

## 卵丘, 卵管 上皮細胞 및 子宮 內膜細胞와의 共同培養이 돼지 卵胞卵의 體外受精 및 分割率에 미치는 影響에 관한 研究

金相根, 金明憲\*, 金武剛, 李揆丞\*\*

忠南大學校 獸醫科大學

### Studies on the Effects of Co-Culture with Cumulus Cells, Oviduct Epithelial Cells and Uterine Endometrial Cells on *in-vitro* Fertilization and Cleavage Rate of Porcine Oocytes

Kim S.K., M.H. Lee, M.K. Kim and K.S. Lee

College of Vet. Med., Chungnam Natl. Univ.

#### SUMMARY

The studies were carried out to investigate the effects of co-culture with cumulus cell, oviduct epithelial cells and uterine endometrial cells on the *in-vitro* fertilization and cleavage rate of porcine follicular oocytes. The ovaries were obtained from slaughtered swine. The follicular oocytes surrounded with cumulus cells were recovered by aspirating follicular fluids from the visible follicles of diameter 3~5mm. The follicular oocytes were cultured in TCM-199 medium containing hormones and 10% FCS for 24~48 hrs in a incubator with 5% CO<sub>2</sub> in air at 38.5°C and then matured oocytes were again cultured for 12~18 hrs with motile capacitated sperm by preincubation.

The results obtained in these experiments were summarized as follows :

1. The *in-vitro* maturation and fertilization rate of porcine oocytes co-cultured with cumulus cells in TCM-199 medium were 64.6%~74.5% and 37.5%~55.3%, respectively. And *in-vitro* fertilization rate of cumulus-enclosed oocytes(51.5%) were significantly( $p<0.05$ ) higher than cumulus-denuded oocytes(21.7%).
2. The *in-vitro* maturation and fertilization rate of porcine oocytes co-cultured with  $1\times 10^4$  cells/ml,  $1\times 10^6$  cells/ml,  $1\times 10^8$  cells/ml and  $1\times 10^{15}$  cells/ml oviduct epithelial cells in TCM-199 medium were 53.5% and 37.2%, 61.7% and 46.8%, 54.5% and 31.8%, 42.2% and 26.7%, respectively.
3. The *in-vitro* maturation and fertilization rate of porcine oocytes co-cultured with  $1\times 10^6$ /ml,  $1\times 10^8$ /ml,  $1\times 10^{15}$ /ml uterine endometrial cells in TCM-199 medium were 54.3% and 39.1%, 58.3% and 43.8%, 55.5% and 33.3%, and 45.7% and 30.4%, respectively.
4. When the *in-vitro* fertilized oocytes were co-cultured with porcine cumulus cells, oviduct epithelial cells and uterine endometrial cells, the development rate to the blastocyst stage was 9.5%, 10.7%

\* : 忠南大學校 大學院(Graduate School, Chungnam Natl. Univ.)

\*\* : 忠南大學校 農科大學(Coll. of Agri., Chungnam Natl. Univ.)

and 11.8%, respectively and the rates were higher than that of control, 2.1%( $p < 0.05$ ).

## I. 緒 論

돼지 初期胚와 卵丘세포, 또는 卵管 上皮細胞와의 共同培養에 의해 8~16 세포의 cell block 현상의 극복과 체외수정율의 개선 및 배반포로의 발생율도 향상시킬수 있다(Crister등, 1986; Eyestone등, 1987; Kajihara등, 1987; Lu등, 1987, 1988; Eyestone과 First, 1989).

卵丘細胞는 progesterone과 estradiol-17 $\beta$ 의 2종류와 steroid hormone(Hamberger등, 1978; Henderson등, 1987)과 pyruvic acid(Donahue와 Stern, 1968)나 특이적 단백질(Landerfeld등, 1978)을 분비하며 卵丘細胞의 대사에 의해 배양액중에 포함된 胚의 발육억제물질이 제거된다. 卵丘細胞 및 卵丘細胞와 子宮 內膜細胞와의 共同培養은 卵胞卵의 성숙율과 수정율의 증가 및 胚盤胞로의 발생율의 향상을 가져온다고 하며 共同培養한 胚를 이식했을때 유의하게 수태율이 높았다고 보고하였다(Kajihara등, 1991). 이들의 보고들을 살펴보면 研究者간에 論旨가 일치하지 않을 뿐만 아니라 돼지 卵胞卵과의 卵管 上皮細胞 및 子宮 內膜細胞의 농도에 따른 共同培養에 대한 결과는 접할 수 없었다.

