

# 涼季採集之冷凍胚移置改善荷蘭乳牛熱季懷孕率<sup>(1)</sup>

楊德威<sup>(2)</sup> 蕭宗法<sup>(2)</sup> 謝昭賢<sup>(2)</sup> 王治華<sup>(3)</sup>  
沈朋志<sup>(4)</sup> 李善男<sup>(5)</sup> 劉炳燦<sup>(4)(6)</sup>

收件日期：96年8月30日；接受日期：97年3月14日

## 摘要

台灣地區熱季氣候環境高溫多濕，乳牛繁殖性能受熱緊迫環境影響而顯著低落，本試驗以涼季採集之冷凍胚於夏季進行胚移置，探討對提升熱季乳牛繁殖性能之可行性。冷凍胚於 2003 年與 2004 年涼季（11 月至翌年 4 月）採集，42 頭荷蘭乳牛經超級排卵與非外科方法生產 275 個牛胚，胚品質屬於良好的一級胚（110 個，40%）及二級胚（31 個，11.3%）均予以冷凍保存，並於接續的涼熱季進行母牛（初產與經產牛）及女牛之胚移置，同時以該期間畜試所乳牛場熱季發情觀察與人工授精之繁殖成績為對照。試驗結果顯示，自每頭牛採集之可移置胚數平均為 3.4 個，經產牛與初產牛間沒有差異。總共移置冷凍胚 59 頭次之懷孕率為 40.7%，其中涼季（11 - 4 月）與熱季（5 - 10 月）之懷孕率分別為 39.3%（11/28）與 41.9%（13/31），季節影響不顯著。胎次亦不顯著影響牛隻懷孕率，母牛與女牛懷孕率分別為 33.3%（9/27）與 46.9%（15/32）。於同期熱季比較繁殖方法之差異，得知胚移置與人工授精在母牛之懷孕率分別 30.8%（4/13）與 13.6%（6/44），胚移置可明顯提升熱季母牛懷孕率達 226%；女牛方面則分別為 50.0%（9/18）與 44.9%（22/49），也顯示了促進效果。綜合試驗結果顯示，季節與胎次皆不會影響受胚牛的懷孕率。熱季移置涼季冷凍胚的方法，可能經由避免早期牛胚對熱的高敏感期間，促使荷蘭乳牛懷孕率明顯提升，因此可以做為改善夏季乳牛繁殖效率的策略。

關鍵詞：懷孕率、乳牛、冷凍胚移置、熱季。

- 
- (1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第1430號。
  - (2) 行政院農業委員會畜產試驗所產業組。
  - (3) 行政院農業委員會畜產試驗所高雄種畜繁殖場。
  - (4) 國立屏東科技大學畜產系。
  - (5) 行政院農業委員會畜產試驗所。
  - (6) 通訊作者，E-mail: tml19@mail.npust.edu.tw。

## 緒言

臺灣地區之荷蘭乳牛，尤其 5-10 月份的熱季中，受到高環境溫度、濕度的影響，導致發情的不明顯、不發情、排卵延遲等及食慾的降低，減少乾物質的採食量。同樣地，生殖內泌素亦會受高環境溫度的影響，這些環境及生殖內泌素之影響因子，造成荷蘭乳牛低發情偵出率和低懷孕率，導致臺灣地區之荷蘭乳牛繁殖效率低落（蕭，1987）。牛隻受到熱緊迫影響，以致於發情不明顯、改變卵巢濾泡波、影響卵子發育，進而抑制胚的生長發育（Hansen *et al.*, 2001）。Putney *et al.*（1988）及 Monty and Racowsky（1987）報告指出，泌乳牛在熱緊迫環境下，造成大多數胚在受精後 7 天內早期死亡。對於熱緊迫牛隻的低懷孕率，胚早期死亡是一個主要因子之一；因此收集非熱緊迫（涼季）供胚牛的胚，移置於一熱緊迫的受胚牛發情後 7 天的體內，越過胚初期發育對熱的敏感，亦是提高母牛懷孕率的方法之一。李等（1993）比較自製乳牛新鮮胚、冷凍胚及美國進口冷凍胚於國內各酪農場進行胚移置後之懷孕率，試驗結果新鮮胚之懷孕率為 30%（6/20），冷凍胚為 32.5%（13/40）。Putney *et al.*（1989）比較熱緊迫下泌乳牛利用新鮮胚移置與人工授精之懷孕率，試驗結果新鮮胚移置之懷孕率 29.2%，人工授精之懷孕率 13.5%；Drost *et al.*（1999）比較熱緊迫下泌乳牛利用冷凍胚移置與人工授精之懷孕率，試驗結果冷凍胚移置之懷孕率 35.4%，人工授精之懷孕率 24.1%。本試驗旨在涼季時收集供胚牛的胚，並於熱季時胚移置入受胚牛，以避免熱緊迫對受精後 0-7 天牛胚之不利影響，而提升荷蘭乳牛熱季之懷孕率。

