

乳牛未経産牛における受精卵（胚）回収技術の確立（第 3 報）

鈴木要人・梅田彩里・澤田芳憲¹⁾

1) 現 嶺南振興局農業経営支援部

要 約 高泌乳牛は、強い泌乳ストレスにより卵巢反応性が低下し、受精卵（胚）を効率的に回収することが難しい。泌乳開始前の未経産牛からの採胚に着目したが、産乳能力が不明であり、未経産牛に適した SOV 方法が確立されていないなどの課題がある。そこで、ゲノミック評価を用いた未経産牛の産乳能力推定と SOV 方法についてこれまで検討してきた。産乳能力についてはゲノミック評価と正の相関がみられ、推定が可能であることが示唆されたが、SOV については、本県の採胚プログラムに基づき FSH 投与量、PG 投与回数および CIDR 挿入期間について検討したが、胚の品質向上が課題として残った。そこで今回、FSH 総量は変えずに漸減投与回数と凍結精液融解温度について検討した。慣行の 6 回漸減投与・融解温度 37℃を対照区 (n=7) とし、8 回漸減投与・融解温度 37℃を試験区 1 (n=7)、8 回漸減投与・融解温度 20℃を試験区 2 (n=7) の 3 区で比較した。その結果、移植可能胚数、凍結可能胚数（率）および胚の品質において、試験区 1 で優れた成績を示した。採胚後の繁殖成績は 3 区間で有意差はみられず、SOV 方法の違いによる繁殖性への影響は認められなかった。これらの結果から、未経産牛の SOV については試験区 1 の方法が適切であると判断した。

キーワード：乳牛、未経産牛、採胚、過剰排卵処置 (SOV)

諸 言

高能力乳牛の効率的増産を目的として、高能力乳牛から作出された受精卵（胚）を移植し、産子を得る胚移植 (ET) 技術が広く活用されている。ET のメリットとして人工授精 (AI) に比べて農家内での牛群の改良スピードが促進されること、暑熱期やリピートブリーダー牛の受胎率向上が期待できることが挙げられる^{2, 13)}。さらに、性選別精液を用いて作出した胚を移植すれば産子の雌雄産み分けが可能となる。

畜産試験場の附置機関である奥越高原牧場では、SOV を施した後に AI を実施し、乳用経産牛の胚回収および凍結を業務の一環として行い、県内酪農家の乳用牛更新を支援している。

しかし、高泌乳牛を供胚牛にすると、泌乳能力向上に伴う産乳ストレスにより、SOV の卵巢反応性が低下して凍結可能胚数が減少する傾向

にある¹¹⁾。卵巢反応性を向上させるため、ホルモン剤の投与量を増やす方法があるものの、胚回収後の繁殖性に影響し、以後の受胎率が低下する恐れがある。

これらのことから、泌乳開始前の乳用未経産牛を供胚牛とした手法が全国で取り込まれているが、未経産であるため産乳能力が不明であること、未経産牛に適した胚回収技術が未だ確立されていないこと、さらに未経産牛における SOV・採胚がその後の繁殖性に影響を及ぼす恐れがあることが一因となり、普及が進んでいない。そこで、乳用未経産牛の産乳能力の推定について、初産分娩前のゲノミック評価値と分娩後の搾乳成績の相関性を調査し、ゲノミック評価による産乳能力推定の有効性について検討した。また、乳用未経産牛の SOV に関しては、前々報⁶⁾で卵胞発育ホルモン (Follicle Stimulate Hormone; FSH) の投与量について、前報¹²⁾でプロスタグランジン F2 α 製剤 (PG) の投与回数お

よび膈内留置型プロゲステロン製剤 (CIDR) の挿入期間について検討し、FSH20AU、PG2 回投与および PG1 回目投与時に CIDR 抜去する方法が乳用未經産牛の SOV に適していることを明らかにした。一方、回収卵は凍結可能な A ランクや B ランクの胚が少なく、胚の品質向上が課題として残った。本報では、卵胞発育期間を延ばして成長を促進させ、排卵の同期性および胚の品質向上を図ることを目的に、FSH 漸減投与回数を 6 回から 8 回に増やすとともに、FSH 初回投与から PG 投与開始までの時間を 48 時間から 72 時間に延長して、その効果を検証した。また、人工授精 (AI) 時の牛体内に注入された際の融解精子の生存率あるいは生存時間が延長する可能性により、採胚成績が向上したという報告⁹⁾に基づき、AI 時の凍結精液の低温融解 (20°C) についても併せて検討することとした。さらに、採胚後の繁殖成績について追跡調査も行った。

