

한우 공란우 및 생체내 난자 회수(ovum pick-up) 조건이 체외수정란의 발달에 미치는 효과

박용수¹ · 공준호² · 이준구³ · 오동엽³ · 정기화^{2*}

국립한국농수산물대학 말산업학과¹, 경상국립대학교 동물소재공학과², 경상북도축산기술연구소³

Effects of donors and *in vivo* ovum pick-up conditions on *in vitro* embryo development in Korean native cow

Yong Soo Park¹, Jun Ho Kong², Jun Koo Yi³, Dong yep Oh³, Ki Hwa Chung^{2*}

¹Department of Horse Industry, Korea National College of Agriculture and Fisheries, Jeonju 54874, Korea

²Department of Animal Resources Technology, Gyeongsang National University, Jinju 52725, Korea

³Gyeongsangbuk-Do Livestock Research institute, Yeongju 36052, Korea

Artificial insemination of Korean native cattle (KNC) is the predominant method for breed improvement. However, industrialization of embryo production and transfer is necessary to utilize the genetic potential of KNC. The aim of this study was to examine associations between KNC donor cows and ovum pick-up (OPU) conditions, *in-vivo* oocyte recovery, and embryo development. Oocyte recovery and blastocyst development rates were higher at 50 and 60 mmHg OPU vacuum pressure than at 40 mmHg, which was, however, not significant. Regarding follicle growth, injection of 500 µg GnRH 36 hours before OPU significantly increased the number of OPU oocytes from an average of 4.6 to 7.6 ($P<0.05$); no significant difference in embryo development rates was observed. Significant differences were observed in the numbers of OPU oocytes, embryo development rates, and transplantable blastocysts per individual among nine KNC donors ($P<0.05$). Furthermore, although there was no difference in OPU oocyte recovery intervals in approximately 2~8 weeks, the number of recovered oocytes significantly decreased at the 12-week interval ($P<0.05$); there was no difference in embryo development rates. The number of oocytes and embryonic development rates only tended to decrease until the seventh OPU session, but decreased significantly until the eighth session ($P<0.05$). The average pregnancy rate after transfer of OPU-derived *in-vitro* embryos into recipient cows was 41.8%. To improve the efficiency of OPU egg recovery and *in-vitro* embryo production, considering KNC donor characteristics, vacuum pressure of 60 mmHg, GnRH pretreatment to induce follicle growth, and effective OPU egg recovery up to seven times at intervals of 2~4 weeks appears to be most suitable. This study may facilitate the industrialization of KNC embryo production and transfer using high-quality cows.

Key Words: Korean native cattle, Ovum pick-up, *In vitro* fertilization, Embryo

Received November 11, 2021

Revised December 10, 2021

Accepted December 10, 2021

Corresponding author:

Ki Hwa Chung

E-mail: kchung@gntech.ac.kr

https://orcid.org/0000-0002-6446-5312

서론

국내 한우 개량은 주로 수컷 종축의 정액을 이용하는 인공수정이 활용되고 있으나, 암소의 유전 능력 활용의 어려움과 개량 효과 발현에 장기간이 소요되는 단점을 가지고 있다. 대안으로

수컷과 암컷의 유전 능력을 모두 활용이 가능한 수정란이식이 제시되고 있으나 기술적 문제 등으로 산업화에 어려움이 있다. 수정란이식에 이용되는 수정란은 생산 방법에 따라 과배란 유도 체내수정란(multiple ovulation embryo transfer; MOET), 도축 난자 또는 생체내 난자(ultrasound-guided ovum pick-



up; OPU)에서 유래한 체외수정란(in vitro production; IVP)으로 구분하고 있다. 국내에서 MOET 기술은 공란우 이용 제한, 과배란처리 호르몬의 비용 및 개체 차이 등으로 안정적인 생산에 어려움이 있고, 대량 생산이 가능한 도축 난소 유래 수정란은 도축 공란우의 법적인 문제점을 가지고 있다. 하지만 체외수정란은 유전적으로 우수한 소를 대량 증식 시키는 유효한 수단으로 알려져 있다(Hasler, 2014). 특히 OPU-IVP 수정란 생산은 OPU 장비의 발달로 미성숙 난포란의 회수율이 향상되었고, IVP 기술의 발달로 국외에서는 산업화에 진입하고 있다(Galli 등, 2014; Hasler, 2014).