이에, 본 연구는 돼지 卵胞卵의 체외수정에 따른 卵丘細胞, 卵管 上皮細胞 및 子宮 內膜細胞와의 共同培養이 體外成熟率과 受精率 및 胚盤胞로의 발생율에 미치는 영향을 구명하고자 배양액에 卵丘細胞, 卵管 上皮細胞 및 子宮 內膜細胞를 첨가하여 共同培養하였을 때 體外成熟率과 受精率 및 胚盤胞로의 발생율에 미치는 영향을 검토하기 위해 본 실험을 수행하게 되었다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 卵胞卵의 回收

屠殺豚의 卵巢로부터 주사기로 卵胞液을 흡입하여 watchglass에 채취한 후 實體顯微鏡(20~40 $\times$ )하에서 卵胞卵을 회수하여 배양액으로 3회 세척하였다. 기본배양액은 TCM-199(Whittaker, M.A., Bioproducts Co. USA)로 10%(v/v)의 FCS와 1 $\mu$ g/ml의 FSH(Sigma, USA), 21U/ml의 HCG, 1 $\mu$ g/ml

의 17 $\beta$ -estradiol(Sigma, USA), 100IU/ml의 penicillin G 및 100 $\mu$ g/ml의 streptomycin sulfate가 첨가된 培養液을 이용하였다.

### 2. 卵胞卵의 體外受精

배양액 50 $\mu$ l 小滴을 mineral oil(Squibb Co., USA)로 피복하여 CO<sub>2</sub> 배양기내(5% CO<sub>2</sub>, 95% air, 38.5 $^{\circ}$ C)에서 5~6시간 平衡시킨 배양액내 小滴當 5개의 卵胞卵을 浸漬하여 48시간 성숙시킨 卵胞卵 5개를 45 $\mu$ l의 受精用 培養液 小滴에 주입한 후, 受精用 배양액 1ml에 정액 0.2ml를 혼합하여 CO<sub>2</sub> 배양기에서 swim-up 처리후, 上層液을 2,000 rpm으로 10분간 2회 遠心分離하여 세척하고 精子塊를 동량의 100 $\mu$ g/ml의 heparin(Sigma, USA)이 첨가된 BO액으로 희석하여 15분간 CO<sub>2</sub> 培養器에서 受精能獲得 誘起시킨 精子浮遊液 2 $\mu$ l(1.5 $\times 10^6$ /ml)로 媒精하였다.

### 3. 受精 및 發生의 判定

卵胞卵은 媒精후 24시간에 일부의 난자는 0.1% hyaluronidase(Sigma, USA)에 의해 卵丘細胞를 제거한 후 slide glass에 滴下하여 25% acetic acid에 24~48시간 固定한 다음 1% acetic-orcein으로 染色하여 成熟과 受精與否를 判定하였으며, 또한 受精卵을 12~24시간 간격으로 圓球數 또는 形態學的 관찰에 의해 胚發生을 判定하였다(Shea등, 1976; Ball등, 1984).

## III. 結果 및 考察

### 1. 卵丘細胞의 添加에 따른 體外成熟 및 受精率

돼지 난포란과 10%의 FSH와 성숙 난구세포를 첨가한 배양액에서 共同培養하였을때 體外成熟率과 受精率은 Table 1에 나타난 바와 같다.

10%의 FSH와 1 $\times 10^4$  cells/ml의 성숙 卵丘細胞를 첨가하여 共同培養하였을때 體外成熟率과 受精率은 각각 73.3%와 51.1%였으며, 또한 1 $\times 10^6$  cells/ml, 1 $\times 10^8$  cells/ml, 1 $\times 10^{15}$  cells/ml의 성숙 卵丘細胞를 첨가하여 共同培養하였을때 體外成熟率과 受精率은 각각 74.5%와 55.3%, 68.2%와 47.7%, 64.6%와 37.5%로서 난구세포를 1 $\times 10^{15}$  cells

/ml로 고농도로 첨가했을 때 체외수정율은 감소하였다.

