

FISH 기법을 이용한 소 수정란의 성감별과 산자 생산

손 시 환 박사

진주산업대학교 동물생명학과

FISH기법을 이용한 소 수정란의 성감별과 산자 생산

손시환 · 박희성
진주산업대학교 동물생명과학과

The Production of Sex Determined Cattle by Embryonic Sexing Using Fluorescence *In Situ* Hybridization Technique

S. H. Sohn and H. Park

Department of Animal Science & Biotechnology, Jinju National University, Jinju 660-758

ABSTRACT

Sexing from bovine embryos fertilized *in vitro* implicates a possibility of the sex controlled cattle production. This study was carried out to produce the sex determined cattle through the embryonic sexing by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique. FISH was achieved in *in vitro* fertilized bovine embryos using a bovine Y-specific DNA probe constructed from the btDYZ-1 sequence. Using this probe, a male-specific signal was detected on 100% of Y-chromosome bearing metaphase specimens. The analyzable rate of embryonic sexing by FISH technique was about 93% (365/393) regardless of embryonic stages. As tested single blastomere by FISH and then karyotype with their biopsied embryos, the accuracy of sex determination with FISH was 97.6%. We tried the embryo transfer with sex determined embryos on 15 cattle. Among them, the 5 cattle delivered calf with expected sex last year.

(Key words : FISH, embryo sexing, single blastomere, cattle)

1. 서 론

소의 경우, 생식 보조술의 혁신적 기술개발에 힘입어 체외 수정란(*in vitro* fertilized embryos)의 생산 및 조작이 보다 쉽게 이루어지고 있으며, 최근에는 체세포를 이용한 핵 이식 수정란(nuclear transferred embryos)의 발생 성공에 힘입어 cloned animal의 생산까지 가능하게 되었다. 이러한 발생 공학적 기술이 급격히 발달함에 따라 체외 미세 조작된 수정란의 성의 식별이 용이하게 되었고, 이를 이용한 성 감별된 산자 생산이 가능하다.

이러한 성감별 수정란 이식의 실용화를 위해서는 성감별 과정 중 생검된 수정란의 생존성을 유지하고, 성감별의 정확성이 높아야 하며, 수정란 이식 후 수태율이 높아야 한다. 지금까지 수정

란의 성 감별법은 핵형 분석법(Wintenberger-Torres and Popescu, 1980; Picard *et al.*, 1985; Sohn *et al.*, 1996), H-Y 항체이용법(Wachtel *et al.*, 1975; White *et al.*, 1982; Anderson, 1987; Utsumi *et al.*, 1991) 및 X-linkage activity 측정법(Williams, 1986) 등 다양한 방법이 있으나, 정확도가 떨어지고 다소 기술적인 문제가 상존해 있다. 현재 수정란의 성 감별방법으로서 특정 DNA를 증폭하여 식별할 수 있는 Polymerase Chain Reaction(PCR) 분석방법이 가장 널리 알려져 있고, 실용적 접근을 시도하고 있는 실정이다. 본 방법은 상대적 효율성은 뛰어나나 매우 민감하여 비 특이적 염기서열 증폭으로 인한 오판의 가능성과 성 염색체 mosaicism의 경우 분석이 불가능한 문제점이 있다 (Herr & Reed, 1991; Bredbacka *et al.*, 1995; Lopes *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003). 최근 DNA의 상보적 결합의 특이성을 이용하여 특정유전자의 단편에 형광물질을 결합시켜 핵 또는 염색체에 접합 보인시킴으로 이들 유전자의 위치나 존재 유무를 확인할 수 있는 형광접합보인법(Fluorescent *in situ* Hybridization; FISH)이라는 분자세포유전학적 새로운 기술이 소개된 바 있다 (Klinger *et al.*, 1992; Delhanty *et al.*, 1993; Iannuzzi *et al.*, 2003). 이러한 원리를 이용하여 소의 Y-염색체 특이 DNA 단편을 probe로 제작하여 세포 및 수정란에 형광접합보인시킴으로서 개체의 성 식별이나 수정란의 성 감별이 가능하다고 보고되고 있다(Kobayashi *et al.*, 1998). FISH는 형광현미경 하에서 직접 probe의 접합 발현 유무를 확인할 수 있으므로 결과에 대한 정확도가 매우 높은 장점이 있는 반면, 다소 분석에 기술적 어려움과 상업용 probe이용시 분석 비용이 높은 단점이 있다.