材料および方法

1 未經産牛の産乳能力推定

(1) 供試牛

独立行政法人 家畜改良センターの一塩基多型 (SNP) 検査を実施した場内産未經産ホルスタイン種雌牛 16 頭。

(2) 調査項目

未經産牛のゲノミック評価値と分娩後の搾乳成績 (305 日補正乳量, 乳脂率, 乳蛋白質率) の相関を調査した。

2 SOV 方法の検討

(1) 供試牛

奥越高原牧場にて飼養するホルスタイン種未

経産牛 21 頭 (月齢 13.9±0.6 か月齢) を対象に、2022 年 4 月～2024 年 3 月に採胚を実施した。また、採胚は供試牛 1 頭につき 1 回のみ実施した。

(2) 試験区分

FSH の総投与量を 20AU とし、FSH 漸減投与回数および凍結精液融解温度の違いにより 3 区を設定し、各区 7 頭ずつとした。6 回漸減投与・融解温度 37°C を対照区とし、8 回漸減投与・融解温度 37°C を試験区 1、8 回漸減投与・融解温度 20°C を試験区 2 とした。

(3) SOV, AI, 採胚

SOV から採胚までは、本県の採胚プログラム⁵⁾に基づき、以下の通り実施した (図 1)。

ア SOV

SOV は発情の前後を避けた周期で開始した。超音波画像診断装置 (HS-1500; 本多電子株式会社, 愛知) で開花期黄体と小卵胞数を確認し、直径 8mm 以上の卵胞は経膈プローブに採卵針 (富士平工業株式会社, 東京) を装着し、全て吸引除去した。その後、CIDR (イージブリード; サージミヤワキ株式会社, 東京) を挿入し留置した。対照区では、処理開始日を 0 日目とし、2 日目夕から 5 日目朝まで FSH 総量 20AU (アントリン R・10; 共立製薬株式会社, 東京) を 4 日間の計 6 回漸減投与した。6 日目朝に性腺刺激ホルモン放出ホルモン製剤 (Gonadotropin Releasing Hormone; GnRH; コンセラー 100, ナガセ医薬品株式会社, 兵庫) を 100µg 投与し、7 日目朝に卵胞数を計測後、AI を実施した。試験区では、2 日目夕から 6 日目朝まで FSH 総量 20AU 投与を 5 日間の計 8 回漸減投与した。7 日目朝に GnRH を 100µg 投与し、8 日目夕に卵胞数を計測後、AI を実施した (図 1)。

試験区 Day	朝	夕	朝	夕	朝	夕	朝	夕	朝	夕	朝	夕	朝	夕	朝	夕	...	朝																																																																																																																																																								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	...	15																																																																																																																																																															
CIDR	[Insert CIDR]																																																																																																																																																																									
卵胞吸引	<table border="0"> <tr> <td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> </table>																																																																																																																																																																									
対照区 Day	朝	夕	朝	夕	朝	夕	朝	夕	朝	夕	朝	夕	朝	夕	朝	夕	朝	夕	...	朝																																																																																																																																																						
CIDR	[Insert CIDR]																																																																																																																																																																									
卵胞吸引	<table border="0"> <tr> <td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> </table>																																																																																																																																																																									

