

과배란 처리에 있어 성감별 정액을 이용한 한우 체내 수정란의 생산 효율

전향아^{1,2a} · 염규태^{1a} · 박해금¹ · 김성우¹ · 김 현¹ · 김영신¹ · 성환후¹ · 조영무¹ · 조재현³ · 고응규^{1†}

¹농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원시험장, ²전남대학교 농업생명과학대학, ³경상대학교 수의과대학

Efficiency of *In Vivo* Embryo Production following Superovulation with Sex-sorted Semen in Hanwoo (Korean Native Cattle)

Hyang-A Jeon^{1,2}, Gyu-Tae Yeom¹, Hae-Geum Park¹, Sung-Woo Kim¹, Hyun Kim¹, Young Sin Kim¹, Hwan-Hoo Seong¹, Young Moo Cho¹, Jae-Hyeon Cho³ and Yeoung-Gyu Ko^{1†}

¹Animal Genetic Resources Station, National Institute of Animal Science, RDA, Namwon 590-832, Korea

²Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

³Institute of Life Science, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

ABSTRACT

Sexed semen is commonly used for the production of calves of the desired gender. Gender selection is important in animal production industries. For example, female cattle are required for the dairy industry while males are preferred in the beef cattle industry. The present study was to assess the *in vivo* embryo production efficiency using the semen separated according to sex during superovulation in Hanwoo. Seventy Hanwoo donor cows were flushed on day 7 of estrus cycle with same FSH and artificial insemination by the same technicians. Embryos were recovered on 7 days after the third insemination by flushing the uterus with embryo collection medium. KPN semen straws used artificial insemination contained 20 million sperm (total number 60 million per donor). Sex-sorted semen straws contained 4 million sperm (total number 12 million per donor). The results obtained were as follows: No differences were observed in the efficiency of superovulation rates on KPN semen 87%, and sexed semen 100%, respectively. The mean numbers of total embryos are each 12.58 ± 8.31 and 13.25 ± 7.86 . The mean numbers of transferable embryos, sexed semen were significantly lower than KPN semen (3.75 ± 1.98 vs. 8.23 ± 6.07 , $P < 0.05$). The rates of unfertilized embryos from superovulation using sexed semen were significantly higher than KPN semen (50% vs. 15%, $P < 0.05$). The rate of degenerated 2-cell embryos from sexed and KPN semen was 60.87% and 11.11%, respectively ($p < 0.05$). In conclusion, these results indicate that superovulation using sexed semen was useful, but efficient embryo production was important to reducing the damage caused by the Flowcytometer-based sperm sorting procedure.

(Key words : sexed semen, superovulation, *in-vivo* embryo, Hanwoo)

서 론

축산업의 생산성을 높이고, 능력 개량과 우수한 개체의 조기 증식을 위하여, 최근 성 감별 정액과 수정란 이식으로 송아지의 성별을 선택하여 생산할 수 있게 되었다. 국내에서는 체내 수정란과 체외 수정란을 이용하여 biopsy 방법에 의하여 적당량의 할구를 분리 후 PEP-PCR(Primer Extension Pre-amplification-PCR) 방법(Chrenek 등, 2001)과 LAMP(Loop-mediated isothermal amplification) 방법(Mori 등, 2001)을 이용하여 수정란의 성 판별을 실시하고 있으나, 성 판별을 위해서 biopsy

된 수정란과 핵 이식된 수정란의 경우에는 투명대의 소실 또는 세포질 일부의 손상으로 정상적인 수정란과 비교할 때 동결·용해 후의 생존율이 낮다(조 등, 2005). 최근에는 정자의 성 분리는 성 염색체의 발견 이후 지속적으로 발달되어 왔다. 1982년에 Flowcytometer를 이용하여 흑취(Vole) 정자의 성 분리가 최초로 성공하였다(Pinkel 등, 1982). 하지만, 초기의 성 분리는 오로지 X정자와 Y정자의 분리에만 초점이 맞춰져 있어, 정자 막 투과가 되지 않는 형광 dye를 이용하였기 때문에 정자 막의 파괴가 불가피했다. 이후, Johnson 등(1989)이 정자 막의 투과가 가능한 Hoechst 33342 염색을 이용함으로써 살아있는

* This work was carried out with the support from the Agenda Program (No. PJ010293)" Rural Development Administration, Republic of Korea

^a These authors contributed equally to this work.

