

수정란 이식 기술의 응용

임현주*, 손준규, 윤호백, 백광수, 최창용, 김시동, 권응기

농촌진흥청 국립축산과학원

Application of Embryo Transfer Technology

Hyun-Joo Lim*, Jun-Kyu Son, Ho-Beak Yoon, Kwang-Soo Back, Chang-Yong Choe, Sidong Kim
and Eung-Gi Kwon

National Institute of Animal Science, RDA

ABSTRACT

Embryo transfer (ET) technology is of high importance in modern cattle breeding programs. ET is one step in the process of removing one or more embryos from the reproductive tract of an outstanding donor female and transferring them to one or more recipient females. Embryos also can be produced in the laboratory via techniques such as *in vitro* fertilization (IVF). But the actual transfer of an embryo is only one step in a series of processes that may include some or all of the following: superovulation and insemination of donors, collection of embryos, isolation, evaluation and short-term storage of embryos, micromanipulation and genetic testing of embryos, freezing of embryos and embryo transfer. Cryopreservation and direct transfer of frozen-thawed embryos is common-place with pregnancy rates near that of fresh embryos. Polymerase chain reaction (PCR) technology is currently being used for sexing embryos, and this technology will be used for “embryo diagnostics” and “embryo genomics” in the future. Although, many limitations and problems remain to overcome, these and other new technologies promise to change livestock breeding drastically in the next decade.

(Key words : bovine, embryo transfer, sexing, cryopreservation, genomics)

서 론

소에서 번식률을 향상시킬 수 있는 각종 번식 기술은 가축의 능력을 개량할 수 있는 실행 수단이 된다. 수정란 이식 (embryo transfer)은 고능력 암소의 난자를 유용하게 이용할 목적으로 개발된 기술로, 공란우(donor)의 생식기로부터 착상 전의 수정란을 회수하거나 체외에서 수정시킨 수정란을 조작, 배양하여 수란우(recipient)의 생식기에 이식하여 착상, 임신 및 분만하게 하는 첨단 생명 공학 기술이다.

수정란 이식은 포유동물 전반에 적용되어 자축이 생산되어 지고 있으나, 타가축의 경우 활용도가 낮아 실용화가 되지 않은 반면, 소의 번식 영역에서는 그 이용 효과가 매우 높아 일찍이 실용화가 이루어져 산업화되었다.

최초 수정란 이식 프로그램은 전신 마취 하에서 공란우의 자궁과 난소의 노출한 중간 복부 수술에 의한 것이었다. Willett 등(1951, 1953)이 수정란 이식을 이런 개복 수술에 의한 최초의 송아지를 생산한 것으로, 1960년 전후까지 수정란 이식에 의한 송아지 생산 예는 극히 적은 편이었다. 그러나

소의 경우 개복 수술을 하지 않고 채란과 이식하는 기술이 요망되어 비외과적 방법에 의한 수정란 이식 기술이 보고되었다(Mutter, 1964). 그 후에 소의 수정란 이식에 관한 연구가 점차 활발해져 많은 발전을 가져왔으며, 특히 1971년 Rowson 등이 외과적 방법(개복 수술)에 의한 소의 수정란 이식에서 수태율이 72~73%로 양호한 수태성적을 얻은 데 자극되어 수정란 이식 기술을 실제의 소의 번식에 이용하려고 하였다. 또한 소 수정란의 동결 보존이 가능해짐에 따라 수정란의 산업화는 빠르게 이루어 졌으며(Wilmot와 Rowson, 1973), 1980년대부터는 수정란 미세 조작 기술의 발달로 수정 후 세포분열 진행 중인 수정란을 분할하여 분리된 배는 각각 개체로 발달한 일란성 쌍태 송아지가 생산되었다. 1970년대부터 연구가 시작된 소 난자의 체외수정은 1982년 Brackett에 의해 최초로 송아지 생산에 성공함으로써 수정란 이식 연구에 급진적인 발전을 가져왔다.

