

## 송아지 난소에서 초음파 유도에 의한 한우의 미성숙난자 채취시에 bST-FSH 처리효과에 관한 연구

이병천 · 이강남 · 김남렬\* · 황우석  
서울대학교 수의과대학

### **Effect of bST Co-Treatment with FSH on Transvaginal Ultrasound-Guided Oocyte Retrieval(TVR) in Calves**

**B. C. Lee, K. N. Lee, N. R. Kim and W. S. Hwang**  
*College of Veterinary Medicine, Seoul National University*

#### **SUMMARY**

The aim of this study was to evaluate the effect of recombinant bovine somatotropin (bST: Boostin-S<sup>®</sup>, LG Chem) treatment with FSH(Super OV<sup>®</sup>) or PMSG on superovulatory response for transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval (TVR) in calves.

Eight Korean Native Cattle(KNC) heifer calves, 150 to 240 days old, were randomly assigned to four treatment groups: 1) FSH(75 mg); 2) FSH (75 mg) + bST(500mg) 3) PMSG(1,000 IU); 4) PMSG(1,000 IU) + bST(500 mg). Experimental calves in group 1 (n=2) and 2(n=2) were weekly superovulated for 4 consecutive weeks with daily injection of FSH for 3days and the next day subjected to TVR session. Animals in group 3 (n=2) and 4(n=2) were weekly stimulated for 4 consecutive weeks with a single dose of 1,000 IU PMSG. TVR was performed on 72 hours after PMSG injection. Calves in group 2 and 4 was received injection of 500 mg of bST every 10 days. At each TVR session, follicle number and size were recorded, the oocytes collected and graded according to cumulus and cytoplasm investment. Collected oocyte were determined viable oocyte according to morphological quality with granulation of oocyte and number and status of cumulus cells. IVM and IVF were performed and assessed cleavage rate on day 3 after fertilization. A Sonovet 600(Medison, Co., Ltd) realtime ultrasound scanner with a 6.5 MHz convex transducer, fixed at the tip of 500 mm extended handle equipped with a needle guide was used in collecting oocyte. Differences between groups were analysed by chi-square test.

The population of large follicle ( $\geq 5$  mm) and aspiration rate were not significant different among the 4 groups. But, the number of small follicles ( $< 5$  mm) and aspirated oocyte in the KNC calves treated with bST were 1.3~1.6 times higher than in KNC calves treat with FSH or PMSG alone. In conclusion, the administration of bST with FSH or PMSG at superovulation for TVR in calves was increase the number of small follicle which was influenced the number of aspiratable follicle.

본 연구는 1996년 서울대학교 발전기금 포항제철 학술연구비 지원에 의해 수행되었음.

\* 경기도 종축장 (Kyonggi-Do Livestock Breeding Station)

## 서 론

소에서 초음파 유도에 의한 미성숙난자의 채취법은 탐촉자를 질에 삽입하고 탐촉면에 난소를 견인하여 화면상에 난소의 형태를 관찰하며 관련 장치를 사용하여 직접 생체에서 미성숙난자를 채취하는 방법이다(Pieters 등, 1988). 초음파 유도에 의한 미성숙난자의 채취법은 체외발육, 체외수정 및 체외배양과 연관시킬 경우 기존의 과배란 처치법의 제한점을 해결할 수 있는 방법으로 대두되고 있다(Looney 등, 1994; Kinghorn 등, 1991; John, 1992). 또한 수술적 내시경에 의한 난자 채취에 비해 장기의 유착, 마취위험 등이 없고 이어지는 수태에 영향을 미치지 않는 장점이 있으며, Pieterse 등(1988년)에 의해 소개된 이후 이에 대한 관련 연구가 진행되어 왔다. 채취빈도와 호르몬 처치 여부 등에 관한 연구로 반복되는 발정주기 동안 난포의 발육주기가 있어 매주 1회씩의 초음파유도에 의한 채취하였을 때 발정주기의 기간 변동 영향(Pieterse 등, 1991; Adams 등, 1992; Badinga 등, 1992; Stubbings와 Watton, 1995), 난포자극호르몬 투여 시 회수된 난자의 질 및 발육능의 평가(Vos 등, 1994), 난포 흡인을 위한 일회용 주사침의 개발(Bols 등, 1995), 임신우에서 난포란의 채취(Meintjes 등, 1995), 다양한 탐촉자의 사용(Scott 등, 1994), 번식장애우에 있어 상업적 이용 및 PMSG의 병용가능성(Pieterse 등, 1992), 외기온도에 따른 채취율의 관련성(Broussard 등, 1996), 미성숙 송아지에 적용(Fry, 1995; Tervit, 1996) 등 많은 관련 연구가 있었다(Van der Schans 등, 1991; Rocha 등, 1996). 특히 미성숙난자의 채취시에 더 많은 난포를 천자하기 위하여 FSH 또는 PMSG의 사용이 연구되었다. 또한 이들 약제와 bST(bovine somatotropin)의 병용 처치시에 채취 가능한 소 난포의 발육이 촉진된다는 연구가 있었다(Gong 등, 1993a). 초음파 유도에 의한 미성숙난자의 채취는 착유우뿐만 아니라 미성숙 송아지에서도 수행할 수 있어 우수형질의 종축선발 강도를 증진시키고 세대간격을 좁

