

수정란이식 활성화 방안

- 기술개발 -

김 일 화

충북대학교 수의과대학

수정란이식 활성화 방안

- 기술개발 -

김 일 화

충북대학교 수의과대학

최근의 수정란 생산 및 이식 기술의 개발

- 난포주기 및 배란동기화를 중심으로 -

1. 서론

국내에서 소의 수정란이식이 1980년대 초부터 실용화를 위한 연구가 이루어지기 시작한 이래, 근래에는 연간 250~350여두의 한우 및 젃소로부터 1,000~1,900여개(평균 4~5.3개/공란우)의 이식 가능한 체내수정란을 회수하여 1,000여두의 수란우에 이식되고 있다. 또한 체외수정란은 지난 7~8년간 평균 3,000여두의 수란우에 이식되었다(축산연 집계자료). 또한 복제수정란을 생산하여 수란우에 이식하여 많은 두수의 산자를 생산하는 등 매우 괄목할 만한 진보가 이루어졌다. 2003년도 전 세계에서 이루어진 수정란이식 기술에 대한 동향을 보면, 공란우 108,166두에서 693,787개의 수정란이 회수되어 평균 수정란의 회수 성적이 6.4개로 종전의 평균 5.5에 비해서 다소 증가되고 있으며, 체외수정란의 이식은 약 100,000두의 수란우에 이식되었으며 신선수정란이 동결수정란에 비해 훨씬 높은 비율을 차지하고 있다(86%:14%, Thibier, 2004). 이러한 국, 내외적인 자료를 볼 때 체내수정란의 생산 및 이식은 능력의 개량을 위하여 큰 변화가 없이 꾸준히 진행되고 있으며, 체외수정란의 생산 및 이식은 증가하는 추세인 것으로 보여진다. 수정란이식 산업의 효율성을 증대시키기 위해서는 체내수정란의 경우, 선발된 우수한 공란우로부터 발정주기에 관계없이 일정 간격으로 가능한 한 다수의 이식 가능한 수정란을 회수하는 기술의 정립이 필요할 것으로 보인다. serum free medium을 이용한 양질의 체외수정란의

생산과 동결-융해 후 생존성이 높은 수정란의 생산 기술, 그리고 체 내, 외 수정란의 이식을 위한 적절한 수란우의 준비 및 이식 후 수태율의 향상이 중요한 부분으로 여겨진다. 본 고에서는 소 체내수정란 생산의 효율성 증진과 수정란 이식을 위한 수란우의 효과적인 준비 기술 및 수태율의 향상에 초점을 맞추어 기술하고자 한다.

2. 공란우의 과배란처리

Casida(1943)가 처음으로 소에서 과배란처리에 관한 연구를 시작한 이후로 수십년간 공란우의 처리 방법을 개선하여 공란우당 이식 가능한 수정란의 수를 증가시키고자 많은 연구가 이루어졌다. Gonadotropin priming (Rajamahendran 등, 1987), LH contamination을 감소시킨 FSH 제제의 사용(Gonzalez 등, 1990), 성선자극호르몬 투여시 recombinant bovine somatotropin의 투여(Rieger 등, 1991), 성선자극호르몬의 농도 조절(Barros 등, 2003), 공란우 처리 전 우세난포(dominant follicle)의 제거(Bungartz 등, 1994) 등이 시도 되었으며, 이 외에도 공란우의 나이(Breuel 등, 1991) 및 품종(Looney, 1986), 발정주기 중 성선자극호르몬 투여 개시일(Goulding 등, 1990) 등의 여러 요인에 대한 효과도 검토되었다. 그러나 이러한 연구에도 불구하고 실제로 얻을 수 있는 이식가능 수정란의 수는 미미한 증가에 그치고 있다(평균 5개~6.4개). 한편 과배란처리의 간편화를 위해서 FSH제제를 polyvinylpyrrolidone에 용해시켜 1회의 근육 주사로 기존의 분할 주사법과 비슷한 성적을 얻었다고 하였다(Sugano와 Shinogi, 1999).