따라서 본 연구에서는 보다 효율적인 FISH를 위한 소의 Y 염색체 특이 DNA probe(bovine Y-chromosome specific DNA probe)를 개발하고, 이를 이용하여 FISH 기법으로서 체외 수정란의 성 감별을 수행한 후 감별된 수정란을 이식하여 개체 생산을 시도하여 성 감별 개체 생산의 산업적 실용화를 모색하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

1) 소 체외수정란의 생산

본 연구에 사용된 난소는 경상남도 김해시 덕성산업에서 도살되는 한우 암소에서 채취 공시하였다. 도살 직후 양측 난소를 적출하여 실험실로 운반하고 항생제가 첨가된 생리식염수로 2~3회 세척한 다음 2~7 mm의 가시난포만을 골라 18 gauge 주사침이 부착된 주사기로 난소실질을 찢어 난포액을 흡입하여 이들 중 충실한 난포란만을 선별하였다. 난포란의 선별은 도립현미경하에서 4~5층의 난구세포층이 충만하면서 균일한 세포질을 가진 난포란을 선별하여 실험에 공시하였다.

난포란의 체외성숙 배양액으로는 TCM-199(Earle's salt, Sigma)의 기본 배양액에 sodium pyruvate (56 μ g/ml), penicillin G(100 units/ml), streptomycin(100 μ g/ml), LH(10 μ g/ml), FSH(35 μ g/ml), estradiol-17 β (1 μ g/ml) 및 10% Fetal Bovine Serum (Invitrogen Life Technologies, San Diego, CA,

USA)을 첨가 제조하였다. 난포란의 체외성숙을 위하여 39°C, 5% CO₂ incubator에서 18시간 이상 평형시킨 미소적배양액으로 4~5회 난포란을 세척한 다음, 과립막세포와 난관상피세포가 첨가되어 있는 체외성숙배양액에 22~24 시간동안 체외성숙을 유도하였다. 체외수정을 위한 정자의 준비는 정소상체 미부정자로써 caffeine(10 mM)이 첨가된 세척용 B.O. medium으로 98~99% 습도, 39°C, 5% CO₂ incubator에서 swimming-up을 실시하였다. Swimming-up을 유도하여 부유된 상층의 정자만을 채취하여 500 ×g에서 1회 5분간 원심분리한 후, 수정능획득을 위하여 BSA(5 mg/ml), caffeine(5 mM) 및 heparin(10 μg/ml)이 첨가된 수정용 B.O. medium을 5 ml 첨가하여 다시 원심분리한 후 약 1 ml의 수정용 B.O. medium을 첨가하여 CO₂ incubator에서 10~15 분간 처리하였다. 체외수정은 체외성숙된 난포란을 수정용 B.O. medium에 100 μl drop당 15~20개의 난포란을 옮기고 여기에 수정능이 획득된 활력이 좋은 정자를 1~2×10⁶ cells/ml이 되도록 농도를 조절하여 24 시간 동안 98~99% 습도, 39°C, 5% CO₂ incubator에서 수정을 유도하였다. 체외수정된 수정란은 10% FBS가 첨가되어 있는 TCM-199 배양액으로 4~5 회 세척하여 난구세포와 정자를 완전히 제거하고 동일 배양액과 monolayer cells이 형성된 난관상피세포 또는 과립막 세포에서 공배양을 하였다. 이후 48 시간마다 신선한 배양액으로 교환했으며, 5일이 경과한 monolayer cells은 신선한 monolayer cells로 교환하였다.