図 1 SOV～採胚までのスケジュール

イ AI, 採胚

既報⁶⁾¹²⁾に準じ, AI は AM カテーテル (富士平工業株式会社, 東京) を用いて性選別精液を左右子宮角深部へ各 1 本注入した。なお, 性選別精液の融解温度については対照区と試験区 1 で 37℃, 試験区 2 で 20℃とした。対照区では 14 日目朝に, 試験区では 15 日目朝に黄体数と残存卵胞数を計測後, 多穴式 16Fr のバルーンカテーテル (富士平工業株式会社) を用いた子宮内還流法で実施した。還流液には, ハルゼン-V 注射液 (日本全薬株式会社, 福島) 1,000 ml にウシ血清 (Bovine Serum; GIBCO, 米国) と抗生物質 (ベンジルペニシリン 100 IU/ml; Meiji Seika ファルマ株式会社, 東京, ストレプトマイシン 100mg/ml; Meiji Seika ファルマ株式会社) を添加したものを使用し, メッシュ付きシャーレ (セルコレクター; 富士平工業株式会社, 東京) に回収後, 検卵を行った。回収した胚は IETS マニュアルの基準⁸⁾に従って評価し, 収縮桑実胚～胚盤胞期胚で, C ランク以上を移植可能胚, さらに B ランク以上は凍結可能胚と分類し, 回収卵数に対する移植可能胚数および凍結可能胚数の割合を算出した。

(4) 採胚後の追跡調査

既報⁶⁾¹²⁾に準じて調査し, 採胚終了直後, 早期に発情を回帰させるため, PG750 μ g を単回投与した。また, 採胚終了後に回帰した発情の次周期より AI を実施し, その後受胎まで追跡した。

(5) 調査項目

ア 採胚成績

AI 時の大卵胞数, 採胚時の黄体数, 残存卵胞数, 回収胚数, 移植可能胚数 (率) および凍結可能胚数 (率) について調査した。

イ 採胚後の繁殖成績

採胚後, 発情回帰までに要した日数, 受胎までに要した AI 回数および日数について調査した。

(6) 統計処理

統計処理は分散分析 (ANOVA) を実施し, Post-hoc 試験を行った。有意水準が 5%未満 ($p < 0.05$) を有意差ありとした。

結 果

1 ゲノミック評価値と搾乳成績の相関

ゲノミック評価値と 305 日補正乳量, 305 日乳脂率および 305 日乳蛋白質率の相関係数は, それぞれ $R=0.41$, $R=0.70$, $R=0.72$ と正の相関がみられた (図 2, 3, 4)。なお, R3 年度初産牛の平均乳量 \pm 標準偏差から外れており, かつその原因が疾病によるものであることが明らかな 2 頭については分析から除外した。