## 材料與方法

### I. 供胚牛之發情同期化

利用涼季期間（2002 年 11 月至 2003 年 4 月及 2003 年 11 月至 2004 年 4 月），進行 50 頭次荷蘭母牛（初產與經產牛）超級排卵。經直腸觸診確定牛隻處於動情週期黃體期間且卵巢運作正常，並每頭各肌肉注射前列腺素（Estrumate, Bayer Inc., USA）2 mL（500  $\mu$ g）進行發情同期化的處理。同時，依 Pryce *et al.*（2001）之方式進行胖瘦度評分（body condition score, BCS），以 1 分代表極瘦、3 分代表中等、5 分代表極胖，作為乳牛營養健康狀況對胚品質的影響情形之評估。

### II. 牛隻超級排卵及非外科胚採集

供胚牛於動情週期的第 11 日起，連續給予 4 天的激濾泡素（follicular stimulating hormone, FSH）（川崎製藥株式會社，日本）之肌肉注射，前 3 天每天注射兩次，第 4 天僅注射一次，每次間隔 12 小時；逐日遞減每次之劑量，其劑量分別為 7.5, 6.25, 5.0 與 2.5 units；並於第三天第二劑注射時，同時肌肉注射 2 mL（500  $\mu$ g）之前列腺素。注射前列腺素 2 天後，觀察牛隻發情，牛隻發情後間隔 12 小時，進行人工授精 2~3 次。最後一次授精起第 7 日，以法式沖胚器具（ZA135, IMV INT'L CORP., USA）進行非外科胚採集。術前以直腸觸診的方式，檢查並記錄兩邊卵巢上的黃體數，並由卵巢黃體數較多的一側子宮角先行沖集；每側子宮角以 400 mL 沖集液分三次沖集（第一次及第二次各為 150 mL，第三次為 100 mL）。並於立體顯微鏡（SMZ800, Nikon, Japan）下回收沖集液中之牛胚，鏡檢後將品質屬於一級及二級之牛胚冷凍保存。

Putney *et al.*（1988）依據胚細胞形態學將胚的品質分等級：（i）優級，發育完好的胚。（ii）良級，有些許擴張開來的細胞。（iii）普通級，有稍明顯擴張開來的細胞或些許的退化細胞。（iv）劣級，部分的退化細胞。（v）極劣級，極度擴張或退化的細胞。（vi）未受精卵。

本試驗依據胚細胞形態學將胚品質屬於優級者，歸類於一級胚；胚品質屬於良級者，或普通級經體外培養發育良好者歸類於二級胚，而普通級經體外培養發育不佳者，不予以冷凍 (Putney *et al.*, 1988)。Putney *et al.* (1988) 依據胚的發育階段分為：(i) 小於 8 細胞。(ii) 9-16 細胞。(iii) 早期桑椹胚 (morula)。(iv) 發育完整的桑椹胚。(v) 早期囊胚。(vi) 囊胚。一般屬於 iv - vi 發育階段的胚，可以進行冷凍保存，作為可移置胚。早期桑椹胚則於體外培養 1-2 天，若發育情形良好者，亦可供作可移置胚。

### III. 沖洗液配製

以 mPBS (modified phosphate-buffered saline) 溶液為沖洗液，2000 mL 沖洗液配製之步驟：(i) 取 Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS, Invitrogen Corporation, USA) 19.2 g 溶於 1800 mL 滅菌去離子蒸餾水中。(ii) 取 calcium chloride (Sigma-Aldrich Inc., USA) 0.2 g 溶於 20 mL 滅菌去離子蒸餾水中。(iii) 將上述兩項溶液攪拌混合。(iv) 加入 penicillin 100000 units (Sigma-Aldrich Inc., USA)、streptomycin sulfate 100000 units (Sigma-Aldrich Inc., USA)、酚紅 0.010g (Sigma-Aldrich Inc., USA) 及胎犢血清 (Fetal Bovine Serum, Invitrogen Corporation, USA) 20 mL。(v) 以滅菌去離子蒸餾水定量至 2000 mL、調整 pH 7.0 (Ryan *et al.*, 1993)。