힐 수 있다는 보고가 있다(Tervit, 1996). 이에 한우 송아지에서 초음파 유도에 의한 미성숙난자의 채취 가능성을 확인하고 FSH 및 eCG의 단독처치 및 병용처치하여 흡인 가능한 난포의 발육효과 및 난자의 분할율을 보기 위해 본 실험을 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공란우(Donor cow)

#### 1) 공란우의 선발

초음파 유도에 의한 미성숙 난자의 채취에 이용된 공란우는 150~250일령의 한우 미경산우로 임상적 검사에 의해 건강하다고 판단되며 직장검사 및 초음파 검사를 통하여 난소와 생식기도를 지닌 개체를 선발하였다.

#### 2) 공란우의 처리

초음파를 통한 난자의 흡인은 주 1회 실시하였다(Bungartz 등, 1995). 채취된 난포액은 배양액으로 희석하여 난자가 포함되었는지를 검사하였다. 선발된 공란우는 무작위로 각 2두씩 4군으로 나누어 처리하였다. 제 1군은 난포자극호르몬(FSH) 단독 처리하였다. FSH(Super-OV) 25 unit를 일일 1회 3일간, 총 75 unit 처치하고 마지막 처치 12시간 후에 난자를 채취하였다(Rocha et al., 1996). 제 2군은 제 1군과 동일하게 처리하고 10일 간격으로 bovine somatotropin(bST; Boostin-S<sup>®</sup>, LG Chem)을 병용 처리하였다. 제 3군은 임마혈청성 성선자극 호르몬인 PMSG 1,000IU를 주사하여 난포의 발육을 촉진시킨 후 72 시간째에 난자를 흡인하였다(Gong 등, 1993a). 난구세포가 둘러싸인 난자를 실체현미경하에서 관찰하여 생존성을 판단하였으며, 생존성이 있는 것으로 판정된 난자만을 체외성숙 및 체외수정에 공여하였다.

#### 3) 공란우의 준비

소의 진정과 직장벽의 이완을 위해 detomidine hydrochloride (1mg/100kg)를 정맥주사하고 2%

lidocaine 3ml을 주사하여 경막의 마취를 유도하였으며, 공란우는 서 있는 자세로 보정틀에 보정하여 난의 채취시 움직임을 최소로 하였다. 외음부는 비눗물로 깨끗이 닦고 소독제로 소독 후에 청결한 상태에서 미성숙 난자의 채취를 실시하였다.

## 2. 미성숙난자의 채취

초음파 탐촉자는 convex type(6.5 MHz; Sonovet 600; Medison, Co. Ltd)으로 질을 통한 미성숙난자 채취용을 사용하였다.

Long non-disposable needle (55cm, 18G)의 dead space를 줄이고 COC (cumulus-oocyte complex)에 적합한 환경을 조성하기 위해 난자흡인용 배지(PBS pH 7.4, 2% serum, 0.2% heparin)을 주사침 내강 및 흡입관내에 채웠다.

자궁을 끌어당긴 후 질로 삽입되어 자궁경 부근에 고정된 transducer 위에 위치시켜 난소를 관찰하면 난포의 강은 초음파 화면상에서 검고 둥근 점의 형태로 확인된 난포를 미리 확인한 후 초음파의 화상에 biopsy line을 설정하고 이 line위에 흡인하고자 하는 난포를 위치시켰다. 초음파 유도에 의해 난포가 확인되면 설정된 biopsy line을 따라 주사침을 난포강으로 진입시킨 후 난포의 직경을 초음파상에서 측정하여 기록하고 print 하였다. 난포를 화면상에서 확고히 고정된 후 주사침이 난포강내에서 끝이 보일 때까지 밀어 넣었다. 이때 화면상에서의 위치와 난소내로 주사침이 들어가는 감각이 느껴졌을 때 regulated vaccum pump의 foot switch를 작동시켜 난포액에 포함된 난자를 직접 흡인하였다. 주사침을 제거 후 배양액으로 주사침을 세척하며, 각각의 난포는 서로 다른 tube에 채취하여 난의 유무를 검사하였다.