2) 수정란 성 감별을 위한 표본제작

배양 중인 수정란으로 부터 FISH를 위한 표본제작은 분열 중인 2 세포, 4세포, 8세포 및 상실배(morula)와 포배(blastocyst) 단계인 수정란을 이용하여 1~2개의 할구만을 흡입(aspiration) 공시하였다. 생검 방법은 수정란의 투명대를 laser로 drilling하고 1~2개의 할구를 squeezing하여 분리한 후 할구만을 흡입하였다. 한편 일부의 할구가 분리된 demi-embryo는 2일간 재 배양하여 배반포기 단계에서 이식하였다. 공시된 할구들의 분석은 일단 D-PBS로 씻고 0.05% protease에 2분 정도 정치시켜 세포막을 연화시킨 후 다시 D-PBS 용액으로 옮겼다. 연이어 이들 할구들의 세포 팽윤을 위하여 0.9% sodium citrate 용액으로서 5~10분간 저장처리(hypotonic treatment)를 하였다. 저장 처리된 할구는 0.05% tween 20에서 1~2분 처리하고 수세 후 슬라이드 상으로 옮겼다. 슬라이드에 옮겨진 할구를 관찰하면서 이 위에 methanol, 3: acetic acid, 1로 조성된 고정액을 1~2방울 떨어뜨렸다. 건조시킨 slide는 다시 2차 고정액으로서 20분간 침지한 후 말리고 위상차현미경을 이용하여 할구 유무를 확인하였다.

3) 소 Y-염색체 특이 DNA probe 제작과 형광접합보인법

본 연구에 이용된 Y-염색체 특이 DNA probe는 bovine male specific DNA로 알려진 btDYZ-1 (Perret *et al.*, 1990)의 일부 단편으로서 총 385bp 크기로 제작하였고, 이들 단편들을 Dig-PCR 방법

으로 labeling하였다. Dig-PCR의 방법은 Dig PCR labelling kit(Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN, USA)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 수행하였으며, 이용된 PCR primer는 w-5(5'-GTGTGTGTGCTGTTCTCAAC-3')와 w-3 (5'-CACACGACAAAATATTGCAC-3')으로 하였다.

FISH를 위하여 준비된 슬라이드 표본을 50 μ l RNase A(100 mg/ μ l; Sigma, St. Louis, MO, USA)가 함유된 50 ml의 2 \times SSC 용액에 넣고 37 $^{\circ}$ C의 항온 수조에서 30분간 처리하여 RNA를 제거한 후 초자수로 세척하고 80%, 90%, 100% 에탄올로 탈수시켜 상온에서 건조시켰다. 이 후 100 ng dig- labeled probe를 함유한 hybridization 용액(40% 4 \times SSC, 50% formamide and 10% dextran sulfate)을 표본 슬라이드에 떨어뜨리고 coverslip으로 덮은 후 rubber cement로 밀봉하였다. 이를 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 처리하여 probe와 표본을 변성시키고 다시 38.5 $^{\circ}$ C에서 2~6시간 동안 hybridization 시킨 후 2 \times SSC로 헹군 다음 PN buffer(0.1% sodium phosphate, 0.1% Nonidet P-40)로서 세척하였다. 접합 탐지를 위하여 슬라이드에 20 μ l의 anti-digoxigenin-fluorescein(Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN, USA)을 떨어뜨리고 coverslip을 덮은 후 38.5 $^{\circ}$ C에서 10분간 배양하였다. 이후 PN buffer로서 다시 세척하고 배경염색으로 propidium iodide solution을 20 μ l 떨어뜨린 후 coverslip으로 덮고 암소에서 건조시켰다. 형광 접합 발현 양상은 523 nm 파장대의 필터를 부착한 형광현미경(Olympus AX-70 with WIB filter)으로 검경하고 각 상을 digital CCD (DP-70, Olympus, Tokyo, Japan)로 획득한 후 probe의 접합 양상을 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