근래에 수정란의 생산과 관련하여 관심을 끄는 기술은 공란우의 발정주기에 관계없이 과배란처리를 실시할 수 있는 기술의 개발이다. 즉, 과배란처리 수 일전부터 과배란처리 기간 동안 progesterone제제를 질 내에 삽입하여 발정주기에 관계없이 성선자극호르몬의 투여를 개시하는 방법이다. 그러나 과배란처리의 효율성을 높이기 위해서는 소에서 발정주기 동안 주기적으로 발생하는 난포파가 시작되기 전 또는 시작 당일 즉, 소 난포들의 폐쇄가 일어나기 전에 성선자극호르몬의 투여가 시작되어야 한다(Adams, 1994). 이와 같이 특정 시기에 난포파의 발생을 위해서 사용되는 방법에는 estrogen을 투여하거나 또는 estrogen과 progesterone을 동시에 투여하는 방법이 이용된다. 즉, 이러한 steroid hormone

의 투여는 negative feed back 기전에 의하여 존재하고 있는 우세 난포의 폐쇄를 유발하며, 이 후의 FSH 농도의 증가에 따른 새로운 난포파의 출현이 나타나게 된다. Bo 등(1996)은 progesterone implants를 장착한 미경산우에 estradiol-17 β 5mg 투여 후 4일째에 성선자극호르몬으로 과배란처리시 발정 관찰 8~12일 후에 과배란처리를 시작한 기존의 과배란처리 방법과 유사한 과배란 반응(수정 난자 수, 이식 가능 수정란 수)을 얻었다고 보고하였다(Table 1).

Andrade 등(2002)도 역시 Syncro-Mate-B(SMB) 장착과 3mg norgestomet 피하주사와 estradiol valerate 근육주사 또는 Controlled Internal Drug Releasing Device(CIDR) 장착과 estradiol benzoate 4mg 근육주사로 과배란을 유기하였을 때, 발정주기 9~12일에 성선자극호르몬의 투여를 시작한 기존의 과배란처리법과 같은 결과를 얻었음을 보고하였다. 더 나아가 Chandra 등(2002)은 CIDR를 장착 후 8일 째에 FSH를 1일 2회 4일간 투여하는 방법으로 과배란을 유기

Table 1. Superovulatory response (means \pm SEM) of control heifers to a single subcutaneous injection of Folltropin-V between 8 and 12 days after estrus or of heifers superstimulated 5 days after treatment with a progestogen implant^c

	Control	Progestogen alone	Progestogen +estradiol-17 β
n	18	19	19
CL	25.4 \pm 5.3	24.3 \pm 3.5	28.8 \pm 3.5
Heifers with <2 CL	1	1	0
Total ova/embryos	8.9 \pm 1.5	12.4 \pm 3.5	13.2 \pm 2.1
Fertilized ova	6.0 \pm 1.1 ^a	7.5 \pm 1.9 ^{ab}	11.2 \pm 2.0 ^b
% fertilized ova	68 ^a	60 ^a	84 ^b
Transferable embryos	3.9 \pm 0.8	4.4 \pm 1.6	6.6 \pm 1.8
% transferable embryos	44 ^a	35 ^a	50 ^b

^{ab} Means and percentages within rows with no common superscripts are different (P<0.05).

^c Progestogen ear implants were inserted at unknown stages of the estrous cycle, and 5 mg E-17 β was injected intramuscularly on the next day.

하였으며 수정란의 채란 후 14일 간격으로 동일하게 반복 과배란 처리한 결과 이식가능 수정란의 수는 1, 2, 3, 4회에 대해 각각 7.3, 6.1, 6.6 및 4.3개로 통계적인 차이를 나타내지 않았다고 하였다. 또한 Matoba 등(2002)은 임의의 발정주기에 CIDR를 장착하고 1일 후 estradiol benzoate 2.5mg 투여하였으며, 5일 후부터 FSH를 4일간 감량, 분할 투여하여 과배란을 유도하였으며 채란 후 28일 간격으로 총 3회 반복 채란하였다. 이 결과 회수 수정란 수가 각각 14.7, 13.0 및 10.3개로 차이가 없음을 보고하였다. 한편 Nishisouzu 등(2003)은 CIDR를 장착하고 2mg estradiol benzoate 투여 후 5, 6, 7일째에 FSH를 1일 2회 3일간 감량, 분할 투여했을 때 이식 가능 수정란의 수가 각각 3.2, 5.6 및 2.6개로서 6일째가 가장 양호한 결과를 나타내어, estradiol의 투여 시기 후 발생하는 새로운 난포파의 발생시기 후부터 성선자극호르몬의 투여 간격이 수정란 생산에 영향을 미칠 수 있음을 보여 주었다. 이러한 연구 결과로 보아, CIDR 등의 progesterone 제제와 함께 성선자극호르몬의 투여는 공란우의 발정 주기에 관계없이 과배란처리가 가능함을 보여주며, progesterone제제의 장착 시 또는 투여 1일 후의 steroids의 투여가 새로운 난포파의 발생으로 인한 수정란의 회수에 좋은 영향을 준 것으로 보여진다. 더욱이 이러한 과배란처리 기술을 약 15일~30일 간격으로 3~4회 채란의 가능성을 보여준다.