[†] Correspondence : kog4556@korea.kr

정자의 성 분리에 성공하였고, Morrell 등(1988; 1989)이 최초로 성 분리된 정자를 이용한 소와 토끼의 산자 생산에 성공하였다. 이 시기의 Flowcytometer를 이용한 성 분리 속도는 대략 초당 100개로, 인공수정에 이용하고자 하는 개수인 1,000만 개의 정자를 분리한다고 했을 때, 하루가 넘는 시간을 필요로 하기 때문에 효율이 높다고 할 수 없었다. 이후, 특수한 형태의 노즐을 사용하는 등 장비의 고안으로 정자의 성 분리 속도는 초당 6,000개 정도까지 그 효율성이 증가하였다(Johnson 등, 2000). 현재 미국에서는 성 분리가 이루어진 인공수정용 젓소 동결 정액을 보급하는 사업을 추진해 오고 있으나, 아직은 그 효율성이 낮아 일반 동결 정액과 같은 상용화는 이루어지지 않은 것으로 알려져 있다(농림수산식품부, 2012). Tubman 등 2004년의 연구에서는 성 분리 정자를 이용한 인공수정으로 인하여 태어난 산자의 경우, 유산, 사산, 임신 기간, 난산, 생시 체중, 이유 체중은 일반 정액을 이용하여 생산된 산자와 비교하였을 때, 그 차이가 없다고 하였다. 하지만 성 분리 정자를 이용한 체외 수정란 생산에 있어서는 배 발달율이 낮고, 수정란의 분열이 쉽게 일어나며(Guthrie 등, 2002), 생산되는 산자 수가 적다고 보고하였다(Johnson 등, 1989). 이처럼 Flowcytometer를 이용하여 성 분리된 정자는 성 분리가 수정란의 발달과 quality에 부정적인 영향을 미치고 있으나, 그 활용성은 점점 증가하고 있다. 본 연구에서는 한우 과배란 처리 과정에서 성 분리된 정액을 이용하여 인공수정을 하였고, 이식 가능한 수정란의 생산 효율과 회수되는 수정란의 발달 단계 등을 비교하였다.

재료 및 방법

1. 공시축

본 연구는 국립축산과학원 가축유전자원시험장에서 보유하고 있는 개체 중 번식 장애가 없고, 형질이 우수한 한우 79두를 실험에 공시하였으며, 과배란 처리 과정 중 인공수정을 함에 있어 대조구 71두는 KPN(Korean Proven Bull Number) 정액을 이용했고, 처리구 8두는 성 감별 정액을 이용하였다. 공시된 한우의 사양 관리는 가축유전자원시험장 사양 표준에 따라 실시하였다. 연구에 사용된 동물 관리 및 절차는 국립축산과학원 동물복지위원회(Suwon, Korea)의 승인(승인번호: 2014-078)을 얻었다.

2. 정자의 성 분리

정자의 성 분리는 가축유전자원시험장에 보유 중인 최소 1두의 원정액을 채취하여 (주)한국섹싱바이오텍에 의뢰 제조하였다. 성 감별은 MoFlo XDP Cell Sorter 장비를 이용하였으며, 분리 속도는 1초당 3~5만 개의 속도로 분리하였다. 실험에 공시된 정액의 총 정자 수는 스트로 당 400만 개의 동결 정

액을 이용하였다. 구체적인 성 분리 방법은 Tubman 등(2004)의 방법에 준하여 분리하였다.