소의 체외 수정란에 대해 Y 염색체 특이 DNA probe를 이용하여 형광접합보인법(FISH)으로서 수정란의 성 감별을 수행하였다. 본 연구에 이용된 소의 Y-염색체 특이 프로브는 btDYZ-1 sequence의 일부로서 385-bp를 대상으로 Dig-labeling하여 제작하였다. 제작된 Y-염색체 특이 프로브의 신뢰성을 검증하기 위하여 정상 수소 및 암소의 백혈구 세포를 이용하여 염색체를 분리하고 이를 이용하여 FISH를 하였다. FISH 결과 소의 중기상에 있어 Y 염색체에만 특이적 접합 양상을 보이고, 다른 염색체에는 접합 양상이 나타나지 않았다. 뿐만 아니라 수컷의 간기상에는 명확한 하나의 FITC 접합 양상을 보이나, 암컷 세포의 경우 전혀 접합 양상이 나타나지 않았다(Fig. 1-a, b). 이러한 결과에 따라 본 연구에 이용된 Y 염색체 특이 프로브의 신뢰성이 확인되었고, 이를 이용하여 수정란의 성 감별을 시도하고자 하였다.

수정란의 성의 식별을 위하여 우선 배양중인 배아에 일정량의 colcemid를 투여하고 일부 할구로부터 중기상을 유도하였다. 초기 배 발생 단계별 각 수정란을 대상으로 표본을 제작하고 이를 FISH하여 중기상 및 간기상에 Y-프로브의 접합 양상을 관찰하였다. 관찰 결과 Y-염색체를 가진 수정란의 경우 Y 염색체 및 모든 간기상에 각기 한 개의 뚜렷한 FITC 접합양상이 나타났고, XX 염색체를 지닌 수정란의 경우 어디에서도 FITC 형광 접합 양상을 찾을 수 없었다(Fig. 1-c, d, e, f).