공란우를 과배란 처리하여 수정란을 회수 시 수정란의 생산에 영향을 미치는 요인은 유전적인 요인보다는 환경적인 요인들이 작용된다고 하였다(Tonhati 등, 1999). 또한 성선자극호르몬에 의한 과배란처리는 새로운 난포파의 출현에 의한 난포 수의 증가보다는 현재 진행 중인 난포파에서 난포가 폐쇄되는 것을 막음으로서 수정란을 생산하게 된다. 따라서 성선자극호르몬 투여전의 기존에 존재하는 난포파에서의 소난포의 분포가 과배란처리 후 수정란의 회수 결과에 영향을 미칠 수 있을 것이다. 최근에 Singh 등(2004)은 steroid hormone 및 대난포의 제거로 새로운 난포파의 유기 후 FSH로서 과배란처리를 시작하고 초음파진단장치를 통하여 관찰한 결과, 과배란처리 반응은 난포파 발생시의 존재한 2mm 이상의 난포수에 의해 예측될 수 있음을 보고하였다. 또한 그들은 첫 번째 난포파의 시기에 존재하였던 난포의 수와 그 다음 번의 난포파에 존재하는 난포의 수에 상관관계가 있음을 나타내었다. Bungartz와 Niemann(1994)은 성선자극호르몬 투여전 3~8mm의 난포의 수가 10개 미만인 공란우군이 10개 이

상인 군에 비해 이식 가능한 수정란의 회수가 유의적으로 감소되었음을 보고 하였다(7.8 vs 0.3개). 이러한 결과로 보아 과배란처리 전 초음파진단이 공란우의 과배란 반응 예측에 도움을 줄 수 있을 것으로 보인다.

3. 수정란이식 수란우 준비와 수태율의 향상

생산된 수정란을 이식할 때 이식에 적합한 수란우를 준비하는 것은 수정란 이식의 성공에 매우 중요한 요소이다. 자연발정우를 이용하여 이식하는 것이 경제적이며 수태율에 있어서도 발정동기화 시킨 수란우와 비슷하다. 그러나 발정 관찰이 정확하게 이루어지지 않은 경우에는 발정을 놓치거나 이식 후에도 공란우 또는 수정란과의 동기화 미비로 수태율이 저하될 수 있다. 지금까지는 수란우의 발정동기화를 위해 황체퇴행제인 $PGF_{2\alpha}$ 를 주로 이용하였다. 그러나 동기화를 실시하려는 소가 발정 후 5일 또는 6일 이내의 경우에는 황체의 용해가 일어나지 않아 이용할 수가 없으며, 반응하는 황체가 존재하는 경우 호르몬 투여 후 3~5일간 집중적으로 발정 관찰 후 발정이 관찰되었을 때 수란우로 이용할 수 있다. 그러나 배란동기화(Ovsynch, Pursley 등, 1995)법이 개발된 후에는 발정관찰이 없이도 수정란 이식우의 동기화에도 활용되고 있다. 이 방법은 GnRH제제의 투여 7일 후 $PGF_{2\alpha}$, 그리고 2일 후 2차 GnRH를 투여하여 약 24 시간 이내에 배란을 유도하는 방법이다. 이러한 Ovsynch 기법은 첫 번째 GnRH의 투여시에 기존에 존재하던 난포의 배란이 일어날 경우 새로운 난포파가 약 2일 후에 나타나며, $PGF_{2\alpha}$ 투여에 의해 앞서 배란되어 성장한 황체가 퇴행이 되며, 발육되던 난포가 제 2차 GnRH에 의해 배란되는 것이 중요 기전이다. 이러한 Ovsynch법이 수정란의 이식에도 이용되었다(Ambrose 등, 1999). 두 그룹의 연구에서 $PGF_{2\alpha}$ 투여 또는 Ovsynch법을 이용하여 동기화 처리 후 직접이식법에 의한 동결 수정란을 이식하여 결과를 비교하였다(Table 2, review Bo 등, 2002). 그들의 결과는 처리 전체 두수에 대한 수태율이 Ovsynch법 처리군이 높았으며, 보다 많은 수란우가 이식에 제공됨을 보여준다.

