

## Glycerol, 卵黃 및 Trehalose를 이용한 돼지受精卵의 凍結

장원경 · 박수봉 · 이명식 · 김태현 · 박용운 · 이훈택\* · 정길생\*

농촌진흥청 축산기술연구소

## Cryopreservation of Porcine Embryos using Glycerol, Egg Yolk and Trehalose

Chang, W. K., S. B. Park, M. S. Lee, T. H. Kim, Y. Y. Park, H. T. Lee\* and K. S. Chung\*

National Livestock Research Institute, R. D. A.

### SUMMARY

The purpose of this study was to examine the survival rates of cryopreserved porcine embryos collected on Day 6 (Day 0 = onset of estrus) with various cryoprotectants. Eighty two embryos at different stages, ranged from expanded blastocyst to hatched blastocyst, were allocated to 6 experimental groups in different combinations of cryoprotectants glycerol, egg yolk and /or trehalose. Porcine embryos were cryopreserved using conventional slow freezing procedures. The embryos were equilibrated with one of the freezing solutions, cooled from 25 to  $-7^{\circ}\text{C}$  at  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , seeded at  $-7^{\circ}\text{C}$  frozen to  $-36^{\circ}\text{C}$  at  $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , and then plunged into liquid nitrogen. The frozen embryos were thawed by immersion in  $37^{\circ}\text{C}$  water and the cryoprotectants were removed by dilution with 0.5M sucrose solution. Embryonic survival was estimated from the normal development of embryos for 12, 24 and 48hrs culture. Then the embryos were stained and their cell nuclei were counted. The survival rates of morphological embryos were significantly higher in group I (10% glycerol) or group IV (10% glycerol+10% egg yolk+0.5M trehalose) than those in other groups, although the nuclei number was quite higher in embryos treated with 10% glycerol and 0.25M trehalose at expanded blastocyst. However, hatched blastocysts showed higher viability and nuclei number treated with either egg yolk or trehalose, but the survival rates after 48hrs of culture were quite low. These results indicate that egg yolk and trehalose as a supplement to freezing solutions can be useful to the cryopreservation of porcine embryos.

### I. 서론

최근 돼지 능력 향상을 위하여 폐쇄돈군에 대한 유전자의 경제적 도입수단으로서 돼지의 수정란 이식이 주목을 받고 있지만 돼지 수정란은 다른 동물에 비하여  $15^{\circ}\text{C}$ 이하의 온도에서 저온충격에 민감한 특수성을 지니고 있기 때문에 (Polge 등, 1974 ; Nagashima

등 1988, 1989) 수정란 이식이 폭넓게 응용되지 못하고 있다. 따라서 이러한 문제점을 해결하기 위하여 돼지 수정란 동결 보존시험이 활발하게 이루어지고 있으며,  $-19^{\circ}\text{C}$ 에서 보존한 돼지수정란의 이식에 의한 수태한 성적을 얻었다는 보고(Kojima 등, 1988; Nagashima 등, 1994)가 있으나 아직 미흡한 실정이다. 또한 돼지수정란은 다른 동물의 수정란과 생리적, 형태적 차이가 있어  $10\sim 15^{\circ}\text{C}$ 에서 그의 생존성을 거의

\* 建國大學校 動物資源研究센터(Animal Resources Research Center, Kon-Kuk University)

상실하는 특수성이 있다(Polge 등, 1974).

최근 돼지 수정란의 생존성이 임계온도 이하인 11℃ (Nagashima 등, 1988), -20℃ (Nagashima 등, 1989), -35℃ (Hayashi 등, 1989), -196℃ (Kojima 등, 1988)까지 동결융해 후 생존성을 보유하고 있다는 보고가 있으며, Feng 등(1991), Kashiwazaki 등(1991), Nagashima 등(1989)은 완속동결 방법을 이용하여 돼지 수정란의 동결보존에 성공하였다. 최근 돼지 수정란의 동결 보존에 의한 유전자원 이용성을 증대 시키기 위한 연구가 활발하게 이루어지고 있는데, Fujino 등(1993), Hayashi 등(1988), Kashiwazaki 등(1991), Kojima 등(1989), Nagashima 등(1994)은 돼지 확장배반포 또는 탈출배반포를 동결융해하여 이식한 후 산자를 얻었다고 보고하였다. 또한 수정란의 직경이 150~300 $\mu$ m일 때 동결융해 후 생존율이 가장 높다고 하였다(Dobrinsky 등, 1994). 그러나 돼지 수정란의 동결융해 후, 생존율은 배발달 단계와 연령에 따라 차이가 있다고 보고하였다(Nagashima 등, 1989; Quinn 등, 1985).