### IV. 胚之冷凍

牛胚冷凍前，先將胚置於含 1.5 M 之乙基乙二醇 (ethylene glycol, EG, Sigma-Aldrich Inc., USA)、20% 胎犢血清及 0.1 M sucrose (Sigma-Aldrich Inc., USA) 之 DPBS 溶液中平衡 (平衡約 10 分鐘左右)。然後以 0.25 mL 之塑膠麥管 (straw) 將牛胚及冷凍溶液吸入特定位置，胚之兩側並各以一小段空氣與 Medium-199 (含 20% 胎犢血清) 之溶液隔開，此等每管裝有一個牛胚之塑膠麥管經以封口粉封口後，準備進行胚之降溫處理。

於進行牛胚冷凍操作之前，預先將程式控制冷凍降溫儀 (West-2050, Firstek Scientific, Taiwan) 開機，使溫度降至  $-6^{\circ}\text{C}$  備用。牛胚冷凍之降溫方式係先將包裝好之含胚麥管，放入程式控制冷凍降溫儀內之  $-6^{\circ}\text{C}$  酒精液面之下，維持 5 分鐘，然後進行植冰 (seeding)。植冰之進行係以一先前置於液態氮中預冷之不銹鋼鑷子，直接於酒精液面之下夾住麥管壁之特定部位，持續數秒鐘後即可見冰粒開始形成，並漸漸往下擴展。植冰完成後之含胚麥管仍被維持於該植冰溫度 ( $-6^{\circ}\text{C}$ ) 5 分鐘，其後以每分鐘下降  $0.5^{\circ}\text{C}$  的速率，直到溫度降到  $-32^{\circ}\text{C}$  後，即可將麥管直接置入液態氮 ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) 中保存 (宋, 1999)。

### V. 胚移置

於熱季 (5-10月) 選擇發情後第 7 日之母牛、女牛採一步驟之方法 (Voelkel and Hu, 1992) 進行冷凍胚解凍與直接胚移置。亦即將麥管自液態氮中取出後，於空氣中停留 5 秒，再浸置於  $25^{\circ}\text{C}$  溫水中，解凍 25 秒。將麥管取出並拭乾，再以圓形剪開封口後，將麥管裝入移胚器 (ZA035, IMV INT'L CORP., USA) 中。並儘速將胚移置於牛隻子宮角內。胚移置前，先以直腸觸診的方式，確認受胚牛之卵巢黃體發育情形良好。胚移置為利用非外科移胚法，將移胚器順沿受胚牛陰道通過子宮頸 (cervix)、進入具卵巢黃體之側的子宮角末端，隨即將胚注入，移出移胚器完成胚移置的操作。胚移置  $50 \pm 5$  天後以直腸觸診方式進行牛隻懷孕診斷。

### VI. 資料分析

利用 SAS (1999) 電腦套裝軟體進行統計分析，以平均值  $\pm$  標準偏差 (mean  $\pm$  SD) 表示之；以單因子變異數分析 (analysis of variance; ANOVA) 比較初產與經產牛及牛隻胖瘦度對其胚

收集數、胚品質之差異顯著性，並以卡方分析比較受胚母牛及女牛懷孕率之差異顯著性。

## 結果與討論

本試驗於 2002 年 11 月至 2003 年 4 月及 2003 年 11 月至 2004 年 4 月，共進行母牛超級排卵 50 頭次，進行非外科胚採集乳牛 42 頭次，共收集牛胚 275 個。其中可供冷凍進行移置之胚數 141 個，包括一級胚 110 個及二級胚 31 個，佔總胚數的 51.3% (141/275)；退化胚 89 個及未受精 45 個，佔總收集胚數的 48.7% (134/275)。每頭母牛收集到可移置胚數平均為 3.4 個。

涼季期間初產與經產牛的胚收集數與胚品質情形如表 1 所示。因初產與經產牛個體上的差異，胚收集的結果變異亦大；且因初產與經產牛於組內頭數不均（8頭 vs. 34頭），在胚收集數或胚品質方面，本試驗無法檢測出組間的差異性。

表 1. 涼季期間初產與經產牛的胚回收數與胚品質

Table 1. Distributions of the number of embryos recovered and morphological quality distribution from primiparous and multiparous cows in the cool season

Cows	Corpus luteum	Embryos recovered	Excellent + Good	Retarded + Unfertilized
Primiparous cows (n=8)	* 9.8 ± 6.7	5.9 ± 6.2	3.4 ± 4.3	2.5 ± 2.8
Multiparous cows (n=34)	12.2 ± 6.3	6.7 ± 6.6	3.4 ± 4.9	3.4 ± 4.4

\*mean ± SD.