3. 공란우의 과배란 처리 및 인공수정

시험축은 공란우의 발정 주기와 관계없이 0일째 Progesterone Releasing Intravaginal Device(CIDR-plus, Inter-Ag, New Zealand)를 질 내 삽입하고, 4일째부터 FSH(Antorin, 2AU=1 ml, Kawasaki Mitaka, Japan)를 28 AU(1 AU=0.5 ml)를 12시간 간격으로 4일간 절감 주사하였으며, CIDR 삽입 후 7일째 PGF_{2α}(Lutalyse™, Pharmacia Co., Belgium)를 오전 25 mg, 오후 15 mg을 12시간 간격으로 근육주사 후 CIDR를 제거하였다. 인공수정은 PGF_{2α} 주사 후 48시간 전후 발정을 확인하고, 100 µg GnRH(Fertagyl™, Intervet, Holland)를 근육주사 후 12시간 간격으로 동결 정액을 이용하여 인공수정을 3회 실시하였다. 실험에 공시된 정액의 총 정자 수는 대조구인 일반 정액(KPN)이 스트로 당 2,000만 개, 성 감별된 정액은 400만 개로 3회 인공수정을 함에 따라 이용된 총 정자 수는 일반 정액이 6,000만 개, 성 감별된 정액은 1,200만 개가 사용되었다.

4. 수정란 회수 및 평가

마지막 인공 수정 후 7일째에 3-way catheter를 이용하여 비외과적인 방법으로 수정란을 회수하였다. 체란 전 공란우는 2% Lidocaine HCl inj.(DAIHAN Pharm. Co., Ltd., Korea) 5.0 ml로 경막의 마취를 한 후, 수정란의 체란을 원활하게 하기 위해 점액 제거기를 이용하여 자궁경관 내 점액을 제거하였다. 회수를 위한 관류액은 Embryo Collection Medium(Agtech, Bio-life™, USA)를 이용하였고, 수정란 회수가 완료되면 PGF_{2α}를 주사하여 자궁 내에 잔류하고 있는 수정란이 수태되지 않도록 황체를 퇴화시켰다. 체란이 완료된 수정란을 실체 현미경을 이용하여 회수한 후, 수정란의 평가는 Manual of the International Embryo Transfer Society(Stringfellow와 Seidel, 1998)의 기준에 따라 Code 1(excellent or good)과 Code 2(fair)로 평가된 수정란은 이식가능 수정란, Code 3(poor)과 Code 4(dead or degenerated)로 평가된 수정란은 이식 불가능 수정란으로 구분하였다.

5. 통계 처리

한우와 최소의 과배란 처리 반응율, 이식 가능한 수정란의 수와 발달 단계, 퇴화된 수정란의 발달 단계의 유의성 분석은 SAS program을 이용하였고, $p < 0.05$ 이하의 경우를 유의한 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

1. 공란우의 과배란 반응을

수정란의 회수를 위하여 과배란 처리 후 호르몬에 대한 난소의 반응을 직장 검사에 의해 확인하였고, 황체의 수가 3개 미만인 난소 위축 개체는 과배란 반응이 없는 것으로 간주하여 채란에서 제외되었다. Table 1과 같이 채란 전 황체검사에서 위축 난소로 나타난 개체는 대조구(KPN 정액) 71두 중 9두였고, 처리구(sexed semen)는 없었다. 대조구의 과배란 반응율은 87.32%였고, sexed semen 처리구는 0%였다. 과배란 처리 후 수정란을 회수한 공란우의 비율은 박 등(2012)의 78~85% 보고와 김 등(2002)이 보고한 83.3%와 유사한 결과를 보여, 성 감별 정액이 과배란 처리 시 공란우의 호르몬 반응에 영향을 주지 않음을 확인하였다. 처리구는 대조구에 비하여 공시두수가 8두로 매우 적어 전두수가 과배란 반응을 나타낸 것으로 보인다.