현재 수정란 이식 기술의 이용분야는 (1) 우수한 암컷의 개체를 선발하여 과배란 처리로 다수의 난자를 생산하여 능력이 불량한 개체나 다른 개체에 이식하여 우수한 유전형질을

* Correspondence : E-mail : limhj0511@korea.kr

이어받은 산자를 다수 생산하여 가축개량이 촉진되었다. (2) 공란축을 특정 품종으로 하고, 수란축은 일반 암컷을 이용하여 산업적으로 요망되는 특정 품종의 산자를 생산하는 것이 가능해졌다. (3) 수정란 동결에 의한 장기 보존 기술이 가능해져 고가의 가축을 높은 수송비를 들여 수입할 필요가 없어져, 가축 수정란의 국제 무역이 가능해졌다. 이와 같은 수정란 이식 기술의 현황과 산업화로 이용 시 높은 효과를 기대하여 앞으로 나아가야 할 연구 방향 등을 소개하고자 한다.

1) 세계 수정란 이식 현황

세계 각국은 매년 전년도에 실시한 가축의 수정란 생산, 이식, 보존 및 수출 현황을 국제수정란이식학회(International Embryo Transfer Society, IETS)에 통보하며, 국제수정란이식학회는 각국의 통계를 취합하여 매년 12월에 발표한다. 2011년 국제수정란이식학회가 발표한 2010년도에 실시한 세계 소 수정란 이식 현황은 Table 1과 같다.

전 세계적으로 2010년 체내 수정란의 수는 2009년 702,000개보다 증가한 732,000개이다. 이는 전년도보다 4.25% 증가한 수치이다. 또한, 이식한 체내 수정란도 10.6%의 큰 폭으로

증가했다(2009년 534,000개, 2010년 591,000개). 세계 각국에서는 104,651두의 공란우로부터 732,227개의 이식 가능 수정란을 회수하였으며, 두당 평균 이식 가능 수정란의 회수는 6.9개였다. 체내 수정란의 이식은 590,561개가 수란우에 이식되었으며, 그 중에 채란 후 당일 이식한 신선 수정란은 44.5%(263,036개)였고, 채란 후 동결 보존하였다가 용해하여 이식한 동결 수정란은 55.5%(327,525개)였다. 아프리카를 제외한 모든 대륙에서는 이식된 체내 수정란이 상당히 증가됨을 보고하였다. 동결 수정란의 이식은 신선 수정란보다 60,000개 차이를 보이는데, 이는 동결 수정란의 직접 이식 방법으로 1990년 중반부터 신성 수정란보다 동결 수정란의 이식으로서의 추세를 보이는 것이다.

이식 가능한 체외 수정란의 수는 2009년에는 377,000개였고, 2010년에는 451,000개로 19.7% 증가된 것으로 보고되었다. 남미(특히 브라질)는 체외 수정란 생산과 수정 위주로 행하고 있는 실정이다. 세계 각국에서 체외 수정란을 450,549개 생산하여 339,685개가 수란우에 이식되었다. 체외 수정란의 이식은 신선 수정란은 315,715개(92.9%)였고, 동결 수정란은 23,970개(7.1%)가 이식되었다. 이식된 체외 수정란 수는 339,685

Table 1. Bovine *in vivo*-derived embryo activity in 2010(IETS, 2011)

Continent	Flushes	Transferrable embryos	Number of transferred embryos			
			Fresh	Frozen	Total	Percentage(%)
Africa	1,515	9,738	4,685	3,730	8,415	1.42
Asia	12,986	131,718	34,148	53,590	87,738	14.86
Europe	17,694	117,813	48,555	60,859	109,414	18.53
N America	51,735	338,540	106,400	147,271	253,671	42.95
S America	12,263	77,643	47,353	24,205	71,558	12.12
Oceania	8,458	56,775	21,895	37,870	59,765	10.12
Total	104,651	732,227	263,036	327,525	590,561	100.00