흡인용 진공펌프의 압력은 물을 기준으로 22ml/min(water flow rate)의 속도를 적용하였다.

초음파상을 확인하며 난포가 collapse될 때까지 계속적으로 흡입하며 주사침의 끝이 난포벽에 닿아 음압이 차단될 때까지 실시하였다. 이때 주사침의 방향을 180° 돌려서 주사침의 경사와 반대에 있을지도 모르는 난구세포-난자합체를 흡인하였다. 흡인 후 주사침 및 연결관내에 잔류된 난포액 회수를 위해 흡인용 PBS로 세척 후 반대쪽 난소도 동일한 방

법으로 난포란을 직접채취하였다.

회수한 난포액을 실제 현미경하에서 검정하여 다층의 치밀한 난구세포를 가지며 세포질이 균질한 생존난자만을 선별하여 체외성숙에 공여하였다.

## 3. 체외수정

난포란의 성숙배양을 위한 성숙배지로는 0.01 unit/ml의 FSH, LH와 10% FCS가 첨가된 TCM 199을 준비한다. 각 공란우별로 회수된 난포란을 4-well에 분리하여 넣고 공기 및 습도가 포화상태인 39℃, CO<sub>2</sub> incubator 내에서 배양하였다.

정자는 난자의 성숙배양 개시후 24시간이 경과한 뒤 수정을 실시할 수 있도록 성숙배양 개시후 22시간 정도 (수정을 실시하기 2시간 전)에 준비한다. Plastic tube (11×55mm) 8개를 준비하여 capacitation용 Tyrode를 1ml씩 분주하고 동결정액을 용해하여 15ml centrifuge tube 내에서 충분히 혼합한 후 1 drop을 slide glass에 놓고 cover glass로 덮어 현미경으로 정자의 운동성을 확인하였다.

Pasteur pipette으로 정액을 0.2ml씩 꺼내 capacitation용 Tyrode가 들어 있는 시험관의 바닥에 가만히 넣었다. 정액을 넣은 capacitation용 Tyrode를 CO<sub>2</sub> incubator 내에 1시간 정치하는 swim-up 과정을 거쳐 활력이 우수한 정자를 선별한다. Swim-up 개시 1시간 후에 각 시험관의 상층액 약 0.8ml를 pasteur pipette으로 흡입하여 정자를 하나의 원심관에 모은 다음 원심분리한다 (1,500~2,000rpm, 10min). 원심관의 하부에 가라앉은 정자가 빨리 올라오지 않도록 주의하여 상층액을 제거하고 동량의 새로운 capacitation용 Tyrode를 보충하였다. 동일한 방법으로 1회 더 원심분리한 후 상층액을 제거하였다. 정자를 pipetting하여 4% HCl 100 μl와 capacitation용 Tyrode 90 μl를 넣은 시험관에 정자함유액 10 μl를 넣어 잘 pipetting하였다. 혈구 계산관에 고정된 정자액을 넣고 counting한 후 첨가할 정자의 농도를 조절하였다. 수정능획득을 위하여 정자의 농도에 준하여 heparin 용액 (200μg/ml)을 첨가한 후 조심스럽게 pipetting하여 CO<sub>2</sub> incubator 내에 15분간 정치하였다. 이후 IVF용 Tyrode로 35 mm petridish에 43 μl의 drop을 작성하고 mineral oil을 도포하여 실험실시 2~3

시간 전에 CO<sub>2</sub> incubator 내에 정치해 두었다. 정자를 swim-up 시키는 동안 세정과정을 통해 성숙난자의 팽대된 난구세포를 1/3 정도 벗겼다. 세정이 끝난 난자를 각 drop에 4 μ로 5개씩 첨가한다. 체외수정을 위해 수정능획득이 유도된 정자를 drop 내에 최종 농도가 2.5×10<sup>6</sup> 개/ml가 되도록 3 μ의 정자액을 첨가한다. CO<sub>2</sub> incubator 내에서 30시간 배양 후 분할율을 검정하였다.