涼季期間，不同胖瘦度評分牛隻之收集胚與胚品質情形如表 2 所示。由資料顯示黃體數隨母牛BCS值的增加而有逐漸增加的趨勢（ $P > 0.05$ ），惟因牛隻個體上的差異，不同的胖瘦度評分之母牛於胚收集的結果變異亦大；且因不同的胖瘦度評分組內之頭數不均，如：BCS 值 2.0-2.9 有 8 頭、3.0-3.9 有 28 頭、4.0-4.9 有 6 頭，因此胚收集數或胚品質方面，組間無法於 5% 顯著水準下檢測出差異性（ $P > 0.05$ ）。

表 2. 涼季期間不同胖瘦度評分母牛的胚回收數與胚品質

Table 2. Distributions of the number of embryos recovered and morphological quality distribution from the donor cows with different body condition score in the cool season

Body condition score	Corpus luteum	Embryos recovered	Excellent + Good	Retarded + Unfertilized
2.0-2.9 (n=8)	*11.0 ± 3.6	4.8 ± 4.3	2.9 ± 3.8	2.0 ± 2.6
3.0-3.9 (n=28)	11.8 ± 7.0	7.1 ± 7.1	3.3 ± 5.0	3.8 ± 4.6
4.0-4.9 (n=6)	12.7 ± 7.1	5.7 ± 6.5	3.5 ± 5.1	2.2 ± 3.1

\*mean ± SD.

所收集的可移置胚共 141 個，均予以冷凍，保存於  $-196^{\circ}\text{C}$  的液態氮中。於涼熱季期間，共移置冷凍胚 59 頭次，每頭牛均移置一個胚；其中 35 頭受胚牛回復發情，另 24 頭經直腸觸診確認懷孕，總計懷孕率為 40.7% (24/59)。其中涼季 (11-4月) 母牛及女牛共移置 28 頭，懷孕 11 頭 (母牛懷孕 5 頭；女牛懷孕 6 頭)，懷孕率 39.3% (11/28)，分娩仔牛 7 頭 (7/11)，懷孕損失部分母牛 2 頭流產、1 頭母牛因傷重無法起立而流產，女牛 1 頭早死產。熱季 (5-10月) 移置 31 頭，懷孕 13 頭 (母牛懷孕 4 頭；女牛懷孕 9 頭)，懷孕率 41.9% (13/31)，分娩仔牛 10 頭 (10/13)，懷孕損失的部分母牛 1 頭流產，女牛 2 頭流產。受胚母牛及女牛之懷孕率於涼、熱季期間，經檢測組間並無差異性 ( $P>0.05$ )。

涼季期間受胚母牛懷孕率 35.7% (5/14)，受胚女牛懷孕率 42.9% (6/14)。熱季期間受胚母牛懷孕率 30.8% (4/13)，受胚女牛懷孕率 50.0% (9/18)。受胚母、女牛之懷孕率，經檢測並無差異性 ( $P>0.05$ )，母牛、女牛為受胚牛於涼、熱季進行胚移置結果如表 3 所示。

表 3. 母牛與女牛於涼熱季進行胚移置結果

Table 3. Conception rate of cow and heifer after embryo transfer in the hot and cool seasons

	Hot season		Cool season	
	Cow	Heifer	Cow	Heifer
Conception rate % (no. of conception/no. of recipient)	30.8 (4/13)	50.0 (9/18)	35.7 (5/14)	42.9 (6/14)