Table 2. Bovine *in vitro*-derived embryo activity in 2010(IETS, 2011)

Continent	Transferrable embryos	Number of transferred embryos			
		Fresh	Frozen	Total	Percentage(%)
Africa	0	0	0	0	0.00
Asia	116,614	15,993	6,510	22,503	6.62
Europe	7,155	3,412	2,249	5,661	1.67
N America	43,058	25,778	2,322	28,100	8.27
S America	268,310	256,888	12,235	269,123	79.23
Oceania	15,012	13,644	654	14,298	4.21
Total	450,149	315,715	23,970	339,685	100.00

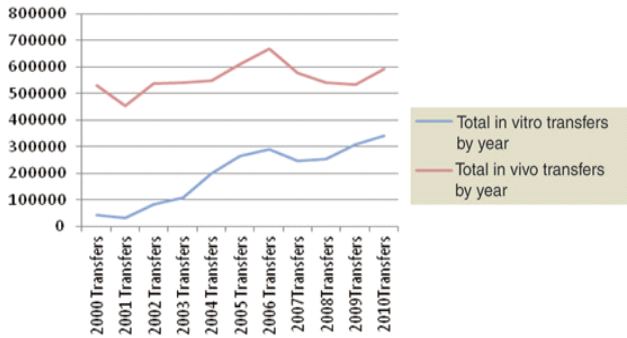


Fig. 1. Comparison of the number of *in vivo* and *in vitro* embryos transferred annually for the past decade(IETS, 2011).

개로 전년도보다 11% 증가했다.

2) 수정란의 동결보존

수정란의 이용효율을 극대화하기 위해서는 동결 보존 기술이 확립되어야만 한다. 동결 보존은 Whittingham 등(1972)에 의하여 최초로 쥐에서 동결 수정란을 이식하여 산자가 생산됨으로써 동결 보존의 기초가 마련되었고, 이후 다른 축종에 계도 적용 확대되어 산자가 생산되고 있다.

수정란의 동결보존의 기본 원리는 수정란을 항동해제(cryoprotectant)가 함유된 동결 보존액에 평형시켜서 액체질소에 침지할 때 세포 내의 유리수분의 결빙이 최소화되도록 하여 동결하고, 동결 수정란의 정상적인 기능이 재개되도록 생리적 온도에서 용해하며, 용해 후 단계적인 희석에 의하여 동결보호제를 제거하는 과정을 거치게 된다. 이런 과정 중에 세포내의 수분이 동결되면서 얼음 조각(ice crystal)이 만들어져, 이 얼음 조각이 세포의 손상을 유발하게 되는 문제점이 발생한다. Wilmut(1972)에 따르면, 이런 수정란의 동결·용해 후의 생존성은 생물학적, 물리학적 및 생화학적인 상호반응으로 동결보호제의 종류, 냉각속도, 동결 방법 및 용해 속도 등

에 따라 크게 영향을 받는다고 보고하였다. 따라서 이러한 배아의 동결용해 과정에서는 가장 중요한 하나는 세포의 동해를 방지하기 위한 적절한 동해방지제(cryoprotectant)를 사용하는 것과 세포의 적절한 탈수를 유도하는 것이다. 바람직한 동결보호제는 수정란에 대한 독성이 적고, 동결 시 세포내 전해질의 농축이나 삼투압 상승과 세포 내외의 빙정 형성 등 생존에 불리한 상태를 완화하거나 감소시킬 수 있어야 하며, 널리 이용되는 동결보호제는 침투성 동결보호제와 비침투성 동결보호제로 나눌 수 있다.

