교하기는 어려우나, 전체적으로 보면 흡입법보다는 세절법 또는 흡입한 난포란을

다시 세절하여 사용하면 보다 많은 난포란을 회수할 수 있다는 것은 본 연구 결과와 대체적으로 일치한다.

2. 난포의 크기에 따른 회수율

난소의 난포를 2 mm 이하, 2~6 mm 및 6 mm 이상으로 각각 크기를 구분하여 흡입법으로 난포란을 채란하여 난포의 크기에 따른 난포란의 회수율과 난포란의 등급은 Table 2에서 보는 바와 같다.

각각 15개의 난소에서 2 mm 이하, 2~6 mm 및 6 mm 이상 난포로부터 난포란의 회수율은 2.53 ± 1.8 , 3.33 ± 3.2 및 2.93 ± 2.4 개로서 난포란의 크기에 따른 회수율은 유의적인 차이가 없었다($P < 0.05$).

박 등(1999)은 돼지에서 난포의 크기를 2 mm 이하, 2~5 mm 및 5 mm 이상으로 구분하여 난포란을 회수하였을 때 회수율은 43.7, 27.8 및 20.4%가 회수되었으며, 난포란의 등급은 2~5 mm 이하의 이하의 난포에서도 높은 등급의 난포란이 회수되었다고 보고하였다. Smedt 등(1992)은 2~6 mm 이하의 난포에서 채취한 난자는 86%가 성숙이 이루어지나, 2 mm 이하에서는 17%만 성숙이 이루어

진다고 하여 난포의 크기에 따라서 성숙율에도 영향을 미친다고 하였다.

이상의 결과를 볼 때 난포의 크기에 따른 난포란의 회수율은 일반적으로 다른 포유동물에서와 같이 2~6 mm 사이의 난포에서 난포란을 회수하는 것이 바람직할 것으로 생각된다.

3. 채란시 온도에 따른 수정율과 분할율

난소로부터 난포란의 회수시 실험실내 온도와 수정용 배양액에 따른 체외성숙란의 수정율과 분할율은 Table 3 및 Fig. 1에서 보는 바와 같다.

수정용 배양액을 B.O용액을 사용하고 난포란의 채란시 온도를 20~25°C와 30~35°C로 하였을 때 수정율은 60.0 및 67.7%였으며, 이때 분할율도 11.1 및 7.1%로서 이들간에 유의적인 차이가 없었다. TALP배양액에서도 60.6%(20~25°C)와 56.4%(30~35°C)의 수정율을 보였다($P > 0.05$). 체외수정이 이루어진 난자의 분할율도 B.O용액에서 11.1%(20~25°C)와 7.1%(30~35°C)였으며, TALP용액도 20~25°C와 30~35°C에서 5.0 및 2.8%로서 채란시의 온도간에 유의적인 차이가 없었다. 또한 BO

Table 2. Classified follicular oocytes collection from goat ovarian follicle

Size of follicles	No. of ovary	No. of oocytes recovered	No. of oocytes recovered per ovary*	No. of oocytes classified by grade(%)*			
				Grade I	Grade II	Grade III	Grade IV
2mm >	15	38	2.53 ± 1.8^a	0(0.0)	1(2.6)	11(29.0)	26(68.4)
2~6mm	15	50	3.33 ± 3.2^a	0(0.0)	1(2.0)	17(34.0)	32(64.0)
6mm <	15	44	2.93 ± 2.4^a	0(0.0)	2(4.6)	14(31.8)	28(63.6)

*Values with same superscripts in the same column were significantly($P < 0.05$) different

Table 3. *In vitro* fertilized and cleaved rate goat oocytes in different recovery temperature

Fertilized media	Recovery temperature	No. of matured oocytes	No. of fertilized oocytes(%)	No. of cleaved(%)
B.O	20~25°C	30	18(60.0)	2(11.1)
	30~35°C	62	42(67.7)	3(7.1)
TALP	20~25°C	33	20(60.6)	1(5.0)
	30~35°C	62	35(56.4)	1(2.8)

*There are not significantly different on the same column($P > 0.05$).

용액과 TALP용액간에도 채란시의 온도에 관계없이 유의적인 차이가 없었다($P>0.05$).