2. 수정란 회수 결과

공시된 공란우 79두 중 직장 검사를 통해 난소 위축으로 확인된 개체 9두를 제외한 70두를 대상으로 수정란 회수를 실시하였다. Table 2에서는 KPN 정액과 성 감별된 정액을 이용하여 체내 수정란 회수 성과와 이식 가능 수정란의 비율을 비교 분석하였다. 대조구(KPN 정액)와 처리구(Sexed semen)의 회수된 두당 총 수정란의 수는 12.58 ± 8.31개와 13.25 ± 7.96개로 처리구 간의 유의차는 없었으나, 이식 가능 수정란의 개수에서는 대조구에서 8.23 ± 6.07개로 총 회수 수정란에서 65.38%를 차지하였으며, sexed semen 처리구에서는 3.75 ± 1.98개로 28.30%로 대조구에 비하여 유의적으로 낮게 나타났다($p < 0.05$). 일반 정액을 이용한 대조구의 결과는 손 등(2006), 염 등(2013)이 보고한 두당 6.5 ± 5.4개와 6.83 ± 0.72개 및 박

등(2012)이 보고한 10.94 ± 1.91개의 이식 가능 수정란의 수의 중간 성적을 보인데 반하여 성 감별 정액 처리구는 3.75 ± 1.98개로 낮은 결과를 보였다. 이러한 이식 가능 수정란 생산 성적은 우리와 비슷한 정자 수의(스트로 당 400만개) 성 감별 정액을 이용한 Kaimio 등(2013)의 보고의 4.9개와 An 등(2010)의 4.8개보다 적었으나, 공란우의 발정 관찰 후 24시간에 200만개의 성 감별된 정액을 이용하여 인공수정 한 다른 연구자들의 보고의 3.8개(Larson 등, 2010), 3.1개(Shenk 등, 2006), 2.5개(Hayakawa 등, 2009), 2.1개(Peippo 등, 2009)보다는 양호한 성적을 보였다. 이처럼 많은 연구자들의 수정란 생산 성적은 정액의 성 감별 방법, 사용된 종모우의 수와 품종, 유효 정자 수, 성 분리된 정액의 인공수정 방법 및 수정 부위, 발정 관찰 후 수정 시간 등의 다양한 요인들에 따라 달라지기에 단순 비교에는 한계가 있다고 사료된다(Satori 등, 2010).

3. 발달 단계별 수정란 회수 결과

Table 3에서는 성감별 정액 처리구의 낮은 채란 성적 원인을 검토하고자 채란된 수정란 중 이식 가능한 수정란의 발달 단계와 미수정란, 퇴화란의 비율을 비교하였다. 회수된 수정란의 발달 단계 분류는 Manual of the International Embryo Transfer Society의 기준으로 실제 현미경을 통해 관찰한 후 발달 단계를 분류하였다. KPN 정액 대조구는 전체 780개의 회수 수정란 중 이식 가능 수정란은 510개였고, 확장 배반포배(Expanded blastosys) 단계가 21.92%로 가장 큰 비율을 나타냈다. Sexed semen을 사용한 경우는 대조구와의 유의차는 없었지만, 상실배(Morular) 단계가 16.98%로 가장 많이 나타났다. 반면에, 확장 배반포배 단계의 회수율은 0.94%에 불과해 21.92%인 대조구와 비교하였을 때 유의적으로 낮았다. 또한, sexed semen 처리구의 발달 단계 분포를 보았을 때, 확장 배반포배 단계가 가장 낮은 개수를 나타냈으며, 상실배와 초기 배반포처럼 초기 발달 단계로 갈수록 회수된 수정란의 개수가 증가하였다. Table 4는 2-cell에서 초기 배반포까지 수정란의 발달 단계에서 죽거나 퇴화된 수정란의 비율을 조사한 결과이다. 대조구에서는 2-cell, 4-cell, 8-cell, 상실배까지 발달 분포가 11.11%, 26.14%, 29.41%, 32.68%인데 반하여, sexed semen을 이용한 처리구에서는 각각 60.87%, 26.09%, 8.70%,

Table 1. The rate of superovulatory response in Hanwoo

Treatment group	No. of donor (n)	No. of ovarian atrophy (n)	Efficiency of superovulation ¹⁾ (%)
Control	71	9	87.32
Sexing	8	0	100.00

¹⁾ % = (No. recovered donors/No. donors) × 100.