일반적으로 동물 수정란의 동결보존시 저온상해가 동결상태의 주요 원인이 된다는 많은 보고가 있다. 특히 돼지 수정란은 저온감수성이 높기 때문에 저온 감수성을 극복하는 것이 동결보존의 성공 여부가 결정되므로, 급후 많은 연구가 필요하다. 최근 Fujino 등(1993)은 난황침가가 돼지 수정란의 저온 상해를 현저하게 감소시키고, Royos 등(1994)은 mouse 난포란에 trehalose를 첨가하였을 때 항동해 효과가 지대하다고 보고하였다.

따라서 본 연구는 돼지 수정란의 저온 충격을 감소하기 위하여 포유동물 생식세포의 항동해제인 글리세롤 및 난황과 trehalose를 첨가한 용액에서 돼지 수정란의 동결, 융해 후 생존성, 생존세포수 및 이식 가능

난자수에 미치는 영향을 분석하여 돼지수정란의 최적 항동해효과를 검토하기 위하여 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 수정란 채란

본 실험은 6~8개월령 미경산돈인 랜드레이스 20두를 공시하였다. 발정은 매일 2회 관찰하였고, 종모돈으로 부터 수압법을 이용하여 액상 정액을 채취한 다음 신선한 액상정액을 제조하여 최초 수태지 허용시기에 인공수정을 실시하였다. 인공수정 후, 6일째에 외과적 방법으로 Ca<sup>2+</sup> 및 Mg<sup>2+</sup>가 없는 Dulbecco's phosphate buffered saline solution에 BSA 0.1% (Sigma Chemical Co., USA)를 첨가한 관류액을 이용하여 자궁을 관류하여 채란을 실시하였다. 외과적 수술은 hypnodil (Janssen, Belgica)을 체중 20kg 당 1.0ml를 이정맥 주사하여 순간 마취를 시킨 후, 실온에서 돼지마취기(Ohmeda, BOC Health Care, England)를 이용하여 3~5% halothane(일성신약)과 2%산소를 구강내로 흡입시켜 마취를 유지하였다. PBS (Sigma, Chemical Co., USA)를 이용하여 채란된 수정란은 A등급 이상의 우수한 수정란을 확장배반포 및 탈출 배반포로 구분하여 완전 임의 배치법으로 시험에 공시하였으며 처리내용은 Table 1과 같다.

### 2. 동결 및 융해

수정란의 세척 및 동결보존액은 M199 (Sigma, Chemical Co., USA)을 기초 배양액으로 사용하였으며, 항동해제로서 난황은 난각을 절단후 난백을 분리한 다음 filter paper를 이용 순수 난황만을 채취하여 56℃에서 30분간 가열 처리 후 시험에 공시하였다. 항동해제 비율은 글리세롤 및 난황은 10% (v/v

**Table 1. Experimental design of the porcine embryo freezing**

Cryoprotectants	T1 (I)	T2 (II)	T3 (III)	T4 (IV)	T5 (V)	T6 (VI)
Glycerol	+	+	+	+	+	+
Egg yolk	-	-	-	+	+	+
Trehalose	-	+	+	-	+	+
Input in LN2	-36	-25	-30	-36	-25	-30

1) + : Treatment, - : Notreatment

2) Each treatment with 10% glycerol, 10% egg yolk or 0.25M trehalose as cryoprotectants

), trehalose (Sigma, Chemical Co., USA)는 0.25M이 되도록 제조하였으며, 동결보존액은 pH 7.4로 조정된 다음 0.45 $\mu$ m sterile Acrodisc (Gelman Sciences, USA)를 이용하여 멸균을 실시하였다.