Martino 등(1993)은 수정술에 있어서 난포란의 회수가 미성숙산양(42.85%)과 성숙산양(54.06%)에 따라서 수정율이 다르다고 하였으며, Jufen 등(1991)도 mDM수정용 배양액에 정자농도를 1×10^6 ml로 조정하여 체외수정을 실시하였을 때 60%의 수정율을 보였다고 하였다. 송과 Iritani (1998)는 mKRB배양액으로 정자농도를 $4 \sim 5 \times 10^7$ /ml에서는 0%의 수정율을 보였으나, $40 \sim 50 \times 10^7$ /ml농도에서는 50%의 수정율을 보여 정자의 농도가 수정술에 직접적인 영향을 미친다고 보고하였다. Ling 등(1992)은 BO배양액으로 1×10^6 /ml농도로 체외수정을 실시하였을 때 70%가 수정되었다는 결과는 본 연구결과 대체적으로 유사한 결과이다. Younis 등(1991)은 mDM, mTALP 및 mH-M199 배양액으로 체외수정을 실시하였을 때 각각 56.7, 26.7 및 35.7%의 수정율을 보였으며, 이들 체외수정란의 분할율에 있어서도 각각 33.3, 10.0 및 10.7%로서 체외수정시 사용하는 배양액에 따라서 차이를 보인다고 보고하였다. Pawshe 등(1996)은 Ham's F-12배양액에 10% EGS(estrous goat serum)를 첨가하였을 때 36.66%의 분할율을 보였으나, EGS를 첨가하지 않았을 때는 전혀 분할이 이루어지지 않았다고 보고하였다.

Smedt 등(1992)은 채란시 온도가 20°C 에서는 80%가 수정이 이루어지나 이중 29%가 polyspermy라고 하였다. 또한 실온이 20°C 에서는 수정란중 33%가 염색체 이상을 유발하며, $30 \sim 35^\circ\text{C}$ 에서는 6%정도가 염색체 이상을 유발하여 채란시의 실내온도가 체외수정과 체외배양에 많은 영향을 미친다고 하였다. 체외발달율은 2~4세포기까지 발달이 58%이고 5~6세포기로의 발달율은 겨우 1%정도라고 보고하였다. 또한 2~6 mm 이하의 난포에서 채취한 난자는 86%가 성숙이 이루어지나, 2 mm 이하에서는 17%만 성숙이 이루어진다고 하여 난포의 크기에 따라서 성숙율의 차이가 있다고 보고하였다.

이상의 결과로 미루어볼 때 산양의 체외수정란의 생산에 있어서 아직까지 체외수정 및 체외발달율이 매우 낮을 뿐만 아니라 성적도 연구자에 따

라서 많은 차이를 보이고 있어 앞으로 재래산양에 대한 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

적 요

본 연구는 재래산양에 있어서 체외수정란의 생산기법을 확립하고자 도축되는 개체로부터 채집한 난소의 난포로부터 흡입법, 세절법, 흡입 후 세절법으로 난포란을 채취하여 난포의 크기에 따라 등급별로 분류를 하여 회수율을 조사를 하였으며, 회수한 난포란은 수정용 배양액으로 체외수정을 실시하여 수정율과 분할율을 조사하였다.

난포란의 회수방법별로 각각 12개씩의 난소로부터 회수한 난포란의 수는 흡입법이 140개, 세절법 117개 및 흡입 후 세절법이 235개였으며, 난소당 난포란의 회수율은 흡입후 세절법이 19.6 ± 2.2 개로서 흡입법(11.7 ± 1.1)과 세절법(14.8 ± 1.8)에 비하여 유의적($P<0.05$)으로 높았다. 회수한 난포란의 등급은 1 및 2등급(0.6%)은 거의 없었으며, 대부분이 3 및 4등급의 난포란이었다($P<0.05$). 각각 15개의 난소에서 2 mm 이하, 2~6 mm 및 6 mm 이상 난포로부터 난포란의 회수율은 2.53 ± 1.8 , 3.33 ± 3.2 및 2.93 ± 2.4 개로서 난포란의 크기에 따른 회수율은 유의적인 차이가 없었다($P>0.05$).