세계적으로 소 수정란은 2018년도에 1백만 개 이상이 생산되어 이식되고 있으며, 2019년에 MOET 수정란 생산량은 약 10% 감소하였으나, 체외수정란 생산량은 15% 증가하는 경향이 있었다(Demetrio 등, 2020). 미국에서는 2019년에 MOET 수정란 143천여개 및 IVP 수정란 305천여개가 생산되어 이식되었다(Demetrio 등, 2020). 국내 한우에서도 OPU-IVP 기술 개발 관련 연구가 있었고(Park 등, 2000a, b, c; Jin 등, 2010, 2014; Cho 등, 2017), 일부 대학이나 연구기관에서 제한적으로 MOET 또는 IVP 수정란을 생산·공급하고 있으나 정확한 통계는 보고가 없는 실정이다.

OPU-IVP 수정란의 생산 효율 개선을 위해 OPU 기술(Van 등, 2000; Merton 등, 2003; Lonergan 등, 2006), OPU 간격(Hasler 등, 1995; Chaubal 등, 2006; De Roover 등, 2008) 및 기간(Jin 등, 2010), 호르몬 처리 및 발정동기화 효과(De Roover 등, 2005, 2008; Chaubal 등, 2007), 공란우 조건(Su 등, 2012), 난포란의 체외-체내성숙 비교(Hendriksen 등, 2000; Rizos 등, 2002; Matoba 등, 2014) 등과 관련된 연구가 보고되었다. 국내에서도 OPU-IVP 효율 향상을 위한 채란 기술(Park 등, 2000c; Jin 등, 2010), 채란 압력(Park 등, 2000a), 채란 바늘(Park 등, 2000a), 채란 빈도(Park 등, 2000b), 채란 기간(Jin 등, 2010), follicle stimulating hormone (FSH) 처리(Park 등, 2000a), 난포란 등급 차이(Jin 등, 2014), 공란우 효과(Park 등, 2000b; Jin 등, 2015), OPU-IVP 수정란 임신율(Park 등, 2000a; Jin 등, 2014) 등에 관하여 연구를 하였다. 하지만 국내 연구는 대부분이 일회성 연구에 한정되어있는 실정이며, 연구 특성상 다양한 요인들에 영향을 받고 연구팀에 따른 차이의 발생 등으로 비교가 어렵다는 문제점이 있다(Ward 등, 2000). 상기 연구들을 바탕으로 국내 한우 수정란을 이용한 개량의 산업화를 위해서는 우량 공란우의 선발과 활용 기준 및 소수의 난자를 이용한 수정란 생산 기술 등의 정립이 필요하다. 따라서 본 연구는 한우 공란우 OPU 기술 측면에서 최적의 진공

압력, 난포란 회수율 향상을 위하여 gonadotropin releasing hormone (GnRH) 이용 및 공란우 이용성 향상을 위한 개체별 특성, 채란 간격과 반복 채란 빈도 요인에 따른 난포란의 회수율과 배 발달율을 조사하였고, OPU-IVP 수정란의 이식 후 임신율을 검토하였다.

재료 및 방법

공란우 선발 및 관리

수정란이식용 공란우 선발기준(농림축산식품부, 2020. 정역 증명서등. 축산법 제18조)에 따라 부모 모두 3계대 이상 혈통 및 고등등록우 중에서, 부루셀라, 요네, 결핵 및 구제역 검사에서 음성이 확인된 개체를 1차 선발하였다. 1차 선발된 암소 중에서 정상적인 번식주기를 가지고 있으며, 생식기 초음파 검사 결과 자궁 및 난소 발달이 양호한 개체로서 운순한 성격의 것을 최종 선발하여 공란우로 사용하였다. 선발된 공란우의 관리는 시험목장의 일반적인 관리에 준하여 개체별로 농후사료는 제한급여, 건초와 물은 자유채식 하였다.

난포란 채란

공란우로부터 생체내 난포란의 채란은 실험목적에 따라 다양한 간격으로 실시하였고, 회수된 난포란은 체외성숙, 체외수정 및 체외배양 실험에 제공하였다. 생체내 난포란 채란용 초음파는 5 MHz convex scanner 탐촉자(HCV-4710MV; Honda, Japan)가 부착된 HS-2100 (Honda, Japan) 초음파기기를 이용하였다. 탐촉자에는 17 G long needle (Kitazato, Japan)을 사용하여 미성숙 난포란을 회수하였다. 난포란의 채란 및 운반용 배양액은 D-PBS (Gibco, USA)를 기본 배양액으로 5% FBS (Gibco, USA)와 10 IU/mL Heparin (Sigma, USA)을 첨가하였다.