將涼季時所收集的牛胚，於熱季時移置於受熱緊迫之牛隻，為胚移置好處之一 (Rutledge, 2001)。本試驗主要於涼季進行荷蘭母牛超級排卵及胚的收集，於熱季 (5-10月) 選擇母牛、女牛為受胚牛，於發情後第 7 日進行胚移置。母牛、女牛於熱季進行胚移置試驗相較於同場同期間觀察發情而人工授精的繁殖管理資料顯示，胚移置於受胚母牛之懷孕率為 30.8%，觀察發情而人工授精懷孕率為 13.6%；胚移置於受胚女牛之懷孕率為 50.0%，觀察發情而人工授精懷孕率為 44.9%。由試驗結果顯示，荷蘭乳牛應用胚移置的方式似有越過授精後 0-7 天牛胚對熱的敏感期之效果。

乳牛的卵及早期分裂階段的胚對熱緊迫是相當敏感及脆弱的，但當超過 3 日齡的胚是有較高的忍受度 (Edwards and Hansen, 1997; Ealy *et al.*, 1993; Putney *et al.*, 1988)。熱緊迫危害胚生長發育的機制，似乎是多重因子影響所造成的結果，夏季期間泌乳牛暴露於高溫環境下，使直腸溫度上升，而影響到胚的生長發育。直腸溫度上升所反映的母體受熱緊迫，很可能是危害胚生長發育的主要因子 (Rivera and Hansen, 2001)。報告指出胚發育對熱緊迫最敏感的時期，為開始分裂到形成囊胚之間 (Dutt, 1963; Alliston *et al.*, 1961)。Putney *et al.* (1988) 利用荷蘭種女牛 ( $n=29$ ) 研究熱緊迫對胚受精後 7 天的影響，將女牛置於  $20^{\circ}\text{C}$  環境氣候室 9 天，自動情週期第 9 天開始進行超級排卵處理，女牛於發情後進行人工授精，牛隻在開始發情的第 30 小時置於適溫環境 ( $20^{\circ}\text{C}$ ) 或熱緊迫 (每天暴露在  $30^{\circ}\text{C}$ , 16小時及  $42^{\circ}\text{C}$  下, 8 小時) 7 天。發情後第 7 天以非外科手術收集胚及由形態學評估胚發育的階段和品質。結果顯示，熱緊迫女牛無論在胚品質，或在胚分級歸類於「好」至「優良」等級的百分率 (23.2% vs 57.3%) 皆極顯著低於對照組 ( $P<0.001$ )。由熱緊迫女牛所收集的胚歸類為早期發育階段之退化胚，顯著多於由對照組所收集的胚 ( $P<0.05$ )。由熱緊迫女牛所收集的胚，估計的平均細胞數亦極顯著少於對照組的胚 ( $P<0.001$ )。由正常胚、畸形胚、退化胚及未受精卵來分類，熱緊迫處理組與對照組間有極顯著的差異 ( $P<0.001$ )。由熱緊迫

女牛收集的 82 個胚，只有 20.7% 正常胚，相較於由對照組女牛收集的 68 個胚，則有 51.5% 正常胚，顯示由發情開始後的 30 小時至 7 天的熱緊迫增加超級排卵的女牛，有更多不正常、延遲發育的胚。牛隻受孕最初的 2 天，因母體受熱緊迫，使輸卵管、子宮溫度的升高而直接改變受熱緊迫胚之代謝能力，導致多數的胚發育延遲或被吸收。彼等以新鮮胚移置的田間試驗之結果，顯示有高比例的胚損失發生在 7 小時至 7 天之間。同樣亦有報告指出，牛隻授精後的前幾天，直腸和子宮溫度的上升，會增加畸形胚的比率，而減低牛隻懷孕率 (Gwazdauskas *et al.*, 1973 ; Dunlap and Vincent, 1971 ; Ulberg and Burfening, 1967) ; 泌乳牛在熱緊迫環境下，造成大多數胚發育的前 7 天早期死亡 (Putney *et al.*, 1988 ; Monty and Racowsky, 1987) 。綜合上述，對於熱緊迫造成乳牛的低懷孕率，胚早期死亡是一個主要因子。李等 (1993) 比較國產荷蘭乳牛新鮮胚、冷凍胚及美國進口冷凍胚於國內各酪農場進行胚移置後之懷孕率，試驗結果新鮮胚之懷孕率為 30% (6/20) ，而冷凍胚為 32.5% (13/40) 。Putney *et al.* (1989) 及 Drost *et al.* (1999) 於熱緊迫下，利用新鮮胚與冷凍胚進行胚移置與人工授精之懷孕率比較分別為 29.2% vs. 13.5% 與 35.4 vs. 24.1% 。顯示收集非熱緊迫 (涼季) 供胚牛的胚，移置於發情後 7 天之熱緊迫受胚牛，似可越過胚初期發育對熱的敏感，增加熱緊迫乳牛的懷孕率。