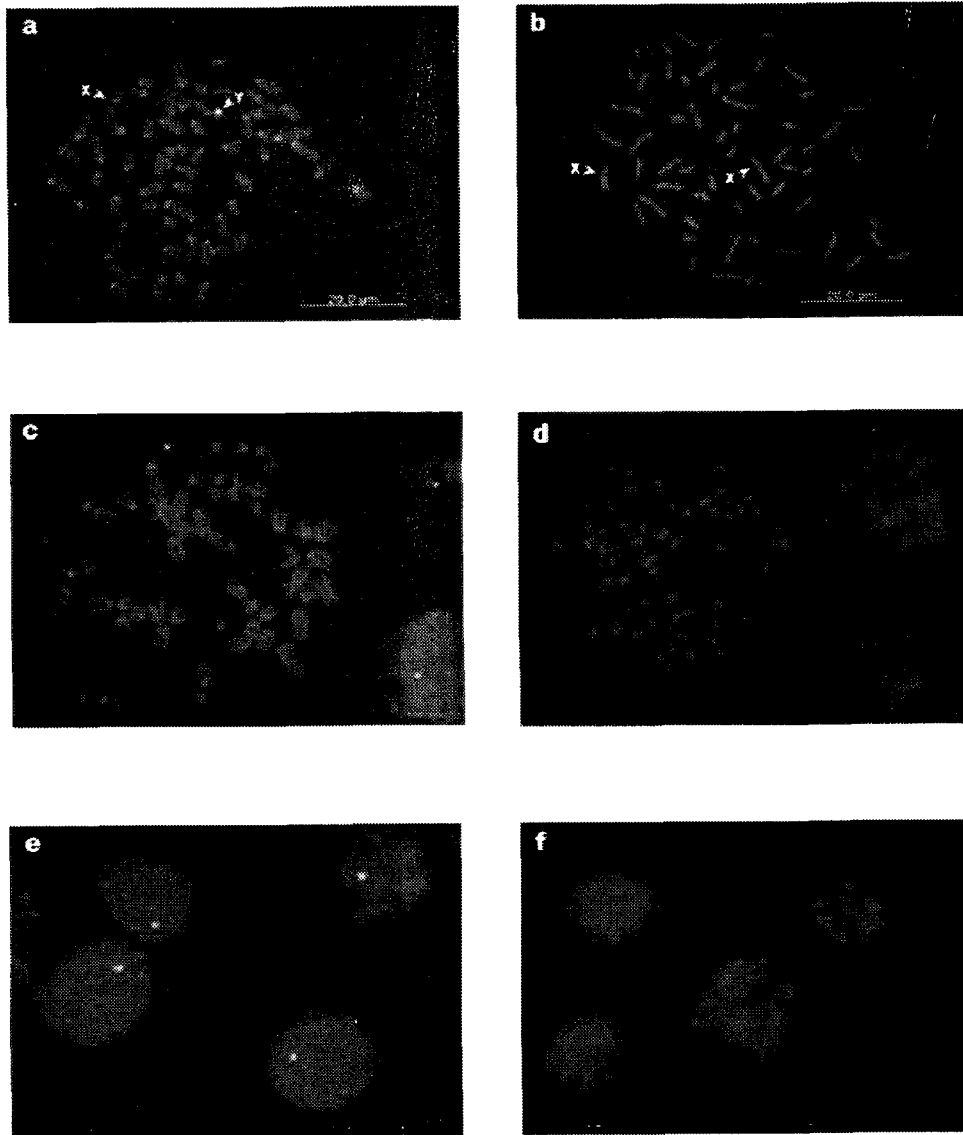


Fig. 1. Metaphase spreads and interphase nuclei with fluorescence *in situ* hybridization using a bovine Y-specific probe; metaphase spread from male lymphocytes (a), metaphase spread from female lymphocytes (b), metaphase spread from bovine embryo consisting of XY chromosomes (c), metaphase spread from bovine embryo consisting of XX chromosomes (d), interphase nuclei from blastomeres, predicting as male (e), interphase nuclei from blastomeres, predicting as female (f).

이러한 일관된 접합 양상의 결과로서 FITC 접합이 있는 경우 수컷 배자로 판단하고, 접합 양상이 없는 경우 암컷 배자로서 수정란의 성을 판단하였다. Table 1은 공시된 체외수정란의 할구에 대한 Y-프로브의 접합 비율을 분석한 결과이다. 분석에 공시된 체외수정란은 총 250개로 이들 중 232개(92.8%)의 수정란에 대한 FISH 분석이 가능하였다. 이들 중 102개(44.0%)가 FITC 접합 양상을 보이고, 130개(56.0%)는 접합 시그널이 보이지 않았다. 이러한 결과에 따라 FITC 접합 양상을 보인 102개의 수정란은 수컷으로 판단되며, 나머지는 암컷으로 판단된다. 초기 배자의 분열 시기별

Table 1. Analysis of in vitro fertilized bovine embryos with FISH using a bovine Y-specific probe

Stage of embryos	Number (%) of embryos			
	Examined	Analyzable	with Dig-signal*	without Dig-signal
8-cell	63	51 (80.9)	22 (43.1)	29 (56.9)
16-cell	18	17 (94.4)	8 (47.1)	9 (52.9)
Morula	70	68 (97.1)	31 (45.6)	37 (54.4)
Blastocyst	99	96 (97.0)	41 (42.7)	55 (57.3)
Total	250	232 (92.8)	102 (44.0)	130(56.0)

* The Dig-signal implicates the presence of Y-chromosome.

암수의 분리비는 큰 차이를 보이지 않았으나 분석 효율면에 있어 8-세포기 상태에서 분석이 다소 다른 시기에 비해 떨어지는 경향이 있었다.

이상의 결과를 바탕으로 생검된 단일 할구(blastomere)를 FISH 기법으로 Y-염색체 유무를 확인하고 한편으로 할구 분리한 demi-embryo는 1일간 재 배양하여 중기상을 유도하여 핵형분석한 후 할구에서의 분석 결과와 비교 검토하였다. Table 2에 생검된 할구의 FISH 결과와 이들 demi-embryo의 핵형분석 결과를 제시한 것으로 전체 분석란에서 97.6%의 일치도를 보였으며, 특히 상실배 이상의 배자에서는 100%의 일치도를 나타내었다. Fig. 2는 단일 할구에서의 probe의 접합 양상으로 핵내 FITC의 발광이 나타나면 Y-염색체의 존재를 의미하는 것으로 수컷 수정란으로 판단하고, 이의 접합 양상이 없으면 암컷 수정란으로 예측한다. 이상의 실험적 분석 결과들을 바탕으로 총 15두의 공시축에 성 감별된 수정란을 이식한 결과 7두에서 임신이 확인되었고, 이들 중 5두가 출산되었다(Table 3, Fig. 3). 출산된 개체의 성은 FISH로서 예견한 성과 100% 일치됨을 보였다. 따