## 결과 및 논의

미성숙 한우에 FSH, PMSG 단독투여 및 bST 병용투여에 의한 난포발육유도 후 난포의 발육상태는 Table 1과 같다. 각 군의 2주에서 4주간 연속처리시에 직경 5mm 이하, 5mm 이상 및 총난포수의 유의적인 차이는 없었으나 FSH, PMSG 단독처리군에 비해 bST 병용처리군에서는 직경 5mm 이하의 난포발육이 1.3~1.6배 증가하는 양상을 볼 수 있었다. 이는 bST 투여시 일시적인 고지방혈증이 유발되는데 이에 의해 난포의 발육이 촉진되는 것으로 판단된다. 유사하게 사료 유래의 고지방혈증은 혈중 GH(growth hormone)의 농도를 증가시키며 난포발육을 촉진시킨 것으로 보고되었다. 이러한 고지방혈증은 난포액내 insulin-like growth factor-1(IGF1)을 증가시키는 물론 과립막세포의 체외배양에서도 동일한 역할을 하는 것으로 보고되었으며, 이는 난포의 발육에 유익한 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다(De la Sota 등, 1993; Gong 등, 1993a; Lucy 등, 1995).

bST투여시 난소의 난포발육 효과에 대하여 많은 연구가 있었다. 성선자극호르몬과 bST를 병용투여하였을 때 배란까지 이어지는 난포의 발육에는 유

Table 1. Effect of bovine somatotropin treatment on follicular stimulation on calves\*

Treatment group	No. calves	No. follicles 4 wks		
		<5mm**	≥5mm	Total
FSH	2	36	21	57
FSH /bST	2	60	18	78
PMSG	2	37	28	65
PMSG /bST	2	52	31	83

\* Korean Native Cattle

\*\* Follicle size

의적인 증가가 없으나 소 난포의 발육은 증가하는 것으로 보고되었다(Gong 등, 1993a; Gong 등, 1993c). 본 실험에서도 비록 유의적인 차이는 없었으나 FSH 단독처리보다 bST 병용처리시에는 1.7배, PMSG 단독처리보다 bST 병용처리시에 1.4배의 5mm이하 난포의 발육효과를 볼 수 있어, Gong 등(1993a)의 PMSG 단독 투여보다 bST의 병용투여가 순환혈중의 GH와 IGF-I의 농도를 증가시키고 소 난포의 수가 증가되었다는 보고와 유사한 결과였다. FSH 또는 PMSG 단독처리 및 bST 병용처리군에서 5mm 이상의 난포발육에는 유의적인 차이가 없었다. 또한 4주간 연속처리에 난소반응의 저하는 발견할 수 없었다. 총 난포수에 있어 각각의 처리방법에 따른 유의적인 차이는 발견할 수 없었다.

처리군에 따른 천자한 난포수, 흡인된 미성숙난자수, 형태학적으로 생존 가능한 난자수 및 체외수정시에 분할율을 조사하였다. (Table 2)

총 난포수에 대한 천자한 난포수는 75.4~81.9%였으며 처리군에 따른 유의적 차이는 없었다. 또한 천자한 난포에서 41.8~52.9%의 미성숙 난자를 회수할 수 있었으며 이중 41.9~52.2%의 미성숙난자

Table 2. Effect of bovine somatotropin treatment on follicles aspirated and oocyte cleaved in calves\*

Treatment group	No. follicles 4 wks Total	Aspirated follicles(%)	Aspirated oocytes(%)	Viable	
				oocytes(%)	Cleave oocytes(%)
FSH	57	44(75.4)	18(41.8)	8(44.5)	4(50.0)
FSH /bST	78	61(78.2)	31(50.8)	13(41.9)	6(46.1)
PMSG	65	50(76.9)	23(46.0)	12(52.2)	7(58.3)
PMSG /bST	83	68(81.9)	36(52.9)	17(47.2)	9(52.9)

\* Korean Native Cattle

Percentage were not significantly different

는 체외발육 및 체외수정에 공여할 수 있었다. 즉, 처리방법은 난포의 천자수, 흡인된 난자수 및 형태학적으로 생존성이 있는 난자의 비율에는 영향을 미치지 않았다. 그러나 유의적인 차이는 없었으나 bST 병용처리군에서는 총 난포수의 발육이 증가하여 보다 많은 난자를 얻을 수 있을 것이라고 Fry 등 (1996)은 보고하였다.