난포란 채란을 위하여 공란우는 보정틀이 설치된 전용 채란장에서 실시하였다. 공란우는 Xylazine HCl (Elanco Animal Pharm, Korea)과 2% lidocain hydrochloride (Daihan, Korea)를 두당 각각 0.6 mL 및 7 mL를 정맥 및 미주 1번과 2번 사이에 주입하였다. 외음부는 베타딘과 미온수로 세척한 후 완전히 건조하였다. 직장검사로 난소를 확인하고, 주사침이 부착된 탐촉자를 공란우 질내로 삽입하였다. 탐촉자의 선단에 난소를 위치하여 주사침을 이용하여 2~8 mm 크기의 난포란을 회수하였다. 채란용 배양액이 들어있는 채란관은 35℃를 유지

하며 실험을 진행하였다.

난포란이 포함된 채란용 배양액은 침전물을 제거하고 난포란을 찾기 위해 배양 접시에 담았고, 채란용 배양액으로 적절한 수준으로 희석하여 38°C warm plate에서 미성숙 난포란을 회수하였다. 회수된 난포란은 세포질이 치밀한 것을 선발하여 FBS가 함유된 Hepes M-199 (Gibco, USA) 용액으로 2~3회 세척한 후 실험에 공시하였다.

체외성숙

난포란의 체외성숙은 IVMD101 (IFP, Japan) 배양액 200 µL가 들어 있는 6-well plate (IFP, Japan)에 난포란을 최대 20개를 넣어서 39°C, 5% CO₂, 5% N₂ 배양기에서 22~24시간 동안 실시하였다.

체외수정

한우 동결정액 1개를 실온에서 10초간 방치한 후 35°C 온수에서 20초간 용해하였다. 15 mL 원심 분리관(Falcon, USA)의 상층에 2 mL 45% BoviPure (Nidacon, Sweden), 하층에 2 mL 90% BoviPure를 분주하고, 45% BoviPure 상층부에 용해된 정자를 조심스럽게 첨가하여 700 g에서 15분간 원심분리하였다. 하층부의 정자괴만을 분리하여 2 mL 체외수정용 배양액인 IVF-100 (IFP, Japan)에 혼합하여 다시 350 g에서 5분간 세척하였다.

체외 성숙된 난포란을 체외수정용 배양액으로 2회 세척한 후 mineral oil이 피복된 46 µL 체외수정용 배양액에 최대 20개씩 난포란을 넣고, 정자 농도를 2×10^6 spermatozoa/mL로 조정하여 39°C, 5% CO₂, 5% N₂ 배양기에 8시간 동안 체외수정을 유도하였다.

체외배양

체외수정된 수정란(배양 0일째)을 5% FBS 함유 Hepes M-199 배양액으로 2~3회 세척한 후 체외배양용 배양액인 200 µL IVD100 (IFP, Japan)가 들어있는 6-well plate에 넣어 39°C, 5% CO₂, 5% N₂ 배양기에서 배양하였다. 배양액은 배양 시작부터 48시간 마다 50%의 신선한 배양액으로 교체하였으며, 배양 2일째 2세포기 발달율과 배양 7일째에 배반포 발달율을 조사하였다.

수정란이식 및 임신진단

수란우는 전라북도 지역에서 사육 중인 젖소 미경산우를 사용하였다. 수란우의 발정은 CIDR-plus (Zoetis, New Zealand)를 질에 삽입하는 날을 0일로 설정하고 7일 후 dinoprost (Upjohn, U.S.A) 30 mg을 근육주사한 후 8일에 CIDR-plus를 제거하여 발정을 유도한다. 발정이 확인된 수란우는 이식 전에 직장 검사를 통하여 황체가 형성된 것만을 공시하였다. 배반포 단계의 수정란은 5% FBS 함유 Hepes M-199 배양액이 들어있는 0.25 mL 스트로우에 장착하여 38.5°C 수정란이송기(TED, Brazil)에 담아 2시간 이내에 운반하여 이식에 제공하였다. 수정란이 들어있는 스트로우는 수정란 이식기(IMV, France)에 장착하고, sheath와 cover sleeve (IMV, France)를 장착하여 수란우의 질 내로 삽입하였다. 이식기 끝이 자궁경관 입구에 도달하면 cover sleeve를 당겨서 파열시킨 후 이식기의 선단부가 질 점막에 접촉되지 않은 상태로 자궁경관에 삽입, 통과하여 황체가 존재하는 자궁각 선단부에 수정란을 주입하였다. 수정란 이식 후 30~40일경에 초음파 기기를 이용하여 임신여부를 확인하였다.