동결 및 용해 속도에 따라 완만동결, 급속동결, 초자화보존 등으로 나뉜다. 완만동결의 동결보호제로는 glycerol, DMSO 등이 있으며, 가장 많이 사용하고 있는 것은 glycerol이며, 여기에 혈청이 20% 정도 포함된다. 완만동결방법은 동결할 때 도 시간이 많이 걸리지만, 용해 시에도 마찬가지로 시간이 많이 걸리는 단점이 있다. 그러나 이러한 단점들을 최소화시키면서 또한 수정란의 생존율을 보장할 수 있는 방법이 많이 연구되면서 이를 개선한 1 단계 동결법이 이루어지고 있다. 이는 직접이식법으로 많이 알려져 있으며, ethylene glycol을 동결보호제로 사용되고, 동결과 용해 시 점진적 단계를 거치지 않고 즉 실험실에서 수정란을 확인하지 않고, 용해 후 직접 이식할 수 있는 동결방법으로 알려져 있다. 그러나 완만동결법은 세포내 빙정 형성에 의한 손상이 일어날 수 있고, 동결 처리 시간이 2~3시간으로 길게 소요되며, 동결 처리 방식이 복잡하고, 고가의 자동화 동결기가 필요하여(Gardner, 2004) 농가 현장에서 직접 동결하는데 한계가 있다. 동결기 등의 고가 기기를 이용하지 않고 액체질소에 수정란을 직접 투입하여 보존하는 방법이 초자화법(용액의 순간 고형화에 의해 얼음 결정 없이 냉각 시 점도가 크게 상승)이다. 초자화법이 동결과 다른 점은 동결에는 1~2 mole의 동해 방지제를 이용하는데 비하여 초자화는 6~8 mole의 고농도의 것과 동결에는 빙정을 형성하는 것에 대해서 초자화법에는 빙정을 형성하지

Table 3. Pregnancy rate on Day 45 following timed artificial insemination (TAI) or timed embryo transfer using fresh(TET-F) or vitrified (TET-V) embryos(AI-Katanani et al., 2002)

Group	Pregnancy rate ¹	
	All cows(n=155)	Synchronized cows ² (n=105)
TAI	6.2 ± 3.6(5/68) ^a	5.0 ± 4.3(3/46) ^a
TET-F	19.0 ± 5.0(6/33) ^b	26.7 ± 6.4(5/20) ^b
TET-V	6.5 ± 4.1(3/54) ^a	7.4 ± 4.7(2/39) ^a

Different alphabets in superscript represent least squares means that differ(P<0.05) as determined by orthogonal contrasts(TFT-F vs. TET-V and TAI, TAI vs. TET-V).

¹ Data are least squares means ± S.E.M. : in parentheses : number of pregnant cows/total number of cows.

² Cows considered as synchronized were those with progesterone concentrations ≤ 1.5 ng/ml on the day of anticipated ovulation and ≥ 1.5 ng/ml on the day of embryo transfer.

않는 것이다. 따라서 초자화법에서는 동결에서 문제되는 빙정 형성에 따른 물리적인 세포장애의 발생이 일어나지 않기 때문에 동결 보존보다 생존율이 높은 장점이 있다.

수정란의 동결은 일반적으로 이루어지며, 임신율은 신선란의 이식보다는 낮은 성적을 가진다. Al-Katanani 등(2002)은 신선란을 이식했을 때의 임신율은 19.0%, 유리화했을 때는 6.5%로 약 13%의 차이가 있음을 보고했다. 이러한 수정란의 동결 및 저장은 수정란의 활력을 정지시켜 주어진 기간 동안 보관 후에 수정란이 정상적인 발달로 회복하는데 중요한 목적이 된다.