이들 난자를 체외발육 및 체외수정에 공여하였을 때 분할율은 46.1~58.3%를 보여 각 처리군에 따른 분할율의 차이는 발견할 수 없었다. 즉, bST투여가 분할율에 영향을 미치지 않았다.

이러한 46.1~58.5%의 분할율은 성우의 난소에서 얻은 미성숙난자의 분할율에 비해 낮은 경향을 보였다. Damiani 등(1996)은 미성숙 소에서 초음파를 통한 난자의 채취는 이후 수태능력에 영향을 미치지 않으며, IVF와 연계시 산자를 생산할 수 있으나 성우에 비해 효율이 낮았다고 하였으며, Tervit (1996) 등은 미성숙 소에서 채취한 미성숙난자를 난자의 크기가 작아 후기배로의 발육이 저하된다고 하여, 본 실험의 낮은 분할율은 미성숙 소에서 채취한 미수정란이기 때문인 것으로 사료된다.

한우 송아지에서 FSH 및 PMSG 그리고 각 군에 bST 병용처리군에서 초음파유도에 의한 미성숙 난자를 채취할 수 있었으며 bST 병용처리군에서 5mm 이하의 난포수가 FSH, PMSG 단독 처리군에 비해 증가하는 경향을 보였다. 또한 초음파유도에 의한 소 난소로부터 미성숙난자의 채취는 공란우의 이용효율을 높이고 생리적 리듬을 유지한 채 짧은 반복주기를 단기간으로 반복적 난포란의 채취가 가능하며 이를 체외성숙, 체외수정 및 체외발육과 연계하여 다량의 수정란을 안정적으로 공급할 수 있는 방법으로 사료된다.

## 적 요

한우 송아지에서 FSH, PMSG 및 bST 병용처리 후 초음파 유도에 의한 미성숙난자를 채취하였을 때 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. FSH 및 PMSG 그리고 bST 병용처리군에서 난포의 총 발육수에는 유의적인 차이가 없었으나 5mm이하의 난포의 발육에 있어 bST 병

용처리군이 FSH, PMSG 단독처리군에 비해 난포의 발육수가 1.3~1.6배 증가하는 경향을 보였다.

2. 각 처리군에서 총난포수에 대한 천자한 난포수, 흡인된 난자수, 형태학적 정상인 난자의 수에는 유의적인 차이가 없었다. 또한 분할율도 46.1~58.3%를 보여 처리군간의 유의차는 인정되지 않았다.

이상의 결과로 보아 한우 송아지에서 FSH 및 PMSG의 단독처리 또는 bST 병용처리 후 초음파 유도에 의한 미성숙난자를 채취할 수 있었으며 단독처리군에 비해 bST 병용처리가 초음파 유도에 의한 미성숙 난자의 채취시에는 더 많은 미성숙 난자를 흡인할 수 있을 것으로 판단된다.

## 참고문헌

- Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JCH and Ginther OJ. 1992. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J. Reprod. Fertil.*, 94:177-188.
- Badinga L, Driancourt MA, Savio JD, Wolfenson D, Drost M, de La Sota RL and Thatcher WW. 1992. Endocrine and ovarian responses associated with the first-wave dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.*, 47: 871-883.
- Bols PEJ, Vandenheede JMM, Van Soom A and de Kruip A. 1995. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow : A new disposable needle guidance system. *Theriogenology*, 43:677-687.
- Bungartz L, Lucas-Hahn A, Rath D and Niemann H. 1995. Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and in different reproductive stages. *Theriogenology*, 43:667-675.
- Broussard JR, Rocha A, Lim JM, Blar RM, Roussel JD and Hansel W. 1996. The effect