실험 조건

진공펌프 압력

생체내 난자 회수를 위한 진공펌프의 압력 조건을 설정하기 위하여, 도축장 유래 난소를 이용하여 18 G 주사기를 이용한 대조군과 진공펌프 압력을 각각 40, 50 및 60 mmHg로 설정한 실험군으로 구분하였다. 각 조건에 따른 회수 난포란 개수와 배 발달율을 조사하였다.

GnRH 효과

선발된 공란우 3두에 각각 3회씩 대조군(미투여) 및 실험군으로 구분하여 2주 간격으로 총 6회 난포란을 회수하였다. 실험군에는 OPU 36시간 전에 500 µg Gonadorelin (Dongbang, Korea)을 근육 주사하였다.

공란우 효과

선발된 공란우 9두에 대하여 각각 6회씩에 2~4주 간격으로 OPU를 통해 난포란을 회수하였으며, 회수된 난포란은 IVP를 실시하였고 배 발달율을 조사하였다.

OPU 간격

실험 간격에 따른 효과를 검토하기 위하여 공란우 7두에 대하여 각각 2주, 4주, 8주 및 12주 간격으로 OPU를 수행하여 회수 난포란 개수 및 배 발달율을 조사하였다.

OPU 회차

실험 회차에 따른 효과를 검토하기 위하여 공란우 6두에 대하여 각각 2~4 주 간격으로 총 8회차 OPU를 실시하여 각 회차별 난포란 개수 및 배 발달율을 조사하였다.

임신을

공란우 개체별 생산된 수정란의 임신율을 조사하기 위하여 공란우 7두에서 생산된 한우 수정란을 젖소 수란우에 이식 후 임신율을 조사하였다.

통계처리

각 검사 결과에 대한 분석치는 평균±표준편차(mean±SD)로 표기하였다. 통계학적 처리는 R-program (R version 4.0.3, 2020.10.10.)을 이용하여 ANOVA 분석 후 Duncan's 다중검정법으로 검증하였고, $P<0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였다. 임

신율은 chi-square test를 이용하여 유의성을 검정하였다.

결 과

진공 펌프의 압력이 난자 회수와 배발달에 미치는 효과를 분석한 결과는 Table 1과 같다. 도축장 유래의 난소를 이용한 실험에서, 대조군은 일반적인 18 G 주사기를 이용하였고, 실험군은 채란용 진공펌프 압력을 각각 40, 50 및 60 mmHg로 설정하였다. 각 압력에 따른 난포란 회수 개수는 대조군이 평균 14.3개로 가장 적었고, 60 mmHg 압력이 평균 20.3개로 가장 높았으나 유의차는 없었다. 2세포기 발달율과 배반포 발달율은 비슷한 경향이였다. 하지만 난포란 회수 개수가 많은 경우 배반포 도달 개수가 증가하므로 생체내 난포란 회수 실험의 진공압력은 60 mmHg로 설정하였다.

한우 공란우에 GnRH 투여가 생체내 난포란 회수와 배발달에 미치는 효과를 조사한 결과는 Table 2와 같다. GnRH 제제는 500 µg Gonadorelin을 채란 36시간 전에 근육 주사하였다. 난포란 회수 개수는 대조군과 처리군에서 각각 평균 4.6개 및 7.6개로서 처리군이 유의하게 많았다($P<0.05$). 2세포기 발달율은 각각 57.1% 및 70.9%, 배반포 발달율은 22.4% 및 24.2%로 차이가 없었다.