시험에 공시한 수정란은 실온에서 각 처리액에 글리세롤 3단계(3.3, 6.7 및 10%) 처리법으로 각 처리별 2분간 평형을 실시하여 0.25ml plastic straw에 1~2개씩 흡입하여 양끝을 heat seal한 후 동결에 사용하였으며, seeding은 Ag I (Kojinma 등, 1988)를 이용하여 자동결빙이 이루어지게 하였다. 동결기는 ET-1 (FHK, Japan)을 이용하였고, 동결속도는 실온에서 -7 $^{\circ}$ C까지는 분당 1.0 $^{\circ}$ C씩 하강 하였으며, -7 $^{\circ}$ C에서 10분간 정지 후, 처리별로 -25, -30 및 -36 $^{\circ}$ C까지 분당 0.5 $^{\circ}$ C씩 하강시킨 후 액체질소내 투입하여 -196 $^{\circ}$ C에서 동결보존하였다.

동결된 수정란이 들어 있는 straw는 37 $^{\circ}$ C의 물에서 용해를 실시한 후 항동해제 제거는 straw에 들어있는 0.5M sucrose (Sigma, Chemical Co., USA)를 이용하여 straw내에서 5분간 서서히 혼합하여 제거하였다. 그후 35mm plastic dish에 넣은 다음 20% FBS (Sigma, Chemical Co., USA)가 함유한 M199을 이용하여 3회 세척을 실시하였으며, mineral oil (Sigma, Chemical Co., USA)이 피복된 35mm plastic dish내 50 $\mu$ l 배양액의 drop에 난자를 넣은 후 CO $_2$  배양기에서 48시간 동안 배양을 실시하였다.

### 3. 수정란 생존성 검사

동결융해한 돼지 수정란은 배양 12, 24 및 48시간

에 형태학적으로 생존난자를 현미경하에서 판정하였고, 배양 후 48시간에 Pursel 등(1985)의 형광염색방법을 이용하여 생존세포수를 관찰하였으며, 생존 세포수가 100개 이상인 난자를 이식 가능한 난자로 분류하였다.

## III. 결과 및 고찰

돼지 확장배반포를 glycerol, 난황 및 trehalose가 첨가된 배양액에서 동결하고 융해한 후 생존한 난자수, 생존세포수 및 이식 가능 난자수는 Table 2에서 보는 바와 같다. 항동해제의 제거 후, 거의 모든 난자는 수축 및 퇴행된 형태를 보였으나, 12시간 동안 배양 후 40개의 난자중 23개가 생존하였으며, 배양 24시간 및 48시간째에는 각각 14개 및 9개가 생존하였다. 그러나 돼지 수정란에 10% glycerol 첨가시 동결융해한 다음 24시간 배양 후의 생존율은 57.1%(4/7)로 10% glycerol 및 0.25M의 trehalose 동시첨가시의 25.0%보다 높았으며 이식 가능한 난자수도 많았다. Glycerol과 trehalose를 동시에 첨가하여 -25 $^{\circ}$ C에서 액체질소에 투입하였을 때 -30 $^{\circ}$ C에서 투입시보다 동결융해 후 배양 12, 24 및 48시간째의 생존 난자수가 많았으며 또한 생존세포수도 glycerol과 trehalose 동시 첨가한 처리 II에서 318.0개로 가장 많았다.

확장배반포에 10%의 난황을 첨가한 배양액에서 동결융해한 다음의 생존 난자수, 생존세포수 및 이식 가능 난자수를 조사하였던 바, 10% glycerol 및 난황 첨가시 동결융해 후 배양 24시간 및 48시간째의 생존율

**Table 2. The result of *in vitro* culture of frozen-thawed porcine expanded blastocysts in the presence of various cryoprotectants with glycerol, egg yolk and trehalose**

Group	No. of embryos frozen-thawed	No. of embryos survived in culture			No. of survived nuclei	No. of transferable embryos (No. of nuclei > 100)
		12 hrs	24 hrs	49 hrs		
I	7	7	4	3	158.7	3
II	8	8	2	1	318.0	1
III	4	3	1	0	-	0
IV	8	8	2	1	13.0	0
V	7	7	2	1	215.0	1
VI	6	4	3	3	71.7	1
Total	40	23	14	9	137.5	6

**Table 3. The result of *in vitro* culture of frozen-thawed porcine hatched blastocysts in the presence of various cryoprotectants with glycerol, egg yolk and trehalose**