3) 수정란 성감별 기술

수정란 이식 산업에 있어서 수정란의 성을 판별하여 수란축에 이식할 수 있음은 후대의 성을 조절하여 생산할 수 있어, 산업적인 효과를 극대화할 수 있는 하나의 방법이 될 수 있다. 정자에 대한 성조절로 X와 Y정자를 분리하여, 공란우에 X와 Y정자를 선택적으로 인공 수정하여, 수정란의 성별을 결정할 수 있으나, 효율성 등의 문제점을 갖고 있음이 지적된 바 있다 (Johnson 등, 1989; Cran과 Johnso, 1996). 최근의 연구 결과에 따르면 성감별 정액의 수정능 획득 및 수정란의 발달 능력이 낮다는 보고하였으며(Zhang 등, 2005; Katska 등, 2006). 적은 용량의 성감별 정액은 기존의 정액보다 임신율이 10~40% 감소한 연구 결과도 있다(Andersson 등, 2006; Schenk 등, 2009, Seidel, 2007; DeJarnette 등, 2009). 이식하기 전에 수정란의 성을 판별하여 수란축에 이식함으로써 인위적으로 원하는 성의 산자를 생산하려는데 많은 연구가 집중되고 있다. 분할 중인 수정란의 활구를 분리 샘플로 활용하는 분자생물학적 성감별 방법은 체외 수정기술과 미세조작기술(micromanipulation)의 발달로 후대 성의 인위적 조절을 앞당기는데 기여하고 있다. 수정란을 이용한 성감별 방법은 세포유전학적 성염색체 분석 방법, 암·수 수정란의 대사활성 차이에 의한 특정 효소 역가 측정법, 옹성 특이항원(H-Y항원)을 이용한 방법, 수정란의 발달속도 차이에 의한 방법, Y염색체 특이 반복 DNA 서열을 확인하는 방법이 있다. 각각의 방법으로 성판별을 할 경우 수정란의 손상, 전문적인 기술 필요 및 시간이 많이 소요되는 문제가 있다. 성염색체 분석방법은 정확성은 높으나 embryo로부터 metaphase 상태를 얻기가 힘들어 성비 확인이 다소 떨어지며, 장시간을 요하는 단점을 지니고 있다. X-linked enzymes 이용법은 염색 과정이 수정란에 유해한 영향을 주며, 수정란 발달 속도에 의한 암·수 구분 방법은 수정란의 발달 단계에 따라 판정해야 하므로 정확한 진단이 어렵다(Iwasaki and Nakahara, 1990; Munne et al., 1994; Munne et al., 1995). 또한 Polymerase Chain Reaction (PCR)을 이용한 Y specific DNA의 검정은 수정란 세포로부터 적은 양의 샘플로 보다 용이하고 정확한 성감별을 실시할 수 있지

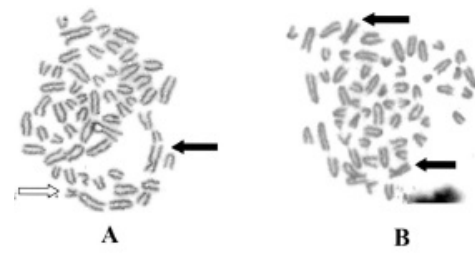


Fig. 2. Bovine embryo chromosome analysis. (A) Male chromosome, (B) Female chromosome. ⇐ : X-chromosome, → : Y-chromosome(Han et al., 2011).

만, 수정란을 생검하여 일부 세포를 추출해야 하므로 수정란의 생존성에 영향을 주게 된다.

4) 수정란의 생검

수정란의 성판별을 위해서는 샘플 채취를 위한 활구 분리가 선행되어야 하는데, 이것은 수정란의 생존률과 직결되는 기술로, 수정란에 상해를 덜 입히면서 세포수를 적게 분리하는 방법들이 고안되어져 오고 있다. 수정란의 biopsy란 착상 전 수정란에서 1개 또는 수개의 세포를 분리해 내는 방법으로, 생식세포 발달수준별로, 미수정란의 극체 제거에서부터 초기 난활기배의 분활구세포 biopsy, 부화된 수정란(hatched embryo)의 영양배엽세포(trophectoderm cells)의 biopsy까지 다양한 biopsy 과정이 개발되었다(Seidel, 1982; Loskutoff, 1990). 보통은 초기배 수정란을 이용하여 미세조작기에 Bio-cut blade를 장착시켜 수정란의 내부 세포피는 피하고, 영양막세포의 일부 활구를 분리하고 있다(Bredbacka 등, 1995; Lopes 등, 2001).