* Control : KPN sperm, Sexing : Sexed semen.

Table 2. Results of recovered total embryos and transferable embryos after superovulation treatment

Treatment group	No. of donor (n)	Total embryos (n)	No. of recovered embryo (n)	Total transferable embryo (n)	No. of transferable embryos (n)	Rate of transferable embryo (%)
Control	62	780	12.58 ± 8.31	510	8.23 ± 6.07 ^a	65.38
Sexing	8	106	13.25 ± 7.96	30	3.75 ± 1.98 ^b	28.30

* Values with different superscripts differ significantly (Mean ± SD, $p < 0.05$).

Table 3. The features of the embryonic developmental stage

Treatment group	No. of transferable embryos (n)					Uf (n)	Deg (n)
	Mo	Ear BL	BL	Exp BL	Hat BL		
Control	1.68 ± 2.76 (13.33%)	1.48 ± 2.17 (11.79%)	2.21 ± 2.77 (17.56%)	2.76 ± 3.46 ^a (21.92%)	0.10 ± 0.43 (0.77%)	1.89 ± 4.58 ^a (15.00%)	2.47 ± 3.22 (19.62%)
Sexing	2.25 ± 3.45 (16.98%)	0.75 ± 0.89 (5.66%)	0.63 ± 0.92 (4.72%)	0.13 ± 0.35 ^b (0.94%)	-	6.63 ± 6.82 ^b (50.00%)	2.88 ± 3.72 (21.72%)

* Mo; morula, Ear BL; early blastocyst, BL; blastocyst, Exp BL; expanded blastocyst, Hat BL; hatched blastocyst, Uf; unfertilized, Deg; degeneration.

Values with different superscripts differ significantly (Mean ± SD, $p < 0.05$).

Table 4. The features of developmental stage of degenerated embryo

Treatment group	Total	Embryo cell stages				
		2 Cell	4 Cell	8 Cell	Mo	Ear BL
Control	153	0.27 ± 0.68 ^a (11.11%)	0.65 ± 1.07 (26.14%)	0.73 ± 1.01 (29.41%)	0.81 ± 1.17 (32.68%)	0.02 ± 0.13 (0.65%)
Sexing	23	1.75 ± 2.19 ^b (60.87%)	0.75 ± 1.49 (26.09%)	0.25 ± 0.46 (8.70%)	0.13 ± 0.35 (4.35%)	-

* Mo; morula, Ear BL; early blastocyst.

Values with different superscripts differ significantly (Mean ± SD, $p < 0.05$).

4.35%였다. 특히 2-cell에서 발달이 멈춘 수정란은 대조구의 11.11%에 비하여 유의적으로 높은 60.87%로 나타나, 대조구에 비하여 초기에 발달 장애가 있음을 보여주고 있다. 이러한 결과는 sexed semen을 이용한 인공수정을 실시한 경우에 정자의 낮은 운동성과 물리적 손상에 의해 체내에서 수정란의 발달이 멈추거나 그 속도가 늦추어지는 것을 알 수 있다. 뿐만 아니라, 미수정란의 비율에 있어 KPN 대조구는 각각 15.00%인데 반하여, sexed semen 처리구는 50.00%로 유의적인 차이를 보였다. Kaimio 등(2013)의 보고에서도 퇴화 수정란이 22% 미수정 난자가 33%로 우리 성적과 유사한 경향을 나타냈다. 또한, 스트로당 200만 개의 적은 성 감별 정액을 이용한 경산우에 있어서는 미수정 난자 비율이 39%, 53%, 70%로 매우 높았고, 1,000만 개의 정자를 이용한 경우에는 이식 가능 수정란 수가 줄었으며, 퇴화란이 44.6%로 높아졌다고 보고하였다(Hayakawa 등, 2009). 어쨌든, 성 감별 정액은 약 70%의 일반 정액의 이식 가능 수정란 생산 성적에 비하여 매우 낮다. 많은 연구자들의 보고에서와 정자의 성 분리가 수정란의 발달과 quality에 부정적인 영향을 미치고 있음을 시사하고 있어, 급후 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