한우 공란우의 개체별 난포란 회수와 배 발달율 차이를 조사한 결과는 Table 3과 같다. 난포란 회수는 공란우에 따라서 평균 3.3개에서 평균 20.3개로서 개체별로 유의한 차이가 있었다($P<0.05$). 공란우 개체별로 2세포기 발달율은 평균 66.9~84.4%, 배반포 발달율은 평균 18.6~46.5% 및 이식 가능한 배반포 개수도 평균 1.0~11.0개로 유의차가 있었다($P<0.05$).

공란우에서 OPU 간격이 난포란 회수와 배 발달율에 미치는 효과를 조사한 결과는 Table 4와 같다. 난포란 회수 간격이 2, 4 및 8주에서는 회수된 난포란이 평균 9.7~9.9개였으나, 12주 간격에서는 평균 4.3개로 유의하게 감소되었다($P<0.05$). 하지만 배 발달율은 차이가 없었다.

Table 1. Effect of pressure of vacuum pump on oocytes aspiration and *in vitro* embryo development

Vacuum pressure (mmHg)	Number of oocytes ¹ /head	% of oocytes ¹ developed to	
		≥2-cell	Blastocyst
Control ²	14.3±7.8	86.1±10.3	25.2±8.1
40	16.3±9.8	70.6±14.2	22.4±3.7
50	19.0±9.2	75.1±6.5	29.3±9.4
60	20.3±3.4	80.7±15.1	27.1±10.4

Mean±SD.

¹Oocytes from slaughterhouse.

²Control: the oocytes are aspirated using 18 G 10 mL syringe with manual.

Table 2. Effect of GnRH treatment on oocytes aspiration and *in vitro* embryo development

	Number of oocytes aspirated/head	% of oocytes developed to		No. of transferable blastocyst
		≥2-cell	Blastocyst	
Control ¹	4.6±1.9 ^b	57.1±18.0	22.4±16.9	1.0±0.7
Treatment ²	7.6±2.5 ^a	70.9±13.1	24.2±10.2	1.8±0.8

^{a,b}Entries with different superscripts are statistically different ($P<0.05$).

Mean±SD.

¹Control: the oocytes are aspirated from donors without GnRH treatments.

²Treatment: the oocytes are aspirated from donors injected 5 mL GnRH before 36 hr.

Table 3. Relationships between donors and the recovery of oocytes and subsequent embryo development in Korean native cows

Registered number of donors	Number of oocytes aspirated/head	% oocytes developed to		No. of transferable blastocyst
		≥2-cell	Blastocyst	
002311231870	7.5±4.0 ^{cde}	84.3±11.3 ^a	38.8±20.0 ^{ab}	3.3±1.5 ^{bc}
002101767068	5.2±1.9 ^{de}	64.2±22.7 ^b	27.6±13.9 ^{abc}	1.3±0.8 ^c
002307578892	9.0±3.9 ^{bcd}	82.9±10.0 ^a	45.6±7.5 ^a	5.8±2.0 ^b
002001874183	11.0±1.8 ^{bc}	72.7±14.5 ^{ab}	31.0±16.1 ^{abc}	3.7±2.1 ^{bc}
002307749059	20.3±10.5 ^a	78.2±13.9 ^{ab}	44.1±10.1 ^a	11.0±6.1 ^a
002094326423	13.5±2.0 ^b	84.4±11.0 ^a	37.1±13.5 ^{abc}	5.5±3.1 ^b
002116326014	6.3±2.3 ^{cde}	77.9±7.3 ^{ab}	46.5±15.6 ^a	3.2±2.1 ^{bc}
002110153893	3.3±2.1 ^c	66.9±20.1 ^{ab}	20.0±15.8 ^{bc}	1.5±1.2 ^c
002112988734	4.7±1.2 ^{de}	74.5±6.8 ^{ab}	18.6±15.3 ^c	1.0±0.9 ^c

^{a,b,c,d,e}Entries with different superscripts are statistically different ($P<0.05$). Mean±SD.

Table 4. Relationships between intervals of oocyte collection and the recovery of oocytes and subsequent embryo development in Korean native cows

Aspiration intervals	Number of oocytes/head	% oocytes developed to		No. of transferable blastocyst
		≥2-cell	Blastocyst	
2 week	9.7±3.8 ^a	77.7±13.7	32.0±11.2	3.1±1.8
4 week	9.9±3.4 ^a	85.3±13.3	42.7±16.5	4.6±3.0
8 week	9.9±5.0 ^a	81.0±9.4	38.2±17.6	4.3±3.6
12 week	4.3±2.7 ^b	72.1±36.7	34.1±20.6	1.4±1.0

^{a,b}Entries with different superscripts are statistically different ($P<0.05$). Mean±SD.