- of environmental temperature and humidity on the quality and developmental competence of bovine oocytes obtained by transvaginal ultrasound-guided aspiration. *Theriogenology*, 45:351.
- Damiani P, Bellow MS, Walstra M and Looney CR. 1996. Repeatable transvaginal ultrasound-guided aspirations of prepuberal calves. 13th International Congress on Animal Reproduction, Proceeding(P18-14).
- De La Sota RL, Lucy MC, Staples CR and Thatcher WW. 1993. Effects of recombinant bovine somatotropin (somatotribove) on ovarian function in lactating and nonlactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 76:1002-1013
- Fry RC. 1995. Transvaginal Oocyte Recovery in cows and Calves Proceedings of the Twenty-seventy Annual Conference. Australian Society for Reproductive biology, 3.
- Fry Rc, Zuelke KA, Butler K and Squires TJ. 1996. Frequency of aspiration and oocyte recovery from 5 month old calves. 13th International Congress on Animal Reproduction, Proceeding(P18-12).
- Gong JG, Bramley TA, Wilmut I and Webb R. 1993a. Effect of recombinant bovine somatotropin on the superovulatory response to pregnant mare serum gonadotropin in heifers. *Biol. Reprod*, 48:1141-1149.
- Gong JG, Bramley TA and Webb R. 1993b. The effect of recombinant bovine somatotrophin on ovarian follicular growth and development in heifers. *J. Reprod. Fertil.*, 97:247-254.
- Gong JG, McBride D, Bramley TA and Webb R. 1993c. Effects of recombinant bovine somatotrophin, insulin-like growth factor-I and insulin on the proliferation of bovine granulosa cells *in vitro*. *J. Endocriolo.*, 139:67-75.
- John FH. 1992. Reproductive technology and genetic improvement. *Joournal of Dairy Science*, 75:2857-2879.
- Kinghorn BP, Smith C and Dekkers JCM. 1991. Potential genetic gains in dairy cattle with gamete harvesting and *in vitro* fertilization. *J. Dairy Sci.*, 74:611-622.
- Lucy MC, De La Sota RL, Staples CR and Thatcher WW. 1993. Ovarian follicular populations in lactating dairy cows treated with recombinant bovine somatotropin (somatotribove) or saline and fed diets differing in fat content and energy. *J. Dairy Sci.*, 101:1014-1027.
- Lucy MC, Thatcher WW, Collier RJ, Simmen FA, Ko Y, Savio JD and Badinga L. 1995. Effects of somatotropin on the conceptus, uterus, and ovary during maternal recognition of pregnancy in cattle. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 12L73-82.
- Lussier JG, Matton P and Dufour JJ. 1987. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J. Reprod. Fertil.*, 81:301-307.
- Looney CR, Lindsey BR, Gonseth CL and Johnson DL. 1994. Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology*, 41:67-72.
- Meintjes M, Bellow MS, Broussard JR, Paul JB and Godke RA. 1995. Transvaginal aspiration of oocytes from hormone-treated pregnant beef cattle for *in vitro* fertilization. *J. Anim. Sci.*, 73:967-974.
- Pieterse MC, Kappen KA, Kruij ThAM and Taverne MAM. 1988. Aspiration of bovine oocytes during trasvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, 30:751-762.
- Pieterse MC, Vos PLAM., Kruij ThAM, Willems AH and Taverne MAM. 1991. Characteristics of bovine estrous cycles during repeated transvaginal, ultrasound-guided

- puncturing of follicles for ovum pick-up. *Theriogenology*, 35:401-413.
- Pieterse MC, Vos PLAM, Kruip ThAM, Wurth YA, van Beneden ThH, Willemse AH and Taverne MAM. 1991. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology*, 35:19-24.
- Pieterse MC, Vos PLAM, Kruip ThAM, Wurth YA, van Beneden ThH, Willemse AH and Taverne MAM. 1992. Repeated transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up in ECG-treated cows. *Theriogenology*, 37:273.
- Rocha A, Broussard RR, Blair RM, Lim JM, Roussel JD and Hansel W. 1996. Effects of unilateral ovariectomy, gonadotropin stimulation and immunization against a synthetic peptide of the bovine inhibin  $\alpha$  c-subunit on oocyte recovery using transvaginal, ultrasound-guided aspiration. *Theriogenology*, 45:353.
- Scott CA, Robertson L, de Moura RTD, Paterson C and Boyd JS. 1994. Technical aspects of transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration in cows. *Vet. Rec.* 134:440-443.
- Stubbings RB and Walton JS. 1995. Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in Holstein cows. *Theriogenology*, 43:705-712.
- Tervit HR. 1996. Laparoscopy/laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. *Animal Reproduction Science*, 42:227-238.
- Van der Schans A, Van der Westerlaken LAJ, de Wit AAC, Eyestone WH and de Boer HA. 1991. Ultrasound-guided transvaginal collection of oocytes in the cow. *Theriogenology*, 35:288.
- Vos PLAM, de Loos FAM, Pieterse MC, Bevers MM, Taverne MAM and Dieleman SJ. 1994. Evaluation of transvaginal ultrasound-guided follicle puncture to collect oocytes and follicular at consecutive times relative to the preovulatory LH surge in eCG/PG-treated cows. *Theriogenology*, 41:829-840.