Lopes 등(2001)과 Chrenek 등(2001)은 8~16 cell 단계의 수정란 투명대의 일부를 뚫고, 활구 1~2개를 biopsy하는 방법

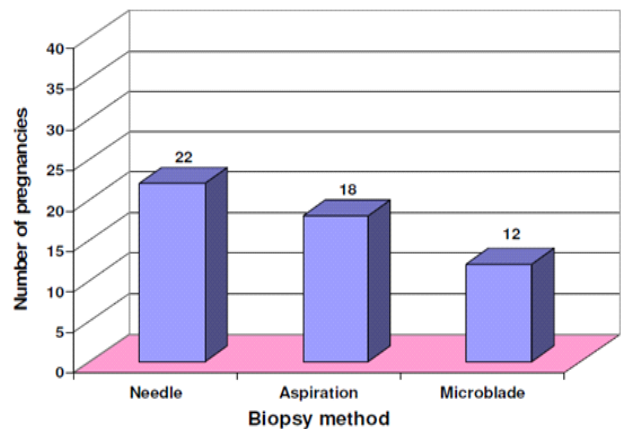


Fig. 3. Number of pregnancies obtained in the three batched according to the biopsy technique used(Cenariu et al., 2012).

을 사용하였다. Keiichiro와 Yukako(2004)은 pressing-out 법으로 투명대 일부에 glass needle로 slit을 만들고, holding과 glass needle로 눌러줌으로써 할구가 slit을 통해 밖으로 빠져 나가도록 하여 할구 분리를 실시하였다.

세 가지 할구 분리 방법에 따른 임신율을 비교한 실험의 결과(Cenariu 등, 2012), needle 사용과 Aspiration 방법이 투명대의 손상을 최소한으로 줄여줘, 수태율에 좋은 결과를 주었다.

5) 수정란의 유전체 선발 및 진단기술 : 전체 유전자 증폭(Whole Genome Amplification)의 적용

경제 형질의 식별을 위한 PCR의 분석은 시작되었고, 앞으로 더욱더 활발해질 것이다. 수정란은 유전자 분석을 위한 한 두 개의 표본 세포(난할구)를 얻기 위해 현미 관찰 조작 하에 매우 가는 유리 바늘로 생검되어, 유전자 분석을 실시되는 것이다. 생검 PCR 분석은 현재 bovine leucocyte adhesion deficiency(BLAD)와 수정란 성판별이 동시에 이루어지고 있다(Hasler, 2003). 중요한 마커를 식별할 수 있다면, 수정란 생검을 통한 마커 도움 선발(Marker Assisted Selection)이 적용될 수 있다. 다수의 마커 분석이 가능해지면 PCR 기술은 생검을 통한 수정란을 진단할 수 있고, 단일 염기 다형성(SNP)로 수정란의 genetic testing이 가능해질 것이다.

수정란 기술에 관한 연구는 착상 전 유전 진단(PGD, preimplantation genetic diagnosis)에 초점을 맞추고 있는 실정이다. 착상 전 유전자 진단(PGD)은 착상과 임신에 앞서 초기 배아의 유전자 검사를 하는 것이다. 사람에서 주로 사용되는 것으로 배아 단계에서 특정 유전적 이상을 진단함으로써, 자녀에게 나타날 수 있는 유전적 질환의 위험성이 사실상 제거시켜 체외 수정을 통한 임신을 가능케 하는 방법이다. 수정란 단계에서 착상 전 유전 진단(PGD)을 위해서 약간의 세포의 생검이 필수적이다. 한정된 양의 세포와 적은 양의 DNA(1-2 할구 생검)으로 PGD의 몇 가지 분자분석을 제한적으로 수행할 수 있다. 생검 세포의 전체 유전자로의 초기 증폭은 이 한계점을 극복하기 위해 제안된 것으로, 전체 유전자 증폭(WGA)는 최소한의 DNA 샘플에서 대량 생산이 가능한 방법이다. 최적화된 WGA 절차는 몇 개의 세포 채취만으로도 분자 유전학적 분석을 위한 충분한 처리가 됨으로써, 착상 전 수정란의 평가

가 가능해지는 새로운 시대가 열리게 된다.