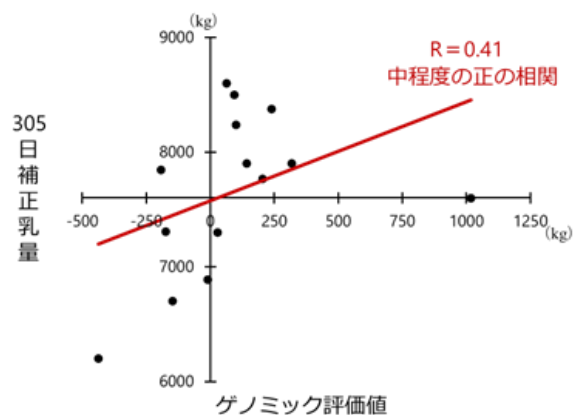


図 2 ゲノミック評価値と 305 日補正乳量

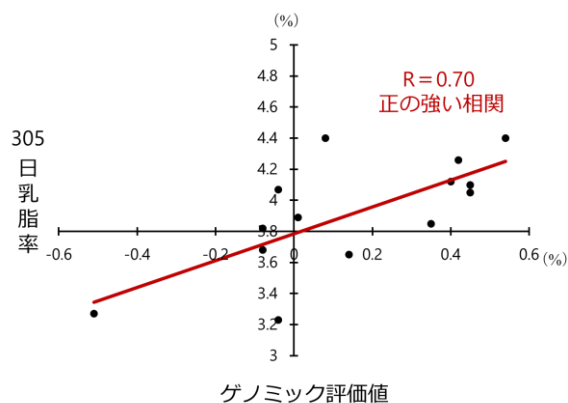


図 3 ゲノミック評価値と 305 日乳脂率

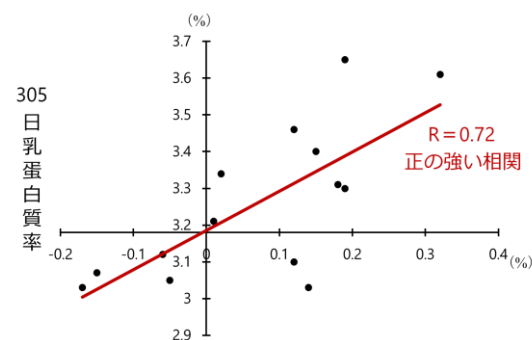


図 4 ゲノミック評価値と 305 日乳蛋白質

2 卵胞発育性および黄体形成

AI 時の大卵胞数は試験区 1 で 8.7±2.1 個、試験区 2 で 9.3±3.2 個、対照区で 9.1±2.6 個となり、3 区間で有意な差はなかった (表 1)。

3 採胚成績

採胚時の黄体数、残存卵胞数、および回収卵胞数について差は認められなかった。移植可能胚数、凍結可能胚数および凍結可能胚率について、試験区 1 が他の区より高い傾向を示した。移植可能胚率は試験区 1 と対照区が試験区 2 よりも高い傾向を示した (表 1)。また、回収胚の品質については、試験区では A ランク胚を回収できたが、対照区では回収できなかった。回収胚のランクについては、試験区 1 は B ランク胚、試験区 2 は D ランク胚、対照区は C ランク胚が最も多く回収され、試験区 1 が他の 2 区よりも胚の品質が良好である傾向を示した (表 2)。

4 採胚後の繁殖成績

3 区ともほぼ 1 週間前後で発情回帰し、問題は認められなかった (表 3)。試験期間中、試験区 1 で 4 頭、試験区 2 で 5 頭および対照区で 7 頭の計 16 頭で受胎を確認した。

考 察

独立行政法人のホームページ (評価形質: 泌乳 (nlbc.go.jp)) に記載されている初産時の乳量遺伝率は、0.433 である。本試験において、ゲノミック評価値と調査した乳量、乳脂率、乳蛋白質率で正の相関がみられた。このことから、未經産牛の産乳能力推定にゲノミック評価を用いることは、採胚候補牛の選抜に有効であることが示唆された。

AI 時の大卵胞数、黄体数および回収卵胞数において 3 区間で有意差はみられなかったものの、試験区 1 が移植可能胚数、凍結可能胚数および凍結可能胚率についてその他の区よりも高い傾向を示す結果となった。

卵胞は、成長するにつれて FSH 依存性から黄体形成ホルモン (LH) 依存性に移行して排卵が行われる。LH 依存性の発育は、LH のパルス状分泌が関与しており血中のプロゲステロン濃度 (P4) に支配されている^{4,7)}。試験区 1 において FSH 漸減投与回数を増やし、FSH 初回投与

表 1 採胚成績

AI時	採胚時								
	大卵胞数 (個/頭)	黄体数 (個/頭)	残存卵胞数 (個/頭)	回収卵胞数 (個/頭)	移植可能胚数 (個/頭)	移植可能胚率 (%)	凍結可能胚数 (個/頭)	凍結可能胚率 (%)	未受精卵数 (個/頭)
試験区① (n=7)	8.7±2.1	8.9±2.9	1.3±0.9	7.6±2.4	6.3±2.7	80.0±13.3	4.3±1.7	56.4±11.1	0.1±0.3
試験区② (n=7)	9.3±3.2	9.0±3.9	2.3±1.0	7.4±5.8	2.9±1.6	59.6±31.9	1.3±0.9	32.1±19.2	1.3±2.1
対照区 (n=7)	9.1±2.6	10.4±4.5	1.6±1.5	7.9±5.3	5.6±3.4	79.3±19.6	2.1±1.4	26.1±14.9	0.6±0.9

表 2 胚の品質

	凍結可能胚		Cランク	Dランク	未受精卵
	Aランク	Bランク			
試験区① (n=7)	0.4	3.9	1.6	1.3	0.1
試験区② (n=7)	0.2	1.1	1.3	3.2	1.3
対照区 (n=7)	0	2.1	3.6	1.4	0.6