Table 5. Relationships between the sessions of oocyte collection and the recovery of oocytes and subsequent embryo development in Korean native cows

Sessions ¹	Number. of oocytes aspirated/head	% oocytes developed to		No. of transferable blastocyst
		≥2-cell	Blastocyst	
1st	13.3±8.6 ^a	75.0±15.1 ^a	38.4±11.9 ^{ab}	4.8±4.4
2nd	9.8±4.5 ^{abc}	86.8±10.5 ^a	39.8±11.2 ^{ab}	4.5±3.2
3rd	10.0±4.1 ^{ab}	82.8±15.3 ^a	40.2±15.2 ^{ab}	3.7±3.8
4th	7.5±4.7 ^{abc}	72.5±19.5 ^a	36.2±27.9 ^{ab}	2.8±2.6
5th	7.3±3.3 ^{abc}	83.3±13.7 ^a	37.1±11.5 ^{ab}	2.3±1.6
6th	5.5±4.1 ^{bc}	75.7±23.8 ^a	43.2±15.8 ^a	2.7±1.9
7th	5.5±2.9 ^{bc}	86.7±10.7 ^a	43.5±16.7 ^a	3.0±1.9
8th	3.7±2.3 ^c	43.0±37.0 ^b	17.9±27.7 ^b	1.2±1.8

^{a,b,c}Entries with different superscripts are statistically different ($P<0.05$). Mean±STD.

¹The interval between sessions was 2 or 4 weeks.

공란우의 OPU 회차에 따른 난포란 회수와 배 발달율을 조사한 결과는 Table 5와 같다. OPU 차수가 1회차에서는 회수 난포란이 평균 13.3개로 가장 많았으며, 2회차에서 5회차까지는 평균 7.3~10.0개로 차이가 없었으나, 6회차 이후에는 평균 5.5~3.7개로 유의하게 감소하는 경향이 있었다($P<0.05$).

OPU 난자를 제공하는 한우 공란우에 따른 임신율을 조사한 결과는 Table 6과 같다. 137두의 홀스타인 수란우에 한우 수정란을 이식하여 41.8% 임신율을 확인하였고, 공란우에 따라 33.3~46.4%가 조사되었으나 유의차는 없었다.

Table 6. Relationships between donors and the pregnancy rate after transfer to Holstein heifers

Donors	Number of recipients	Number of pregnancy	Pregnancy rate (%)
002311231870	17	6	35.3%
002101767068	9	4	44.4%
002307578892	30	13	43.3%
002001874183	7	3	42.9%
002307749059	28	13	46.4%
002094326423	28	12	42.9%
002116326014	18	6	33.3%
Total	137	57	41.8%

고 찰

본 연구는 한우 OPU-IVF 수정란 생산 효율을 향상 시키기 위하여 채란시 진공펌프 압력, 성선자극호르몬방출호르몬 투여 효과, 공란우 개체 차이, OPU 간격 및 회차 등의 요인이 난포란의 회수와 배 발달에 미치는 효과를 조사하였고, 체외생산된 수정란의 이식 후 임신율을 조사하였다.