Table 2. Sexing of single blastomere by FISH and karyotyping with biopsied embryos

Stage of embryos	Blastomeres		Chromosome analysis from biopsied embryos with		Accuracy (%)
	with Dig-signal	without Dig-signal	XY	XX	
8-16 cells	40	31	42	29	95.2
Morula & blastocyst	6	6	6	6	100.0
Total	46	37	48	35	97.6

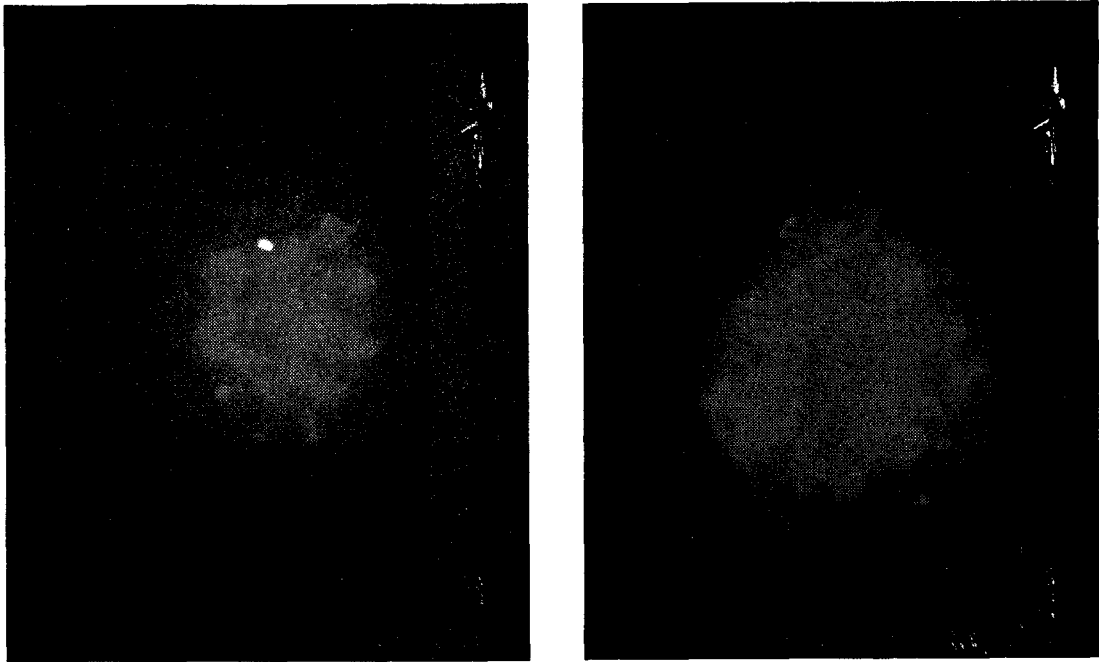


Fig. 2. Single blastomere nuclei spread with fluorescence *in situ* hybridization using a bovine Y-specific probe.

Table 3. The result of sexed embryo transfer and pregnancy

Cattle ID	Date of E.T	Date of pregnancy diagnosis	Result of pregnancy	Embryo sex	Date of delivery	Calf sex
11	05.05.21	05.07.14	X	XY	-	
16	05.05.21	05.07.13	X	XX	-	
91	05.05.24	05.07.15	○	XY	X	
21	05.05.23	05.07.16	○	XX	06.03.05	XX
112-1	05.06.03	05.07.27	X	XX	-	
94	05.06.03	05.07.27	○	XY	06.03.13	XY
58	05.05.23	05.07.16	○	XY	X	
13	05.07.04	05.09.11	○	XX	06.04.15	XX
57	05.07.14	05.09.11	○	XX	06.04.28	XX
04-19	05.07.21	05.09.11	X	XX	-	
75	05.07.12	05.09.11	X	XY	-	
73	05.07.04	05.09.21	○	XX	06.04.12	XX
2	05.07.28	05.09.21	X	XX	-	
3120	05.07.14	05.09.29	X	XY	-	
38	05.07.28	05.09.29	X	XY	-	