결론

가축에서 인공 수정(AI)은 유전적으로 우수한 부계의 유전 자원을 다수의 모계에 이용하여 우량한 자손을 대량으로 생산하는 기술로 주로 수컷에 의존한다. 암소의 선발은 수정란 이식을 효율적으로 이용하여 모계의 선발을 더욱 강하게 할 수 있어서 가축의 개량 효과를 극대화할 수 있다. 기존의 인공 수정에 의한 후대 검정 체계에서는 종모우의 경우 긴 세대 간격을 가지지만, 수정란 이식을 통한 개량은 세대 간격을 상당히 단축시킴과 동시에 암소의 선발 강도를 보다 강하게 높이기 되므로 개량의 효과를 높일 수 있다.

유전체에 대한 분석 기법이 발달함에 따라, 개체가 보유하고 있는 유전 능력을 빠르고 쉽게 분석할 수 있게 되었다. 이는 유전체 분석을 통하여 능력 검정 기록이 없는 개체의 능력을 예측할 수 있는 조기 진단이 되는 것이다. 수정란으로부터 샘플을 채취하여 유전체 분석을 실시할 경우, 수정란이 발생하여 태어날 개체의 능력을 수정란 이식 이전에 앞으로써, 선택적으로 수정란 이식을 하고 원하는 개체를 생산함으로써 개량 속도 및 효율을 한층 더 높일 수 있을 것이다. 그러나 이러한 기법이 상업화된 가축 생산 기술로 이용되기 위해서는 아직도 해결해야 할 많은 문제점들이 남아 있다. 이미 수정란의 체외생산, 수정란 분할, 수정란의 성판별과 같은 기술들이 획기적인 발전을 가져왔듯이, 수정란 선발에 유전체 정보를 활용하여 획기적으로 변화시킬 수 있는 가축 생산 기술로 이용될 것으로 기대한다.

참고 문헌

- AL-Katanani YM, Paula-Lopes FF and Hansen PJ. 2002. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 85: 390-396.
- Andersson M, Taponen J, Kommeri M and Dahlbom M. 2006. Pregnancy rates in lactating Holstein-Friesian cows after artificial insemination with sexed sperm. *Reprod. Domest.*

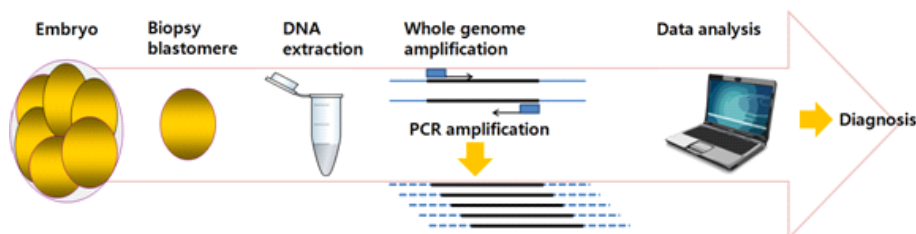


Fig. 4. Preimplantation genetic diagnosis of embryo.