表 3 繁殖成績

	発情回帰日数 (日)	AI回数 (回)	受胎日数 (日)
試験区① (n=6)	6.3±4.0	1.3±0.4*	50.3±15.8*
試験区② (n=7)	6.3±2.4	1.8±0.4**	48.7±16.0**
対照区 (n=7)	7.4±5.1	1.9±1.4	49.8±20.5

* n=4

** n=5

時から PG 投与間隔を長くしたことにより、卵胞発育が促され、6 回漸減投与時よりも PG 投与後の LH 依存性の発育に移行する卵胞の数が増え、排卵の同期性が向上したことが採胚成績の向上につながったと考える。秋山ら⁷⁾は、ホルスタイン種経産牛において FSH 投与期間を延長せず PG 投与を FSH 投与後 48 時間から 72 時間に遅らせたところ、PG 投与前の FSH 投与回数が増加し卵胞発育が促されることで採胚成績が向上したと報告している。Mapletoft ら¹⁰⁾も同様に FSH の投与期間を延ばすことにより、小さい卵胞も発育が促され排卵の同期性を向上させ、採胚成績の向上に有効であることを報告している。一方、Garcia ら³⁾は、肉用牛において FSH 投与日数を 4 日間から 7 日間に延長することで、排卵回数が増え黄体数が増加したと報告している。本試験では黄体数の増加は確認できなかった。これについては、FSH 投与期間の延長間隔が短く、新たにできた小さな卵胞が排卵に至るまでの発育が間に合わず退行したのではないかと考えられた。

低温融解について京村⁹⁾は通常 (35°C) と低温 (20°C) で凍結精液の融解温度を比較したところ、A ランク胚の回収率の向上や未受精卵の回収率の減少など、低温融解の方が採卵成績の改善が認められたと報告している。一方、本試験では試験区 1 (37°C) と試験区 2 (20°C) を比較すると、移植可能胚数 (率) や凍結可能胚数 (率) において試験区 1 の方が高い傾向を示した。京村は、仮説として農家間の移動距離が長く授精適期に合わせた AI ができないこともあり、低温融解は 35°C の融解と比較して運動精子率は低下するものの、牛体内に注入された際の融解精子の生存率、あるいは生存時間が延長し排卵遅延牛や体内受精卵作出時の多くの卵胞が時間をかけて排卵するタイミングに対応したと推察している。本試験の場合は、授精適期に合わせ AI を実施していること、排卵の同期性も向上していると考えられることから、融解精子の生存率や生存時間よりも運動精子率の方が影響したと考えられた。

採胚後の発情回帰は、3 区とも 1 週間前後でみられ、3 区間で有意差は認められなかった。また、受胎成績についても 3 区間で有意差な差は認められなかった。以上のことから、SOV 方

法の違いによる繁殖成績への影響はないと考えられた。また、場内の供試牛を除いた未經産牛の平均 AI 回数は令和 3 年度、令和 4 年度でそれぞれ 1.96 回、1.8 回と本試験の 3 区の AI 回数と大きな差は認められなかったことから、今回試験した SOV および採胚方法が未經産牛の繁殖性へ与える影響は少ないと考えられた。以上のことから、当牧場における乳用未經産牛の SOV 法は、FSH 総投与量 20AU を 8 回漸減投与、PG2 回投与および PG1 回目投与時に CIDR を抜去、精液の融解温度 37°C が最も適切であると考えられた。ただし、個体ごとの採胚成績には差が認められるため、今後は、採胚牛の血中成分と採胚成績との関連性を調査し、採胚適正牛の判断指標の確立を目指したい。

文 献

- 1) 秋山清・折原健太郎・坂上信忠, ホルスタイン種経産牛における性選抜精液を用いた体内胚採取のための過剰排卵処理, 神奈川県畜産技術センター研究報告, 1:7C12, 2017
- 2) Dochi O・Takahashi K・Hirai T・Hayakawa H・Tanisawa M・Yamamoto Y・Koyama H, The use of embryo transfer to produce pregnancies in repeat-breeding dairy cattle, *Theriogenology*, 69:124-128, 2008
- 3) Garcia Guerra. A・Tribulo .A・Yapura .J・Singh .J・Mapletoft R.J, Lengthening the superstimulatory treatment protocol increases ovarian response and number of transferable embryos in beef cows, *Theriogenology*, 78(2):353-360, 2012
- 4) Ginther O.J・Kot K・Kulick L. J・Wiltbank M. C, Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology*, 48(1):75-87, 1997
- 5) 堀川明彦・小林崇之・近藤守人, 過剰排卵処置における卵胞発育および排卵時間と雌雄選別精液を用いたホルスタイン種経産牛の採胚成績, 福井県畜産試験場研究報告, 27:1-11, 2014
- 6) 河端茜・高松英里奈・澤田芳憲・横田昌己, 乳牛経産牛における授精卵 (胚) 回収技術