Group	No. of embryos frozen-thawed	No. of embryos survived in culture			No. of survived nuclei	No. of transferable embryos (No. of nuclei > 100)
		12 hrs	24 hrs	49 hrs		
I	6	3	0	0	—	0
II	7	3	1	0	—	0
III	8	5	5	4	101.0	3
IV	6	4	3	2	81.0	1
V	8	4	3	2	59.0	1
VI	7	2	2	1	54.0	0
Total	42	21	14	9	82.0	5

은 각각 25%(2/8) 및 12.5% (1/8)였으며, 생존난자의 생존세포수는 13.0개였다. 반면 10% glycerol 및 0.25M의 trehalose를 동시에 첨가하여 -30℃에서 액체질소에 투입후 융해하였을 때 24시간 및 48시간 배양후 난자 생존율은 50.0% (3/6)로 난황내 glycerol 단독첨가시보다 생존율이 높았으며, 평균 생존세포수도 71.7개였고, 이식가능 난자수도 많은 경향이었다.

돼지 탈출배반포에 대한 10% glycerol, 10% 난황 및 0.25M의 trehalose를 첨가 하여 동결융해한 다음 생존난자수, 생존세포수 및 이식가능 난자수를 조사한 결과는 Table 3에 요약한 바와 같다. 돼지 탈출배반포를 동결융해 후 12, 24 및 48시간 동안 배양시 생존율은 각각 50.0% (21/42), 33.3% (14/42) 및 21.4% (9/42)로 동결융해 후 배양시간이 길어질수록 생존율은 떨어지는 경향이었다. 또한 탈출배반포에 0% glycerol 단독첨가시는 0.25M의 trehalose를 병용하였을 때보다 동결융해후 생존율이 낮은 경향이었으며, 10%의 glycerol과 0.25M의 trehalose를 동시에 첨가하여 -30℃에서 액체질소에 투입하여 동결 융해하였을 때 24시간 및 48시간 동안 배양후 생존 난자수는 각각 62.5% (5/8) 및 50.0% (4/8)로 타처리에 비하여 높았으며, 평균생존 세포수도 101.0개로 많았고, 이식가능난자수로 37.5% (3/8)로 가장 높았다.

항동해제로 10% glycerol 및 10% 난황을 첨가하여 동결 융해한 후 12, 24 및 48시간 배양시 난자 생존율은 각각 66.7% (4/6), 50.0% (3/6) 및 33.3% (2/6)였고, 평균생존세포수는 81.0개로 0.25M의 tr-

ehalose를 추가로 첨가하였을 때보다 높은 경향이 있었다. 반면 탈출배반포에 0.25M의 trehalose 첨가시 -25℃에서 액체질소에 투입하였을 때는 -30℃에서 투입하였을 때보다 생존난자수, 생존세포수 및 이식가능 난자수가 많았다. 본 실험에서 돼지 수정란을 -196℃ 까지 동결한 후 융해하였을 때 생존율은 낮은 편으로 이는 15℃이하에서 돼지수정란의 생존세포는 급격히 감소한다는 보고(Polge 등, 1977)와 6일째 돼지수정란의 동결융해 후 생존율이 낮다고 한 보고(Fujino 등 1993 ; Kojima 등 : 출판중)와 일치하는 경향이었다. 그러나 돼지수정란의 동결 융해 후 생존율은 발육단계에 따라서 차이가 있다고 보고한 Kashiwazaki 등 (1991)과 Kojima 등 (1989)의 보고와 차이가 있으나 돼지 수정란의 동결융해 후 형태적으로는 탈출배반포가 확장배반포보다 우수하여 이들의 결과와 일치하였다. 또한 Nagashima 등(1988, 1989)은 돼지 수정란을 -20℃까지 동결시켰을 때 탈출배반포가 다른 발육단계에 비하여 내동성이 높다고 보고하여 본 실험과 차이가 있었다.