난포란을 형태적으로 卵丘細胞 附着卵子和 裸化卵子로 분류하여 난구세포와 共同培養하였을 때 체외수정율은(Table 2) 각각 52.2%와 21.7%로서 유의한 증가결과를 나타냈으며( $p < 0.05$ ), 또한 난구세포 附着卵자의 체외수정율이 나화난자에 비해 높게 나타났다.

이러한 결과는, 培養液에 成熟 卵丘細胞를 첨가했을 때 體外受成熟率 및 受精率이 향상된다고 한 Ball등(1983) 및 Crister등(1986)과 난구세포 부착난자는 나화난자에 비해 성숙율과 수정율이 높다는 Leibfried와 First(1979), Fukui와 Sakuma(1980), Sirard등(1988) 등의 보고와 일치하였다.

2. 卵管 上皮細胞의 첨가에 따른 體外成熟 및 受精率  
돼지 난포란과 10%의 FSH와 成熟 卵管 上皮細胞를 첨가한 배양액에서 共同培養하였을 때 體外成熟率과 受精率은 Table 3에 나타난 바와 같다.

10%의 FSH와  $1 \times 10^4$  cells/ml의 성숙 卵管 上皮細胞를 배양액에 첨가하여 共同培養하였을 때 體外成熟率과 受精率은 각각 53.5%와 37.2%였으며, 10%의 FSH와  $1 \times 10^6$  cells/ml의 卵管 上皮細胞와 공동배양하였을 때 體外成熟率과 受精率은 각각 61.7%와 46.8%였다. 또한,  $1 \times 10^8$  cells/ml 및  $1 \times 10^{15}$  cells/ml의 난관 상피세포와 공동배양하였을 때 體外成熟率과 受精率은 각각 54.5%와 37.8%, 42.2%와 26.7%였다.

이러한 결과는 卵胞卵의 체외수정시 卵管 上皮細胞를 첨가한 배양액에서 공동배양하였을 때 대조군보다 다소 증가하였으나 난구세포의 첨가에 따른 공배양시의 수정율에 비해 낮은 수정율을 나타냈다. 또한, 卵胞卵과 卵管 上皮細胞와 共同培養하였을 때 대조군에 비해 체외발생율이 높다는 Eyestone과 First(1989)의 보고와 다소 일치하였다. 卵管 單層細胞가 初期胚의 체외발생에 영향을 미치는 기전은 명확하게 알려져 있지 않으나, 배양액내로 난관 단층세포에 의한 發生

**Table 1. Effects of a various concentration of cumulus cell added to culture media on *in vitro* maturation and fertilization rates of porcine oocytes**

No. of cumulus cells/ml	No. of oocytes examined	No. of oocytes matured(%)*	No. of oocytes fertilized(%)
$1 \times 10^4$	45	33(73.3)	23(51.1)
$1 \times 10^6$	47	35(74.5)	26(55.3)
$1 \times 10^8$	44	30(68.2)	21(47.7)
$1 \times 10^{15}$	48	31(64.6)	18(37.5)

\*The number of oocytes matured to the second matapase

**Table 2. Effects of a cumulus-enclosed and denuded oocytes co-cultured with cumulus cells matured added to culture media on *in vitro* fertilization rate of porcine oocytes**

Oocytes	Cumulus cells ( $1 \times 10^6$ /ml)	No. of examined oocytes	No. of ova fertilized(%)		
			Total	Normal	Abnormal
Cumulus – enclosed	0.0	44	41(93.2)	14(31.8)	26(59.2)
	1.0	47	45(95.7)	31(65.9)	13(27.7)
	5.0	45	41(91.1)	25(55.6)	17(37.8)
	Total	136	127(93.4)	70(51.5) <sup>a</sup>	56(41.2)
Cumulus – denuded	0.0	46	37(80.4)	7(15.2)	30(65.2)
	1.0	48	41(85.4)	13(27.1)	28(58.3)
	5.0	44	34(77.3)	10(22.7)	24(54.5)
	Total	138	112(81.2)	30(21.7) <sup>b</sup>	82(59.4)

a, b : Percentage followed by different letters within the same column differ significantly( $p < 0.05$ )