胚移置的操作中，胚本身之品質、新鮮或冷凍、冷凍貯存之條件、經產牛同期化發情、移置方法及經產牛的營養狀況等因子，均直接影響受胚牛之懷孕率 (Sreenan *et al.*, 1987) 。Lindner *et al.* (1983) 由胚外觀評鑑胚品質為特優、優良、中等及下等四級。經進行胚移置後，懷孕率分別為 45%、44%、27% 及 20%，顯示胚品質之優劣幾乎可視為胚移置成功與否的主要指標。彼等亦指出受胚牛動情週期之日數與胚發育階段之同期化的配合，較單純供胚牛與受胚牛之同期化發情來得重要。冷凍胚的應用，雖具有方便性，但冷凍胚之製備與解凍技術，以及胚之品質優劣評鑑仍是提高置入胚成功懷孕率之要件 (李等, 1993) 。

## 結論

涼季期間初產與經產母牛或不同的胖瘦度評分之母牛，因牛隻個體上的差異，胚收集的結果變異亦大；且因組內頭數不均，無論在胚收集數或胚品質方面，組間並無顯著差異性。受胚母牛之懷孕率於涼、熱季期間分別為 35.7% 和 30.8%，兩者間並無顯著差異；受胚女牛之懷孕率於涼、熱季期間分別為 42.9% 和 50%，兩者間無顯著差異。同期母牛、女牛於熱季觀察發情而人工授精，母牛懷孕率為 13.6%，女牛懷孕率 44.9%。顯示收集非熱緊迫 (涼季) 供胚牛的胚，移置於發情後 7 天之熱緊迫受胚母牛，似可越過胚初期發育對熱的敏感，提高熱緊迫乳牛的懷孕率。

## 誌謝

本試驗承本所生理組許義明、產業組黃金山及蔡新興先生的協助，試驗得以順利完成，謹此誌謝。

## 參考文獻

- 李善男、蕭振文、徐忻松、楊振榮、許登造。1993。乳牛胚之移置研究（II）新鮮胚及冷凍胚之田間應用。畜產研究 26（4）：327-333。
- 宋麗英。1999。牛胚體外生產技術之開發及其在基因轉殖研究之應用。國立台灣大學畜牧學研究所碩士論文。
- 蕭宗法。1987。涼熱兩季內乳用經產牛生殖周期中類固醇內泌素之變化。國立台灣大學畜牧學研究所碩士論文。
- Alliston, G. W. and L. C. Ulberg. 1961. Early pregnancy loss in sheep at ambient temperatures of 70 and 90°F as determined by embryo transfer. *J. Anim. Sci.* 20:608-613.
- Drost, M., J. D. Ambrose, M. J. Thatcher, C. K. Cantrell, K. E. Wolfsdorf, J. F. Hasler and W. W. Thatcher. 1999. Conception rates after artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows during summer in Florida. *Theriogenology* 52:1161-1167.
- Dunlap, S. E. and C. K. Vincent. 1971. Influence of postbreeding thermal stress on conception rate in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 32:1216-1218.
- Dutt, R. H. 1963. Critical period for early embryo mortality in ewes exposed to high ambient temperature. *J. Anim. Sci.* 22:713-719.
- Ealy, A. D., M. Drost and P. J. Hansen. 1993. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. *J. Dairy Sci.* 76:2899-2905.
- Edwards, J. L. and P. J. Hansen. 1997. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. *Mol. Reprod. Dev.* 46:138-145.
- Gwazdauskas, F. C., W. W. Thatcher and C. J. Wilcox. 1973. Physiological, environmental, and hormonal factors at insemination which may affect conception. *J. Dairy Sci.* 56:873-877.
- Hansen, P. J., M. Drost, R. M. Rivera, F. F. Paula-Lopesa, Y. M. Al-Katanania, C. E. Krininger III and C. C. Chase, Jr. 2001. Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. *Theriogenology* 55:91-103.
- Lindner, G. M. and R. W. Wright. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 20:407-416.
- Monty, D. E. and C. Racowsky. 1987. In vitro evaluation of early embryo viability and development in summer heat-stressed superovulated dairy cows. *Theriogenology* 28:451-465.
- Pryce, J. E., M. P. Coffey and G. Simm. 2001. The Relationship Between Body Condition Score and Reproductive Performance. *J. Dairy Sci.* 84:1508-1515.
- Putney, D. J., M. Drost and W. W. Thatcher. 1988. Embryonic development in superovulated dairy cows exposed to elevated ambient temperatures between Days 1 to 7 post insemination. *Theriogenology* 30:195-209.
- Putney, D. J., M. Drost and W. W. Thatcher. 1989. Influence of heat stress on pregnancy rates of lactating dairy cattle following embryo transfer or artificial insemination. *Theriogenology* 31:765-778.
- Rivera, R. M. and P. J. Hansen. 2001. Development of cultured bovine embryos after exposure to increased temperatures in the physiological range. *Reproduction* 121:107-115.
- Rutledge, J. J. 2001. Use of embryo transfer and IVF to bypass effects of heat stress. *Theriogenology* 55:105-111.