돼지 수정란은 발육단계에 따라 세포내 지방조성에 차이가 있다고 보고하였고 저온에 대한 충격은 세포막내 방조성에 변화를 가져온다고 하였으며(Polge, 1977), 또한 Fujino 등(1993)은 glycerol 첨가시 확장배반포에서 동결 융해후 생존율이 낮았고 탈출배반포에서는 높다고 하여 본 연구와 차이가 있었다. 그러나 Nagashima 등(1992)의 보고와는 일치하는 경향으로 glycerol은 돼지 수정란의 항동해제로서 이용성이 있을 것으로 사료된다. 5~10%의 난황을 0℃에

서 10분간 항동해제로서 확장배반포 및 탈출배반포에 이용하였을 때 생존성을 연장시켰으며 (Kojima 등, 1989), 이는 급속한 온도 저하에 따른 저온 스트레스를 억제한다고 하였다. 정자의 희석제로서 저온 충격에 따른 난황의 기능은 아직 잘 알려져 있지 않고 있지만, 난황은  $Ca^{2+}$ 이온의 chelation과 풍부한 지방의 제공에 의한 항저온 기능의 증대 및 세포막에서 지방성 분변화에 따른 단백질의 안정화에 기여하여 난자의 항동해성을 증대시킬 것으로 생각된다. 이와 같은 이유로 인하여 정자의 냉장 및 동결보존에 대한 동해를 줄이기 위하여 난황을 정액희석제로 이용하였으나 (Martin 등, 1963 ; Watson과 Martin, 1975 ; Wilmut와 Polge, 1977 ; Watson, 1981 ; Fiser와 Fairfull, 1986) 정자에 대한 영양소 제공이나 항동해성에 대해서는 아직 명확하게 구명되어 있지 않다.

그러나 본 실험에서 항동해제로서 난황이용시 확장배반포에서는 glycerol 단독첨가시 보다 생존난자수가 낮아, 비록 Kojima 등(1989)의 보고와는 차이가 있었지만 탈출배반포에서는 난황첨가시 glycerol 단독첨가시보다 동결융해 후 생존율이 높아 이들의 보고와 일치하는 경향으로 난황은 투명대의 기능으로서 저온충격을 억제할 수 있다고 사료된다. 또한 비투과성 물질로서 trehalose가 mouse 수정란의 항동해제로서 효과가 있다고 보고된 이래 (Crowe, 1984 ; Royos 등, 1994) glycerol과 함께 항동해제로 이용되었다. 그러나 Yoshino 등(1993)은 돼지 수정란의 유리화 동결시 trehalose 첨가효과가 확실하지 않았다고 보고하였으므로 본 연구에서 입증한 trehalose 첨가시 확장배반포 및 탈출배반포에서 효과의 차이에 대한 추가 연구가 필요하다고 본다.

#### IV. 적 요

본 실험은 돼지난자의 동결 보존기술을 확립하기 위하여 10% glycerol을 기본항동해제로 하고 10% 난황 및 0.25M의 trehalose를 첨가하여 동결융해후 생존난자수, 생존세포수 및 이식 가능 난자수를 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 돼지 확장배반포의 동결융해후 12, 24 및 48시간 배양시 생존율은 각각 57.5(23/40), 35.0(14/40) 및 22.5%(9/40)이었고 이식 가능 난자생

산율도 22.5%(9/40)이었으나 10% glycerol 첨가가 다른 처리에 비하여 난자생존수 및 이식 가능 난자수가 많았다.

2. 탈출배반포에서는 10% glycerol 단독첨가시보다 10%의 난황 및 trehalose를 동시에 첨가하였을 때 생존난자수, 생존세포수 및 이식 가능 난자수가 증가하는 경향이었으나 glycerol 및 trehalose를 병용하였을 때 동결융해후 24시간 및 48시간에 생존난자수는 각각 62.5(5/8) 및 50.0%(4/8)로 다른 처리에 비하여 높았으며 생존세포수 및 이식가능 난자수도 많아 이에 대한 추가 연구가 필요하였다.

#### V. 인용문헌

1. Crowe, J. and L.M. Crowe. 1984. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms : the role of trehalose. *Science*, 223: 701-703.
2. Dobrinsky, J.R. and L.A. Johnson. 1994. Cryopreservation of porcine embryos by vitrification : A study of *in vitro* development. 1994. *Theriogenology*, 42:25-35.
3. Feng, S., Y. Zhang, L. Shaokia, R. Wang and D. Lu. 1991. Piglets from frozen(-20°C) embryos were born in China. *Theriogenology*, 35:199 abstr.
4. Fiser, P.S. and R.W. Fairfull, 1986. The effects of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. *Cryobiology* 23, 518-524.
5. Fujino, Y., Y. Ujisaro, K. Endo, T. Tomizuka, T. Kojima and N. Oguri, 1993. Cryoprotective effect of egg yolk in cryopreservation of porcine embryos. *Cryobiology*. 30:299-305.
6. Geisert, R. D., M. T. Zavy, R.J. Mpffatt, R. M. Blair and T. Yellin, 1990. Embryonic steroids and the establishment of pregnancy in pigs. *J. Reprod. Fertil, Suppl.* 40:293-305.
7. Hayashi, S., K. Kobayashi, J. Mizuno, K.