그러나 1차 GnRH 투여시 난포의 배란이 일어나지 않을 경우, 새로운 난포파의 발생이 나타나지 않으므로 2차 GnRH에 의한 배란동기화가 일어나지 않게 된다. 특히 미경산우에서 제 2차 GnRH 투여 전에 발정이 이미 발현되는 경우(premature estrus)가 나타난다. 따라서 Ovsynch program에서 progesterone제

Table 2. Pregnancy rates in recipients receiving embryos by "direct transfer" 7 d after a detected estrus following prostaglandin F_{2α} (PGF) treatment or following an Ovsynch treatment protocol without estrus detection

Group	n	Transferred/ treated (%)	Pregnant/ transferred(%)	Pregnant/ treated (%)
Heifers				
PGF/estrus detection	177	80/177 (45.2%) ^a	45/80 (56.3%) ^a	45/177 (25.4%) ^a
Ovsynch	168	122/168(72.6%) ^a	60/122 (49.2%) ^a	60/168 (35.7%) ^b
Heifers				
PGF/estrus detection	75	50/75 (66.6%)	34/50 (68.0%)	34/75 (45.3%)
Ovsynch	43	32/43 (74.4%)	24/32 (75.0%)	24/43 (55.8%)
Cows				
PGF/estrus detection	58	30/58 (51.7%)	18/30 (60.0%)	18/58 (31.0%)
Ovsynch	55	35/55 (63.6%)	20/35 (57.1%)	20/55 (36.4%)
Overall				
PGF/estrus detection	310	160/310 (51.6%)	97/160 (60.0%)	97/310 (31.3%) ^a
Ovsynch	266	189/266 (71.1%)	104/189 (55.0%)	104/266 (39.1%) ^b

^{a,b} Proportions in columns, within experiments or overall, with different superscripts differ significantly (P<0.05).

제를 7일간 장착해줌으로서 조기 배란의 결점을 보완하였다(Martinez 등, 2002). 다른 연구에서는 GnRH 투여 7일째 PGF_{2α}를 투여하고 그 후 발정을 조사(Heat-Watch system) 하였으며, 다른 2 군에서는 Ovsynch법을 이용하거나 (Ovsynch) Ovsynch법에 추가하여 7일간 SMB를 투여하고(Ovsynch+P) 직접이식법에 의한 동결-융해 수정란을 이식한 결과, 처음 처리 두수에 대한 전반적인 수태율은 차이가 없었으나, Ovsynch 및 Ovsynch+P군에서 보다 많은 수란우에 수정란을 이식하는 장점을 보여주었다(Table 3, Review Bo 등, 2002). 따라서, 이러한 배란동기화 방법을 수정란이식에 적용시 발정 관찰에 관계없이 수란우의 선발이 가능할 뿐만 아니라 제한된 축군내에서 수란우 선발이 용이하게 이루어질 수 있는 장점을 가진다.

Table 3. Pregnancy rates in recipients receiving an embryo by "direct transfer" 6 to 8 d after an observed estrus following GnRH on Day 0 and prostaglandin F_{2α} (PGF) on Day 7 or 7 d after the second GnRH injection in an Ovsynch protocol without (Ovsynch) or with a progestogen implant (Ovsynch+P) without estrus detection

Group	n	Transferred/ treated (%)	Pregnant/ transferred (%)	Pregnant/ treated (%)
GnRH+PGF/estrus detection	169	108/169 (63.9%) ^a	67/108 (62.0%) ^c	67/169 (39.6%)
Ovsynch	165	150/165 (90.9%) ^b	72/150 (48.0%) ^d	72/165 (44.0%)
Ovsynch+P	165	152/165 (92.1%) ^b	82/152 (53.9%) ^d	82/165 (49.7%)

Proportions within columns with different superscripts differ significantly (^{a,b} P<0.01; ^{c,d} P<0.07).