**Table 3. Effects of a various concentration of oviduct epithelial cells added to culture media on *in vitro* maturation and fertilization rates of porcine oocytes**

No. of cumulus cells /ml	No. of oocytes examined	No. of oocytes matured(%)*	No. of oocytes fertilized(%)
1×10 <sup>4</sup>	43	23(53.5)	16(37.2)
1×10 <sup>6</sup>	47	29(61.7)	22(46.8)
1×10 <sup>8</sup>	44	24(54.5)	14(31.8)
1×10 <sup>15</sup>	45	19(42.2)	12(26.7)

\*The number of oocytes matured to the second matapase

刺戟因子가 분비되거나 또는 배양액내의 發生抑制物質을 제거함으로써 그 효과를 나타내는 것으로 고찰된다.

### 3. 子宮 內膜細胞의 添加에 따른 體外成熟率 및 受精率

10%의 FSH와 子宮 內膜細胞를 첨가한 培養液에서 돼지 난포란과 共同培養하였을때 體外成熟率과 受精率은 Table 4에 나타난 바와 같다.

10%의 FSH와 1×10<sup>4</sup> cells/ml의 子宮 內膜細胞를 배양액에 첨가하여 공동배양하였을때 體外成熟率과 受精率은 각각 54.3%와 39.1%였으며, 10%의 FSH와 1×10<sup>6</sup> cells/ml의 자궁 내막세포를 첨가하였을때의 體外成熟率과 受精率은 각각 58.3%와 43.8%였다. 또한, 1×10<sup>8</sup> cells/ml 및 1×10<sup>15</sup> cells/ml의 자궁 내막세포를 첨가하여 공동배양하였을때 體外成熟率과 受精率은 각각 55.6%와 33.3%, 45.7%와 30.4%였다.

卵胞卵과 子宮 內膜細胞를 첨가한 培養液에서 공동배양하였을때 體外成熟率과 受精率은 대조군에 비해 미미한 증가를 나타냈으나 큰 차이는 인정되지 않았다. Kajihara등(1991)은 난구세포를 이용한 體外培養

系에 子宮 內膜細胞를 첨가한 경우 체외수정후 2일제에 첨가하는 것이 체외발생율에 유효하다고 보고하였다.

### 4. 卵丘細胞, 卵管 上皮細胞 및 子宮 內膜細胞의 첨가에 따른 體外發生率

초기 胚와 10%의 FSH와 卵丘細胞, 卵管 上皮細胞 및 子宮 內膜細胞를 첨가한 배양액에서 共同培養하였을때 胚盤胞로의 體外發生率은 Table 5에 나타난 바와 같다.

卵丘細胞, 卵管 上皮細胞 및 子宮 內膜細胞를 첨가한 배양액에서 初期 胚와 共同培養하였을때 胚盤胞로의 발달율은 난구세포, 난관 상피세포 및 자궁 내막세포와 共同培養하였을때 각각 9.5%, 10.7% 및 11.8%로서 대조구의 2.1%에 비해 유의적으로 높았다(p<0.05).

이러한 결과는 卵胞卵을 체외수정후 난구세포와 共同培養하였을때 桑實胚 및 胚盤胞로의 발생율이 21.1%와 15.1%라고 한 Goto등(1988)과 7.5%와 17.2%라고 한 Nakao와 Nakatsuji(1990) 및 12.6%와 25.9%라고 한 Goto 등(1989)과 Kajihara(1990)

**Table 4. Effects of a various concentration of uterine endometrial cells added to culture media on *in vitro* maturation and fertilization rates of porcine oocytes**

No. of cumulus cells /ml	No. of oocytes examined	No. of oocytes matured(%)*	No. of oocytes fertilized(%)
1×10 <sup>4</sup>	46	23(54.3)	18(39.1)
1×10 <sup>6</sup>	48	28(58.3)	21(43.8)
1×10 <sup>8</sup>	45	25(55.6)	15(33.3)
1×10 <sup>15</sup>	46	21(45.7)	14(30.4)

\*The number of oocytes matured to the second matapase

**Table 5. Effects of co-culture with cumulus cells oviduct epithelial cells and uterine endometrial cells on development rate of in vitro fertilized porcine oocytes**