- Ryan, D. P., J. F. Prichard, E. Kopel and R. A. Godke. 1993. Comparing early embryo mortality in dairy cows during hot and cool seasons of the year. *Theriogenology* 39:719-737.
- SAS. 1999. SAS User's Guide: Statistics, 6.12 ed., SAS Inst., Cary, NC. USA.
- Sreenan, J. M. and M. G. Diskin. 1987. Factors affecting pregnancy rate following embryo transfer in the cow. *Theriogenology* 27:99-113.
- Ulberg, L. C. and P. J. Burfening. 1967. Embryo death resulting from adverse environment on spermatozoa or ova. *J. Anim. Sci.* 26:571-577.
- Voelkel, S. A. and Y. X. Hu. 1992. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryo. *Theriogenology* 37: 23-37.

# Improvement of conception rate of Holstein cows in summer by transfer of embryos fertilized in cool seasons <sup>(1)</sup>

Der-Wei Yang<sup>(2)</sup> Tzong-Faa Shiao<sup>(2)</sup> Chao-Hsien Hsieh<sup>(2)</sup>  
Chih-Hua Wang<sup>(3)</sup> Perng-Chin Shen<sup>(4)</sup> Shan-Nan Lee<sup>(5)</sup>  
and Bing-Tsan Liu<sup>(4)(6)</sup>

Received : Aug. 30, 2007 ; Accepted : Mar. 14, 2008

## Abstract

In summer, high temperature and humidity environment significantly decrease the conception rate of Holstein cows in Taiwan. This study aimed to improve the summer conception rate of cows by transferring the frozen embryos collected from the cool season. A total of 275 embryos were collected from 42 donors by super-ovulation and non-surgical flushing process from Nov. to April in 2003 and 2004. Excellent embryos (110, 40%) and good embryos (31, 11.3%) were frozen and transferred to both heifers and cows in the next year. Meanwhile, summer conception rate from traditional heat detection and artificial insemination (AI) of the same herd were recorded for comparison. The results indicated that average number of transferable embryos collected per cow was 3.4, with no significant difference between the primi- and multiparous cows. A total of 59 cows undergoing embryo transfer process had conception rates up to 40.7%. There was no seasonal effect. Conception rate in cool (Jan. to April) and summer season (May to Oct.) were 39.3% (11/28) and 41.9% (13/31), respectively. Parity effect was also not influential, conception rate of cows and heifers were 33.3% (9/27) and 46.9% (15/32), respectively. However, summer conception rate was improved by embryo transfer when compared with AI program. Conception rates for cows of both programs were 30.8% (4/13) and 13.6% (6/44), respectively, indicating a 226% improvement, and for heifers: 50.0% (9/18) and 44.9% (22/49), respectively. In conclusion, both season and parity would not affect the conception rate of embryo-transferred dairy cows. Transferring cool-season embryos to dairy cows in hot season could be an effective strategy to improve the reproduction performance.

Key words : Conception rate, Dairy cows, Frozen embryo transfer, Hot season.

- 
- (1) Contribution No. 1430 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.
  - (2) Animal Industry Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan, Taiwan 712, R.O.C.
  - (3) Kaohsiung Animal Propagation Station, COA-LRI, Pingtung, Taiwan, R.O.C.
  - (4) Department of Animal Science, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung, Taiwan, R.O.C.
  - (5) Livestock Research Institute, COA, Hsinhua, Tainan, Taiwan 712, R.O.C.
  - (6) Corresponding author, E-mail: tml19@mail.npust.edu.tw