일반적으로 성 감별 정액은 원하는 성의 송아지 생산을 위

하여 이용되며, 산업적 활용가치가 매우 높은 기술이다. 본 연구는 한우의 과배란 처리 과정에서 성 분리된 정액 활용에 따른 체내 수정란 생산 효율을 검토하고자 실시하였다. 가축유전자원시험장에서 보유 중인 한우 암소 70두를 시험에 공시하였고, 과배란 처리는 발정 주기에 관계없이 CIDR-Plus(Intravaginal Progesterone Releasing Device)를 질 내에 삽입하고, 4일 후부터 FSH(Antorin) 28AU(Amour unit)를 12시간 간격으로 절감 주사하고, FSH 주사 3일째 CIDR-Plus를 제거함과 동시에 PGF_{2α}(Lutalyse) 3.0 ml를 주사해 과배란을 유지하였다. 인공수정은 발정 확인 후 12시간 간격으로 3회 KPN 정액(2,000만/스트로)과 성 판별 정액(400만/스트로)으로 실시하였다. 1차 인공수정 전 GnRH(Fertagyl) 1.0 ml를 주사하고, 수정란 회수는 1차 인공 수정 후 8일째에 3-Way Catheter를 이용해 실시하였으며, 이식가능 수정란 판정은 IETS의 기준을 따랐다. 과배란 반응률은 일반 정액(KPN 정액) 대조구에서 87%, 처리구(성 감별 정액)에서 100%로 나타났으며, 체내 수정란 회수 결과는 일반 정액 처리구에서 총 회수란 수 12.58 ± 8.31개, 이식 가능 수정란 수 8.23 ± 6.07개로 나타나, 이식 가능 수정란 회수율은 65.38%로 나타났으나, 성 감별 정액 처리구에서는 13.25 ± 7.86개, 이식 가능 수정란 수는 3.75 ± 1.98개로, 이식 가능 수정란 회수율이 28.30%로 매우 낮았다. 미수정 난자의 비율은 성 감별 정액이 50%로 일반 정액의 15%에 비하여 유의적으로 매우 높았다($p < 0.05$). 퇴화 수정란 중 2-cell의 비율이