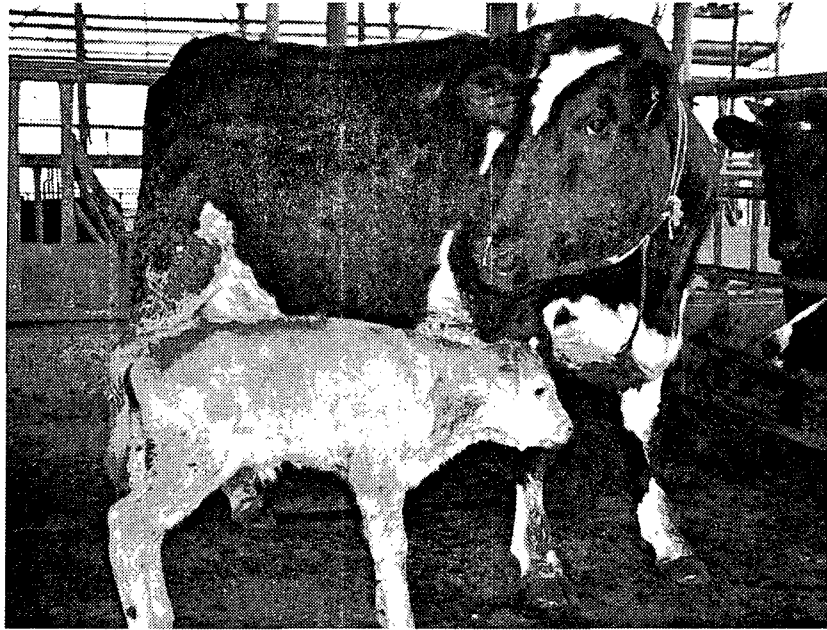


Fig. 3. Embryonic sex determined calf and her recipient mother.

라서 본 연구에서 적용한 FISH 기법은 수정란의 성감별에 효율성이 높고 매우 높은 정확성을 나타냄에 따라 실질적으로 성감별 수정란의 대량생산이 가능할 것으로 사료되며, 농가차원에서 산업적 실용화가 될 수 있을 것으로 기대한다.

4. 적 요

본 연구에서는 소의 체외 수정란에 대해 Y 염색체 특이 DNA 표지를 이용하여 FISH 기법으로서 수정란의 성감별을 수행하고 이를 이식하여 산전 성감별 개체 생산을 시도하였다. 본 연구에 이용된 Y-염색체 특이 DNA probe는 bovine male specific DNA로 알려진 btDYZ-1의 385bp 단편으로 제작하였고, Dig-PCR 방법으로 labeling하였다. 수정란의 성감별은 IVF로서 생산된 8 cell~blastocyst 단계의 수정란을 공시하고 이들로부터 단일할구를 생검하여 분석하였다. 생검 방법은 투명대를 laser로 drilling하고 1~2개의 할구를 squeezing하여 분리하였으며 demi-embryo는 1일간 재배양하여 배반포기 단계에서 이식하였다. 우선, 본 probe의 신뢰성을 검정하기 위하여 생검된 할구는 FISH 기법으로 Y 염색체 존재 여부를 판단하고, 이의 demi-embryo는 재배양하여 중기상을 유도하여 핵형분석한 후 비교 검토한 바 97.6%의 일치율을 나타내었다. 한편, 수정란에서 성감별을 위한 FISH의 적용 여부를 검토하고자 총 393개의 공시란 중 365개(93%)가 분석이 가능하였고, 이들 중 45.8%가 Y 염색체 특이적 접합 발현 양상이 나타났다. 본 결과를 토대로 경남 진주 인근 지역 농장의 15두의 소를 대상으로 성 감별 수정란을 이식한 결과, 7두가 임신한 것으로 확인되었고 이들 중 5마리가 출산하였다. 뿐만 아니라 출산된 송아지들은 모두 예견된 성과 100% 일치

하는 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서 적용한 FISH 기법은 수정란의 성감별에 효율성이 높고 매우 높은 정확성을 나타냄에 따라 실질적으로 성감별 수정란의 대량생산이 가능할 것으로 사료되며, 농가차원에서 산업적 실용화가 될 수 있을 것으로 기대한다.