수정용 배양액을 B.O용액을 사용하고 난포란의 채란시 온도를 $20 \sim 25^\circ\text{C}$ 와 $30 \sim 35^\circ\text{C}$ 로 하였을 때 수정율은 60.0 및 67.7%였으며, 이때 분할율도 11.1 및 7.1%로서 이들간에 유의적인 차이가 없었다. TALP배양액에서도 60.6%($20 \sim 25^\circ\text{C}$)와 56.4%($30 \sim 35^\circ\text{C}$)의 수정율을 보였다. 체외수정이 이루어진 난자의 분할율도 B.O용액에서 11.1%($20 \sim 25^\circ\text{C}$)와 7.1%($30 \sim 35^\circ\text{C}$)였으며, TALP용액도 $20 \sim 25^\circ\text{C}$ 와 $30 \sim 35^\circ\text{C}$ 에서 5.0 및 2.8%로서 채란시의 온도간에 유의적인 차이가 없었다.

참고문헌

- Jufen Q, Zhiming H, Yong Z and Jianchen W. 1991. *In vitro* capacitation of ejaculated spermatozoa and *in vitro* fertilization in dairy goats. Theriogenology, 35(1):219(abstract).

- Ling L, Jufen Q and Yong Z. 1992. *In vitro* fertilization of goat ovarian oocytes. *Theriogenology*, 37(1):247(abstract).
- Lonergan P, Vergos E, Kinis A, Sharif H, Gallagher M and Gordon I. 1991. The effect of recovery on the type of bovine oocyte obtained for *in vitro* maturation. *Theriogenology*, 35(1): 231(abstract).
- Martino A, Mogas T, Palomo MJ and Paramio MT. 1993. Effect of oocyte and granulosa cell source used during *in vitro* maturation on *in vitro* fertilization of goats oocytes. *Theriogenology*, 39:265(abstract).
- Mogans T, Palomo MJ, Izquierdo MD and Paramio MT. 1997. Morphological events during *in vitro* fertilization of prepubertal goat oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology*, 48:815-829.
- Pawshe CH, Palanisamy A, Taneja M, Jain SK and Totey SM. 1996. Comparison of various maturation treatments on *in vitro* maturation of goat oocytes and their early embryonic development and cell numbers. *Theriogenology*, 46: 971-982.
- Sakkas D, Batt PA and Cameron AWN. 1989. Development of preimplantation goat (*Capra hircus*) embryos *in vivo* and *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 87:359-365.
- Smedt DV, Crozet N, Ahmed-Ali M, Martino A and Cognie Y. 1992. *In vitro* maturation and fertilization of goat oocytes. *Theriogenology*, 37:1049-1060.
- Song HB and Iritani A. 1987. Studies on *in vitro* maturation of follicular oocytes in the immature goats. *Korean J. Anim. Sci.*, 29(7):303-309.
- Song HB and Iritani A. 1988. *In vitro* fertilization of goat follicular oocytes with epididymal spermatozoa. *Korean J. Anim. Sci.*, 30(11) 636-642.
- Wahid H, Gordon I, Sharif H, Lonergan P, Monaghan P and Gallagher M. 1992. Effect and efficiency of recovery methods for obtaining ovine follicular oocytes for *in vitro* procedures. *Theriogenology*, 37(1):318(abstract).
- Wiemer KE, Watson AJ, Polanski V, McKenna AI, Fick GH and Schultz GA. 1991. Effects of maturation and co-culture treatments in the developmental capacity of early bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 30:330-338.
- Younis AI, Zuelke KA, Happper KM, Oliveira MA and Brackett BG. 1991. *In vitro* fertilization of goat oocytes. *Biol. Reprod.*, 44:1177-1182.
- 박병권, 박영석, 이미영, 이성호, 김덕환, 이종완, 권건오, 김인봉, 김형태. 1999. 난포의 크기 및 난포란의 형태가 돼지 난포란의 체외성숙에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지*, 14(3): 177-184.
- 박성원, 홍승표, 진종인, 이지삼, 정장용, 박희성. 1999. 돼지 난포란의 체외수정 및 체외발달에 관한 연구. *한국수정란이식학회지*, 14(3):185-194.

(접수일: 2000. 11. 20 / 채택일: 2000. 12. 21)