Co-culture system	No. of oocytes	No. of oocytes developed to			
		2~4 cells	5~8 cells	9~16 cells	Blastocyst(%)
Control	95	5	13	11	2( 2.1) <sup>b</sup>
Cumulus cells	105	8	16	17	10( 9.5) <sup>b</sup>
OEC*	112	10	21	28	12(10.7) <sup>b</sup>
UEC**	110	13	16	21	13(11.8) <sup>b</sup>

\*Oviduct epithelial cells

\*\* : Uterine endometrial cells

a,b : Percentage followed by different letters within the same column differ significantly(p<0.05)

등의 결과에 비해 비교적 낮은 성적이었다. 한편 Shi 등(1990)은 胚의 體外受精 및 發生率은 정자를 제공한 숫소의 個體差가 크다고 하였으며, Kajihara(1987)은 배반포로의 발생에 난구세포가 필수적이라고 하였으나 Fukuda등(1990)은 수정후 96시간 이후에는 그 존재가 필수적이지 아니며 난구세포가 初期 胚 발생에 필요한 인자를 생산한다고 보고하였다.

#### IV. 摘 要

본 研究는 돼지 卵胞卵의 體外수정에 따른 卵丘細胞, 卵管 上皮細胞 및 子宮 內膜細胞와의 共同培養이 體外受精率 및 胚盤胞의 발생율에 미치는 영향을 구명하고자 배양액에 卵丘細胞, 卵管 上皮細胞 및 子宮 內膜細胞를 첨가하여 卵胞卵과 초기배와 共同培養하였을 때 體外수정율과 體外발생율은 다음과 같다.

1. 돼지 卵胞卵의 體外受精에 있어서 배양액에 卵丘細胞를 첨가하여 共同培養하였을 때 體의 성숙율과 수정율은 각각 64.6%~74.5%와 37.5~55.3%였으며, 또한 卵丘細胞를 첨가한 배양액에서 난구세포 부착난자와 나화난자와의 공동배양에 따른 體外수정율은 21.7%의 裸化卵子에 비해 51.5%의 卵丘細胞 附着卵子가 유의하게 높게 나타났다(p<0.05).
2. 돼지 卵胞卵의 體外受精에 있어서 배양액에 1×10<sup>4</sup> cells/ml, 1×10<sup>6</sup> cells/ml, 1×10<sup>8</sup> cells/ml, 및 1×10<sup>15</sup> cells/ml의 卵管 上皮細胞를 첨가하여 共同培養하였을 때 體外성숙율과 수정율은 각각 53.5%와 37.2%, 61.7%와 46.8%, 54.5%와 31.8%

및 42.2%와 26.7%였다.

3. 돼지 卵胞卵의 體外受精에 있어서 배양액에 1×10<sup>4</sup> cells/ml, 1×10<sup>6</sup> cells/ml, 1×10<sup>8</sup> cells/ml 및 1×10<sup>15</sup> cells/ml의 子宮 內膜細胞를 첨가하여 共同培養하였을 때 體外성숙율과 수정율은 각각 54.3%와 39.1%, 58.3%와 43.8%, 55.6%와 33.3% 및 45.7%와 30.4%였다.
4. 돼지 初期胚와 卵丘細胞, 卵管 上皮細胞 및 子宮 內膜細胞를 첨가한 培養液에서 공동배양하였을 때 胚盤胞로의 體外발생율은 각각 9.5%, 10.7% 및 11.8%로서 대조구의 2.1%에 비해 유의적으로 높았다(p<0.05).

#### V. 引用文獻

1. Ball, G.D., M.L. Leibfried, R.W. Lenz, R.L. Ax, B.D. Bavister and N.L. First. 1983. Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. Biol. Reprod., 28:717-725.
2. Ball, G.D., M.L. Leibfried, R.L. Ax and N. L. First. 1984. Maturation and fertilization of bovine oocytes *in vitro* J. Dairy Sci., 67:2775-2785.
3. Crister, E.S, M.L. Leibfried-Rutledge, W.E. Eyestone, D.L. Northey and N.L. First. 1986. Acquisition of developmental competence during maturation *in vitro* Theriogenology, 25:150(abstr.)