60.87%로 일반 정액의 11.11%에 비하여 유의적으로 높았다 ($p<0.05$). 이들 결과는 한우에 있어 성 감별 정액을 이용한 과배란 처리의 이용 가능성을 보여줬다. 그러나 일반 정액에 비하여 낮은 체내 수정란 생산 효율이 문제로서, 이를 개선하기 위하여 Flowcytometer를 이용한 정액의 성감별, 총 정자 수, 수정 시간 등의 보다 면밀한 검토가 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- An L, Wu ZH, Wu YF, Zhang XL, Liu X and Zhu YB. 2010. Fertility in single-ovulating and superovulated dairy heifers after insemination with low dose sex-sorted sperm. *Reprod. Dom. Anim.* 45:344-350.
- Chrenek P, Boulanger L, Heyman Y, Uhrin P and Laurincik J. 2001. Sexing and multiple genotype analysis from a single cell of bovine embryo. *Theriogenology* 55:1071-1081.
- Hayakawa H, Hirai T, Takimoto A, Ideta A and Aoyagi Y. 2009. Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm. *Theriogenology* 71:68-73.
- Johnson LA, Flook JP and Hawk HW. 1989. Sex preselection in ravnits:live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biol. Reprod.* 41:199-203.
- Johnson LA. 2000. Sexing mammalian sperm for production of offspring:the state of the art. *Anim. Reprod. Sci.* 60:93-107.
- Kaimio I, Mikkola M, Lindeberg H, Heikkinen J, Hasler JF and Taponen J. 2013. Embryo production with sex-sorted semen in superovulated dairy heifers and cows. *Theriogenology* 80:950-954.
- Larson JE, Lamb GC, Funnell BJ, Bird S, Martins A and Rodgers JC. 2010. Embryo production in superovulated Angus cows inseminated four times with sexed-sorted or conventional, frozen-thawed semen. *Theriogenology* 73:698-703.
- Mori Y, Nagamine K, Tomita N and Notomi T. 2001. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289:150-154.
- Morrell JM and Dresser DW. 1989. Offspring from inseminations with mammalian sperm cytometry. *Mutat. Res.* 224: 177-183.
- Morrell JM, Keller KD, Noakes De and Mackenzi NM. 1988. Sexing of sperm by flowcytometry. *Vet. Rec.* 122:322-324.
- Pinkel D, Lake S, Gledhill BL, Vandilla MA, Stephenson D and Watchmaker G. 1982. High resolution DNA content measurement of mammalian sperm. *Cytometry* 3:1-9.
- Peippo J, Vartia K, Kananen-Anttila K, Rätty M, Korhonen K and Hurme T. 2009. Embryo production from superovulated Holstein-Friesian dairy heifers and cows after insemination with frozen-thawed sex-sorted X spermatozoa or unsorted semen. *Anim. Reprod. Sci.* 111:80-92.
- Rutledge JJ and Sidel EJ. 1983. Genetic engineering and animal production. *J. Anim. Sci.* 57:265-272.
- Sartori R, Bastos MR and Wiltbank MC. 2010. Factors affecting fertilization and early embryo quality in single- and superovulated dairy cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 22:151-158.
- Schenk JL, Suh TK and Seidel Jr GE. 2006. Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm. *Theriogenology* 65:299-307.
- Stringfellow DA and Seidel SM. 1998. Manual of the International Embryo Transfer Society. 3rd International Embryo Transfer Society Inc Illinois. pp 165-170.
- Tubman LM, Brink Z, Suh TK and Seidel GE. Jr. 2004. Characteristics of calves produced with sperm sexed by flow cytometry/cell sorting. *J. Anim. Sci.* 82:1029-1036.
- 김덕임, 서상원, 정재경, 이규승, 서길웅, 박창식, 정영채, 박병권. 2002. 한우에 있어서 체내 수정란의 생산과 이식에 관한 연구 : 한우 수정란 생산에 영향을 미치는 요인. *한국수정란이식학회지* 17:23-32.
- 농림수산식품부. 2012. 정자 성 분리 기법에 의한 젖소 암 송아지 생산에 관한 연구. 국회전자도서관. 과천.
- 박해금, 김남태, 김성우, 김현, 도윤정, 염규태, 박수봉, 김재환, 김동훈, 조재현, 고응규. 2012. 과배란 처리에 따른 한우와 젖소 체내 수정란 생산 효율과 수정란 이식 수태율. *한국동물번식학회지* 36:231-235.
- 손동수, 한만희, 최창용, 최선호, 조상래, 김현중, 류일선, 최성복, 이승수, 김영근, 김삼기, 김상희, 신권희, 김일화. 2006. 우수 한우의 수정란 생산 및 이식. *한국수정란이식학회지* 21:147-156.
- 염규태, 박해금, 김남태, 김성우, 김현, 도윤정, 김영신, 박수봉, 김재환, 조상래, 조재현, 고응규. 2013. 한우에서 신체충실지수(BCS)가 다배란 처리 시 체내 수정란 생산과 수태율에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지* 28:7-12.
- 조상래, 최선호, 김현중, 한만희, 최창용, 정연길, 손동수. 2005. LAMP 방법에 의한 소 수정란의 성 판별과 Biopsy에 따른 수정란의 체외발달. *한국수정란이식학회지* 20:169-176.