참고문헌

- Anderson GB. 1987. Identification of embryonic sex by detection of H-Y antigen. *Theriogenology*, 27: 81-97.
- Bredbacka P, Kankaanpaa A and Peippo J. 1995. PCR-sexing of bovine embryos: a simplified protocol. *Theriogenology*, 44:167-176.
- Delhanty JD, Griffin DK, Handyside AH, Harper J, Atkinson GH, Pieters MH and Winston RM. 1993. Detection of aneuploid and chromosomal mosaicism in human embryos during preimplantation sex determination by fluorescent *in situ* hybridization (FISH). *Hum. Mol. Genet.*, 2:1183-1185.
- Herr CM and Reed KC. 1991. Micromanipulation of bovine embryos for sex determination. *Theriogenology*, 35:45-54.
- Iannuzzi L, Di Meo GP, Perucatti A, Schibler L, Incarnato D, Gallagher D, Eggen A, Ferretti L, Cri-biu EP and Womack J. 2003. The river buffalo (*Bubalus bubalis*, 2n = 50) cytogenetic map: assignment of 64 loci by fluorescence in situ hybridization and R-banding. *Cytogenet. Genome. Res.*, 102:65-75.
- Klinger K, Landes G, Shook D, Harvey R, Lopez L, Locke P, Lemer T, Osathanondh R, Leverone B and Houseal T. 1992. Rapid detection of chromosome aneuploidies in uncultured amniocytes by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Am. J. Hum. Genet.*, 51:55-65.
- Kobayashi J, Sekimoto A, Uchida H, Wada T, Sasaki K, Sasada H, Umezumi M and Sato E. 1998. Rapid detection of male-specific DNA sequence in bovine embryos using fluorescence in situ hybridization. *Mol. Reprod. Dev.*, 51:390-394.
- Lee JH, Park HH, Choi EJ, Yoon JT, Park CH, Lee SH, Im KS and Jin DI. 2003. Frequency of sex chromosomal mosaicism in bovine embryos and its effects on sexing using a single blastomere by PCR. *Zygote*, 11:87-93.
- Lopes RFF, Forell F, Oliveira ATD and Rodrigues JL. 2001. Splitting and biopsy for bovine embryo sexing under field conditions. *Theriogenology*, 56:1383-1392.
- Park JH, Lee JH, Choi KM, Joung SY, Kim JY, Chung GM, Jin DI and Im KS. 2001. Rapid sexing of preimplantation bovine embryo using consecutive and multiplex polymerase chain reaction(PCR)

- with biopsied single blastomere. *Theriogenology*, 55:1843-1853.
- Perret J, Shia YC, Fries R, Vassart G and Georges M. 1990. A polymorphic satellite sequence maps to the pericentric region of the bovine Y chromosome. *Genomics*, 6:482-490.
- Picard L, King WA and Betleridge KJ. 1985. Production of sexed calves from frozen thawed embryos. *Vet. Rec.*, 117:603-608.
- Sohn SH, Park CS and Song SH. 1996. Sexing by the chromosome analysis of *in vitro* fertilized embryos in cattle. *Kor. J. Animal Reprod.*, 20:179-190.
- Utsumi K, Satoh E and Iritani A. 1991. Sexing of rat embryos with antisera specific for male rats. *J. Exp. Zoology*, 260:99-105.
- Wachtel SS, Ohno S, Koo GC and Boyse EA. 1975. Possible role of H-Y antigen in the primary determination of sex. *Nature*, 257:235-236.
- White KL, Lindner GM, Anderson GB and BonDurant RH. 1982. Survival after transfer of sexed mouse embryos exposed to H-Y antisera. *Theriogenology*, 18:655-662.
- Williams TJ. 1986. A technique for sexing mouse embryos a visual colorimetric assay of the X-linked enzyme, glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Theriogenology*, 25:733-739.
- Wintenberger-Torres S and Popescu C. 1980. Transfer of cow blastocysts after sexing. *Theriogenology*, 14:309-318.