수란우의 혈중 progesterone 농도가 수정란이식의 수태율에 관계되는 요소로서 관계되었다(Thatcher 등, 2001). 수정란의 발달과 태아의 interferon- τ 를 분비하는 능력이 progesterone 농도와 관련됨이 밝혀졌다(Mann 등, 1999). 수정란 이식시 CIDR의 장착이 젖소의 수란우에서 12.8%의 수태율의 증가가 있었다고 보고되었다(Macmillan 등, 1994). 그러나 수정란 이식에 progesterone을 투여하는 것이 항상 수태율의 증가를 가져오는 것은 아니었으며, 황체가 불량한(작은) 미경산우에 PRID를 장착시 수태율의 증가가 있었다(Fuentes, 2000). 혈중 progesterone을 증가 시키기 위하여 시도되는 다른 방법은 수란우의 발정발현 후 5~7일경에 hCG의 투여로 난소내 존재하는 우세 난포를 배란시켜 부황체를 형성하는 것이다. Nishigai 등(2002)은 수란우의 발정 발현 후 6 일째에 hCG 1,500IU의 투여시 hCG를 투여하지 않은 대조군이나 발정 후 1일째에 hCG를 투여한 군에 비해 수정란 이식 후 수태율이 유의적으로 높았으며, 이러한 수태율의 향상은 황체 기능의 향상에 의한 것이라고 보고하였다. 혈중 progesterone을 증가시키는 또 다른 방법은 eCG의 투여로 다배란을 유기하는 것이다. Baruselli 등(2001)은 CIDR를 이용한 fixed-time embryo transfer program 적용 시 CIDR 장착 5일 후 eCG 800IU를 투여시 eCG를 투여하지 않은 대조군에 비해 배란 후 황체 수, 혈중 progesterone 농도 및 수태율이 증가 되었다고 보고하였다(Table 4).

Table 4. Mean (\pm SEM) number of CL, plasma progesterone (P4) concentrations (1 d prior to embryo transfer), and pregnancy rates in recipients treated with CIDR-B devices and estradiol/progesterone on Day 0 with or without 800IU eCG given on Day 5

Groups	n	CL numbers	P4 (ng/mL)	Selected/treated (%)	Preg./transferred (%)	Preg./treated (%)
Control	50	0.5 \pm 0.5 ^a	1.3 \pm 0.8 ^a	17/50 (34.0) ^a	5/17 (29.4)	5/50 (10.0) ^a
eCG	50	2.6 \pm 2.9 ^b	4.2 \pm 3.7 ^b	42/50 (84.0) ^b	21/38 (55.3)	21/50 (42.0) ^b

^{a,b} Means or percentages within columns with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

4. 결론

소에 있어서 수정란 이식은 능력 개량이나 이품종 이식에 의한 특정 품종의 증식 등을 위해 중요한 번식 수단으로 이용된다. 국내에서도 소의 수정란 이식 산업은 가축개량기관, 대학, 정부 및 지방자치단체, 농가, 기업 또는 개인 시술소의 지속적인 동참과 노력으로 괄목할 만한 발전이 이루어졌다. 그러나 안정적인 수정란의 생산 기술, 수정란이식을 위한 수란우의 확보 및 수태율의 향상이 여전히 해결해야 할 문제점으로 남아 있다. 최근에 연구가 진행되고 있는 공란우의 발정주기에 관계없이 과배란처리가 가능한 protocol 및 이와 동시에 1개월 이내의 간격으로 반복 과배란처리 기술, 그리고 수란우에 대한 fixed-time embryo transfer program의 적용이 수정란이식의 효율성의 개선에 도움이 되리라고 생각된다. 그러나 이러한 기술들의 더욱 심도 있는 연구와 동시에 현장에서의 실증 시험이 더욱 진행되어야 할 것으로 여겨진다.

참고문헌

- Adams GP. 1994. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle. Implications for synchronization and superstimulation. *Theriogenology*, 41:19-24.
- Ambrose JD, Drost RL, Monson RL, Rutledge JJ, Leibfried-Rutledge ML, Thatcher MJ, Kassa T, Binelli M, Hansen PJ, Chenoweth PJ and Thatcher WW. 1999. Efficacy of timed embryo transfer with fresh and frozen *in vitro*