の確立 (第 1 報), 福井県畜産試験場研究報告, 35:19-24, 2022

- 7) Kojima F.N · Bergfeld E.G · Wehrman M. E · Cupp A. S · Fike K. E · Mariscal-Aguayo D.V · Sanchez-Torres T · Garci-Winder M · Clopton D. T · Roberts A. J · Kinder. J. E, Frequency of luteinizing hormone pulses in cattle influences duration of persistence of dominant ovaria follicles, follicular fluid concentrations of steroids, and activity of insulin-like growth factor binding proteins. *Anim Reprod Sci* 77(3-4):187 -211. 2003
- 8) 国際胚移植学会, 胚の衛生的取り扱いマニュアル (国際胚移植学会 IETS マニュアル), 106-107, 1998
- 9) 京村耕平, 凍結精液融解温度における授精受胎率の一考察, 畜産技術, 9:16-18, 2022
- 10) Mapletoft R.J · Garcia Guerra A · Dias F.C.F · Singh J · Adams G.P, In vitro and in vivo embryo production in cattle superstimulated with FSH for 7 days, *Anim Reprod*, 12(n3):383-388, 2015
- 11) Snijders S.E.M · Dillion P · O`Callaghan D · Boland, Effect of genetic merit, milk yield, body condition and lactation number on in vitro oocyte development in dairy cows, *Theriogenology*, 53, 981-989, 2000
- 12) 鈴木要人 · 高松英里奈 · 澤田芳憲 · 横田昌己, 乳牛経産牛における授精卵 (胚) 回収技術の確立 (第 2 報), 福井県畜産試験場研究報告, 36:13-17, 2023
- 13) 上野修ら, 夏季における胚移植の受胎成績, 東日本家畜受精卵移植技術研究会大会研究会報, 9, 61-62, 1995

The Establishment of Technique for Collecting Embryo in Holstein Heifers (The 3st Report)

Kaname SUZUKI, Ayari UMEDA and Yoshinori SAWADA¹⁾

Fukui Prefectural Livestock Experiment Station

1) Reinan Regional Bureau Agricultural Management Support Division

Abstract

High-yielding dairy cows experience reduced ovarian responsiveness due to intense lactation stress, making it difficult to efficiently collect embryos even. We focused on the embryo collection from heifers before lactation onset, but their milk production potential is unknown, and an appropriate SOV method for heifers has not been established. Therefore, we investigated the estimation of milk production potential in heifers utilizing genomic evaluation and the SOV method. A positive correlation was observed between milk production potential and genomic evaluation, suggesting that estimation is feasible, but regarding SOV, we investigated the FSH dosage, PG administration frequency, and CIDR insertion period based on our prefecture's embryo collection program, but improving embryo quality remained a challenge. Thus, we examined the frequency of decreasing FSH doses and semen thawing temperatures without changing the total FSH amount. We compared three groups: control group with conventional 6 times decreasing doses and thawing temperature of 37°C (n=7), test group 1 with 8 times decreasing doses and thawing temperature of 37°C (n=7), and test group 2 with 8 times decreasing doses and thawing temperature of 20°C (n=7). As a result, test group 1 showed superior outcomes in terms of the number of transferable embryos, the number (rate) of freezable embryos, and embryo quality. There were no significant differences in post-collection reproductive performance among the three groups, indicating no impact of different SOV methods on fertility. Based on these results, the SOV method used in test group 1 was determined to be suitable for heifers

Keywords: dairy cows, heifers, embryo collection, superovulation (SOV)