- Saitoh and S. Harano, 1989. Birth of piglets from frozen embryos. *Vet. Rec.*, 125:43-44.
8. Kashiwazaki, N., S. Ohtani, K. Miyamoto and S. Ogawa. 1991. Production of normal piglets from hatched blastocysts frozen at  $-196^{\circ}\text{C}$ . *Vet. Rec.*, 128:256-257.
  9. Kojima, T., N. Oguri, K. Shimada and H. Souzu. 1988. Cryomicroscopic observation of ice crystal germination initiated by silver iodide-alginate gel droplets in various aqueous solutions. *Cryo. Lett.*, 9:348-355.
  10. Kojima, T., K. Endo, Y. Uzisato, Y. Fujino, T. Tomizuka and N. Oguri, 1989. Study on cryopreservation of pig embryos. *Jpn. J. of Freezing Drying*, 35:97-108.
  11. Martin, I.C.A. 1963. Effects of lecithin, egg-yolk, fructose and period of storage at  $5^{\circ}\text{C}$  on bull spermatozoa deep-frozen to  $-79^{\circ}\text{C}$ . *J. Reprod. Fert.*, 6:441-449.
  12. Nagashima, H., Y. Kato, H. Yamakawa and S. Ogawa. 1988. Survival of pig hatched blastocysts exposed below  $15^{\circ}\text{C}$ . *Jpn. J. Anim. Reprod*, 34:123-131.
  13. Nagashima, H., Y. Kato, H. Yamakawa, T. Matsumoto and S. Ogawa, 1989. Changes in freezing tolerance of pig blastocysts in peri-hatching stage. *Jpn. J. Anim. Reprod*, 35:130-134.
  14. Nagashima, H., H. Yamakawa and H. Niemann. 1992. Freezability of porcine blastocysts at different peri-hatching stages. *Theriogenology*, 37:839-850.
  15. Nagashima, H., N. Kashiwazaki, R. Ashman, C. Grupen, R.F. Seamark. and M. Nottle. 1994. Recent advances cryopreservation of porcine embryos. *Theriogenology*, 41:113-118.
  16. Polge, C., I. Wilmut and L.E.A. Rowson, 1974. The low temperature preservation of cow, sheep and pig embryos. *Cryobiology*, 11:560. [abst]
  17. Polge, C. 1977. The freezing of mammalian embryos : Prospects and possibilities. In "The Freezing of Mammalian Embryos"(K. Elliott and J. Whelan, Eds.), Ciba Foundation Symposium 52 (new series), Elsevier Excerpta Medica /North-Holland, Amsterdam, pp. 3-13.
  18. Quinn, P.J.A. 1985. Lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes. *Cryobiology*, 22:128-146.
  19. Rayos, A. A., Y. Takahashi, M. Hishinuma and H. Kanagawa. 1994. Quick freezing of unfertilized mouse oocytes using ethylene glycol with sucrose or trehalose. *S. Reprod. Fret*, 100:123-129.
  20. Watson, P.F. and I.C.A. Martin. 1975. Effects of egg yolk, glycerol and the freezing rate on the viability and acrosomal structures of frozen ram spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci*, 28:153-159.
  21. Watson, P.F. 1981. The effects of cold shock on sperm cell membrane. In "Effects of Low Temperatures on Biological Membranes" (G. J. Morris and A. Clarke, Eds. ), Academic Press, London, pp. 189-218.
  22. Wilmut, I. and C. Polge. 1977. The low temperature preservation of boar spermatozoa. 2. The motility and morphology of boar spermatozoa frozen and thawed in diluent which contained only sugar and egg yolk. *Cryobiology*, 14:479-482.
  23. Yoshino, J., T. Kojima, M. Shimizu and T. Tomizuka, 1993. Cryopreservation of porcine blastocysts by vitrification. *Cryobiology*, 30:413-422.