- Anim. 41: 95-97.
- Brackett BG, Bousquet D, Boice MI, Donawick WJ, Evans JF and Dressel MA. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. Biol. Reprod. 27: 147-158.
- Bredbacka P, Kankaanpaa A and Peippo J. 1995. PCR-sexing of bovine embryos: A simplified protocol. Theriogenology 44: 167-176.
- Cenariu M, Eموke P and Ioan G. 2012. The influence of biopsy method on the survival rates of sexed and cryopreserved bovine embryos. Afr. J. Biotechnol. 11: 4459-4462.
- Chrenek P, Boulanger L, Heyman Y, Uhrin P, Laurincik J, Bulla J and Renard JP. 2001. Sexing and multiple genotype analysis from a single cell of bovine embryo. Theriogenology 55: 1071-1081.
- Cran DG and Johnson LA. 1996. The predetermination of embryonic sex using flow cytometrically separated X and Y spermatozoa. Hum. Reprod. 2: 355-363.
- DeJarnette JM, Nebel RL and Marshall CE. 2009. Evaluating the success of sex-sorted semen in US dairy herds from on farm records. Theriogenology 71: 49-58.
- Gardner DK. 2004. The road to single embryo transfer. Clin. Embryol. 7: 16-26.
- Han RX, Kim HR, Diao YF and Jin DI. Sex determination of *in vivo* and *in vitro*-derived bovine embryos. CNU J. Agri. Sci. 38: 269-275.
- Hasler JF. 2003. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. Anim. Reprod. Sci. 79: 245-264.
- Iwasaki S and Nakahara T. 1990. Cell number and incidence of chromosomal anomalies in bovine blastocysts fertilized *in vitro* followed by culture *in vitro* or *in vivo* in rabbit oviducts. Theriogenology 33: 669-675.
- Johnson LA, Flook JP and Hawk HW. 1989. Sex preselection in rabbits: Live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. Biol. Reprod. 41: 199-203.
- Katska-Ksiazkiewicz L, Rynska B, Bochenek M, Opiela J and Jurkiewicz J. 2006. *In vitro* production of bovine embryos using flow-cytometrically sexed sperm. Arch. Tierzucht. 49: 133-140.
- Keiichiro T and Yukako H. 2004. Efficient production of sex-identified and cryosurvived bovine in-vitro produced blastocysts. Theriogenology 61: 1181-1191.
- Lopes RFF, Forell F, Oliveira ATD and Rodrigues JL. 2001. Splitting and biopsy for bovine embryo sexing under field conditions. Theriogenology 56: 1383-1392.
- Loskutoff NM. 1990. Micromanipulation of embryos and gametes. Int. Emb. Trans. Soc. Newsletter. 8: 5-14.
- Munne S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J and Cohen J. 1995. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. Fertil. Steril. 64: 382-391.
- Munne S, Weier HUG, Grifo J and Cohen J. 1994. Chromosome mosaicism in human embryos. Biol. Reprod. 51: 373-379.
- Mutter LR, Graden AP and Olds D. 1964. Successful non-surgical bovine embryo transfer. A. I. Dig. 12: 3.
- Schenk JL, Cran DG, Everett RW and Seidel GE Jr. 2009. Pregnancy rates in heifers and cows with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per inseminate, sorting pressure and sperm storage before sorting. Theriogenology 71: 717-728.
- Seidel GE Jr. 1982. Application of microsurgery to mammalian embryos. Theriogenology 17: 23-35.
- Seidel GE Jr. 2007. Overview of sexing sperm. Theriogenology 68: 443-446.
- Stroud B. 2011. IETS Statistics and Data Retrieval Committee Report. The year 2010 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals, IETS Newsletter December 2011, International Embryo Transfer Society.
- Rowson LEA, Lawson RAS and Moor RM. 1971. Production of twins in cattle by egg transfer. J. Reprod. Fertil. 25: 261.
- Whittingham DG, Leibo SP and Mazur P. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . Science 178: 411-414.
- Willet EL. 1953. Egg transfer and superovulation in farm animals. Iowa State College J. Sci. 25: 83-100.
- Willet EL, Black WG, Casida LE, Stone WH and Buckner PJ. 1951. Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. Science 113: 247.
- Wilmot I. 1972. Effect of cooling rate, warming rate, protective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. Life Sci. 11: 1071-1079.
- Wilmot I and Rowson LEA. 1973. Experiments on the low temperature preservation of cow embryos. Vet. Rec. 92: 686-690.
- Zhang M, Lu KH and Seidel GE Jr. 2005. Blastocyst development of male and female bovine embryos produced by IVF with flow cytometrically sorted sperm. Reprod. Fertil. Dev. 17: 306-307.