- produced embryos to increase pregnancy rates in heat-stressed dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 82:2369-2376.
- Andrade JCO, Oliveira MAL, Lima PF, Santos Filho AS and Pina VMR. 2002. Use of steroid hormone treatments prior to superovulation in Nenore donors. *Anim. Reprod. Sci.*, 69:9-14.
- Barros CM, Porto LPC and Nogueira MFG. 2003. Dose-response trial in *Bos taurus* vs. *Bos indicus* cows superstimulated with FSH, associated with controlled LH surge and fixed-time artificial insemination. *Theriogenology*, 59:524.
- Baruselli P, Marques MO, Madureira EH, Costa Neto WP, Grandinetti RR and Bo G. 2001. Increased pregnancy rates in embryo recipients treated with CIDR-B devices. *Theriogenology*, 55:355.
- Bo GA, Adams GP, Pierson RA and Mapletoft RJ. 1996. Effect of progestogen plus estradiol-17 β treatment on superovulatory response in beef cattle. *Theriogenology*, 45:897-910.
- Bo GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tribulo R, Tribulo H and Mapletoft RJ. 2002. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, 57:53-72.
- Breuel KF, Baker RD, Butcher RL, Townsend EC, Inskeep EK, Dailey RA and Lerner SP. 1991. Effects of breed, age of donor and dosage of follicle stimulating hormone on the superovulatory response of beef cows. *Theriogenology*, 36:241-255.
- Bungartz L and Niemann H. 1994. Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. *J. Reprod. Fertil.*, 101:583-591.
- Casida LE, Meyer RK, Mcshan WH and Wisnicky W. 1943. Effects of pituitary gonadotropins on the ovaries and the induction superfecundity in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 4:76-79.
- Chandra YR, Narayan PG, Rajiv S, Sumant V and Sunder SS. 2002. Repeated superovulation in cattle using CIDR-B and porcine FSH. *Theriogenology*, 57:

- Fuentes S. 2000. Utilizacion de tratamientos hormonales para la sincronizacion de receptoras de embriones. *Producción Anim.*, 160:26-32.
- Gonzalez A, Lussier JG, Carruthers TD, Murphy BD and Mapletoft RJ. 1990. Superovulation of beef heifers with FOLLTROPIN: A new FSH preparation containing reduced LH activity. *Theriogenology*, 33: 519-529.
- Goulding D, Williams DH, Duffy P, Boland MP and Roche JF. 1990. Superovulation in heifers given FSH initiated either at day 2 or day 10 of the estrus cycle. *Theriogenology*, 34:767-778.
- Looney CR. 1986. Superovulation in beef females. *Proceedings of the 5th Annual American Embryo Transfer Association*, 16-29.
- Macmillan KL, Taufa VK and Hayman DL. 1994. Pregnancy rates in lactating dairy cows used as recipients for frozen/thawed embryos and receiving supplemental progesterone. *New Zealand Embryo Transfer Workshop, Hamilton, NZ*, 34-35.
- Mann GE, Lamming GE, Robinson RS and Wathes DC. 1999. The regulation of interferon- τ production and uterine hormone receptors during pregnancy. *J. Reprod. Fertil.*, 54(Suppl):317-328.
- Martinez MF, Kastelic JP, Adams GP, Cook B, Olson WO and Mapletoft RJ. 2002. The use of progestins in regimens for fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Theriogenology*, 57:1049-1059.
- Matoba S, Kawatai S, Masaki K, Kudo S and Saito N. 2002. Results of repeated superovulation in young Holstein heifers using FSH and estradiol benzoate, and the following fertility. *Theriogenology*, 57:767.
- 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.
- Nishisouzu T, Sugawara M, Aoki S, Dochi O, Kishi M and Koyama H. Effect of the interval between CIDR and estradiol benzoate administration and initiation of FSH injection on the superovulatory response in Japanese Black cattle.

- Theriogenology, 59:531.
- Pursley JR, Mee MO and Wiltbank MC. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 α and GnRH. *Theriogenology*, 44:915-923.
- Rajamahendran R, Canseco RS and Denbow CJ. 1987. Effect of low dose FSH given at the beginning of the estrus cycle and subsequent superovulatory response in Holstein cows. *Theriogenology*, 28:59-65.
- Rieger D, Walton JS, Goodwin ML and Johnson WH. 1991. The effect of co-treatment with recombinant bovine somatotropin on plasma progesterone concentration and number of embryos collected from superovulated Holstein heifers. *Theriogenology*, 35:863-868.
- Singh J, Domínguez M, Jaiswal R and Adams GP. 2004. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. *Theriogenology*, 62:227-243.
- Sugano M and Shinogi T. 1999. Superovulation induction in Japanese Black cattle by a single intramuscular injection of hMG or FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Anim. Reprod. Sci.*, 55:175-181.
- Thatcher WW, Moreira F, Santos JEP, Mattos RC, Lopez FL, Pancarci SM and Risco CA. 2001. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology*, 55:75-90.
- Thibier M. 2004. Stabilization of numbers of *in vivo* collected embryos in cattle but significant increases of *in vitro* bovine produced embryos in some parts of the world. *Embryo Transfer Newsl.*, 22:12-19.
- Tonhati H, Lobo RB and Oliveira HN. 1999. Repeatability and heritability of response to superovulation in Holstein cows. *Theriogenology*, 51:1151-1156.