4. Donahue, R.P. and S. Stern. 1968. Follicular cell support of oocyte maturation: Production of pyruvate *in vitro*. J. Reprod. Fert., 17:395-398.
5. Eystone, W.H., J. Vignieri and N.L First. 1987. Co-culture of early bovine embryos with oviductal epithelium. Theriogenology, 27:228(abstr.)
6. Eystone, W.H. and N.L. First. 1989. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue of in conditioned medium. J. Reprod. Fert., 85:715-720.
7. Fukuda, Y., M. Ichikawa, N. Naito and Y. Toyada. 1990. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized and cultured with cumus cells *in vitro* up to the blastocyst stage. Biol. Reprod., 42:114-119.
8. Fukui, Y. and Y. Sakuma. 1980. Matruation of bovine oocytes cultures *in vitro* :Relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells, Biol. Reprod., 22:669-673.
9. Goto, K., Y. Kajihara, S. Kosaka, M. Koba, Y. Nakanishi and K. Ogawa. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in-vitro* fertilization of *in-vitro* matured follicuar oocytes. J. Reprod. Fert., 83:753-758.
10. Goto, K., Y. Kajihara, M. Koba, S. Kosaka, Y. Nakanishi and K. Ogawa. 1989. *In vitro* fertilization and development of *in vitro* matured bovine follicular oocytes. J. Anim. Sci., 67:2181-2185.
11. Hamberger, L., T. Hillensjo and K. Ahren. 1978. Steroidgenesis in isolated cells of preovulatory rat follicles. Endocrinol., 103: 771-777.
12. Henderson, K.M., K.P. McNatty, P. Smith, M. Gibb, L.E. O'Keeffe, S. Lun, D.A. Heath and M.D. Prisk. 1987. Influence of follicular health on the steroidgenic and morphological characteristics of bovine granulosa cells *in vitro*. J. Reprod. Fert., 79:185-193.
13. Kajihara, Y., K. Goto, S. Kosaka, Y. Nakanishi and K. Ogawa. 1987. *In vitro* fertilization of bovine follicular oocytes and their development up to hatched blastocysts *in vitro*. Japan J. of Anim. Reprod., 33:173-180.
14. Kajihara, Y., N. Kometani, S. Kobayashi, Y. Shitanaka and K. Goto. 1991. Pregnancy by bovine blastocysts developed in co-culture with cumulus /uterine endometrial cells after *in vitro* fertilization. Japan J. of Anim. Reprod., 37:177-184.
15. Kajihara, Y., N. Kometani, S. Kobayashi, Y. Shitanaka, Y. Koshiha, K. Hishiyama, K. Shiraiwa and K. Goto. 1980. Pregnancy rates and births after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes. Theriogenology, 33:264(abstr.)
16. Landefeld, T.D., K. L. Campbell and A. R. Jr. Midgley 1978. Rapid changes in the synthesis of specipic ovarian granulosa cell proteins induced by human chorionic gonadotropin. Porc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5133-5157.
17. Leibfried, L. and N.L. First. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. J. Anim. Sci., 48:76-86.
18. Lu, K.H., I. Gordon, M. Gallagher and H. McGovern. 1987. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. Vet. Res., 121:259-260.
19. Lu, K.H., I. Gordon, H.B. Chen, M. Gallagher and H. McGovern. 1988. Birds of twins after transfer of cattle embryos

- produced by *in vitro* techniques. Vet. Res., 122:539-540.
20. Nakao, H. and N. Nakatsuji. 1990. Effects of co-culture, medium components and gas phase on *in vitro* culture of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine embryos. Theriogenology, 30:591-600.
21. Shea, B.F., J.P.A. Latour, K.N. Berdin and R.D. Baker. 1976. Maturation *in vitro* and the subsequent fertilizability of extra follicular bovine oocytes. J. Anim. Sci., 43:809-815.
22. Shi, D.S., K.H. Lu and I. Glordon. 1990. Effects of bulls on fertilization of bovine oocytes and their subsequent development *in vitro*. Theriogenology, 33:24(abstr.)
23. Sirard, M.A., J.J. Parrish, C.B. Ware, M.L. Leibfried-Rutledge and N.L. First. 1988. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. Biol. Reprod., 39:546-552.