OPU는 온도 및 공기 조절과 오염 방지 시설이 설치되어 있고, 시술자의 작업과 공란우의 이동 동선이 잘 갖춰진 환경에서 초음파 및 각종 채란 장비를 이용하여 시행한다. 초음파 장비에는 20~17 gauge, 4~60 cm인 채란 바늘을 진공펌프에 연결하여 사용하고 있다. 난포란의 회수와 품질에는 채란 환경과 온도, 품종(*Bos Indicus* vs. *Bos Taurus*), 유전적 요인 및 영양상태 등이 영향을 미친다(Leroy 등, 2008a, b, 2011; Merton 등, 2009). 특히 진공펌프의 압력은 난포란의 회수율과 품질 및 배 발달에 직접적인 원인으로 작용한다(Scott 등, 1994; Galli 등, 2000; Ward 등, 2000). 채란 압력이 높아지면 총 회수되는 난포란의 개수는 증가하지만 나화 또는 손상된 난포란의 수가 증가하여 배 발달율은 오히려 낮아진다. 즉, OPU 과정에서 난포란의 회수율은 높이고 손상을 낮추기 위하여 적절한 기준 설정이 반드시 필요하다. 난포란의 흡입 압력의 범위는 30~50 mmHg (Ward 등, 2000), 40~400 mmHg (Pieterse 등, 1988), 40~115 mmHg (Bols 등, 1997), 70~75 mmHg (Cho 등, 2017) 등으로 다양하게 보고하고 있다. 그중 30 mmHg 압력이 일반 주사기의 압력과 유사한 난포란의 품질을 나타냈다고 보고하였다(Ward 등, 2000). 난포란의 회수에서 채란 바늘 끝 부분의 정확한 흡입 압력은 OPU 장비의 구성, 채란 튜브의 길이와 직경, 채란 바늘 굵기에 따라 결정되며, 전체 채란 튜브와 바늘의 길이를 계산하여 채란액의 유량을 20~25 mL/min으로 조절하는 것이 효과적이다(Galli 등, 2000). 본 연구에서는 제조

사의 기준에 따라 진공펌프 압력을 각각 40, 50 및 60 mmHg로 설정하여 난포란 회수율과 배 발달율을 조사하였다. 그 결과 60 mmHg 압력에서 난포란의 회수율 가장 높았고, 배 발달율은 50~60 mmHg에서 높은 경향이였다. 한편 과도하게 채란 압력이 높은 경우 난포란 회수율과 배 발달율이 낮은 원인은 채란 바늘 주위에서 난포란 회수 직전에 난포가 파열되면서 정확한 난포란의 회수가 이루어지지 않고, 과도한 압력은 난구세포와 난자를 분리시켜 난구세포가 없는 난포란이 증가하여 품질 저하를 유발하기 때문이다. IVP 과정에서 수정란의 발달 능력은 채란 및 체외성숙 시작 시점에 난구세포의 부착 정도가 영향을 미친다(Blondin와 Sirard, 1995; Hawk와 Wall, 1995). 따라서 한우 OPU에 있어서 난포란의 회수에 여러 가지 요인이 영향을 미치지만 효과적인 압력 기준은 60 mmHg인 것으로 판단된다.

GnRH는 시상하부에서 분비되어 뇌하수체 전엽의 분비세포에 작용하여 FSH와 luteinizing hormone (LH)의 방출을 촉진한다. FSH는 난소의 난포 발육을 자극하고, LH surge는 배란 전 난포란 성숙을 촉진한다(Sunderland 등, 1994). OPU에서 난포란 회수율과 배 발달율을 높이기 위하여 GnRH (Matoba 등, 2014), FSH (De Roover 등, 2005; Demetrio 등, 2020), CIDR-plus+FSH+LH (Caubal 등, 2007), FSH+GnRH (Sakaguchi 등, 2019), GnRH-LH surge 유도(Hendriksen 등, 2000; Rizos 등, 2002) 등 다양한 방법이 제시되고 있다. GnRH 투여는 LH surge를 유도하여 체내에서 성숙된 난포란을 회수할 수 있어서 배발달 능력이 높아진다(Matoba 등, 2014). 또한 GnRH 투여 후 1.5일에는 혈중 progesterone 농도를 높게 유지할 수 있고(Matoba 등, 2014), 고농도 progesterone은 수정란의 품질을 향상시킨다(Nasser 등, 2011; Pursley와 Martins, 2011; Rivera 등, 2011). FSH 투여로 난포란의 회수 개수가 회당 19.9개로 미처리 공란우의 회당 15.4개에 비하여 효율적이라고 하였다. 하지만, 호르몬의 빈번한 사용은 과자극 부작용 등으로 공란우 재사용 기간 감소 문제도 제시되었다(Chaubal 등, 2006). 한편, 젖소에서 GnRH 투여 후에 난포란의 회수(평균 18.8 vs. 24.6) 성적이 향상되었고(Matoba 등, 2014), 본 연구에서도 난포란의 회수 개수가 평균 4.6개에서 평균 7.6개로 유의하게 증가하였다(Table 2). Galli 등(2014)은 GnRH 처리는 난포의 크기가 커지면서 난포란의 회수가 쉬워져서 OPU에 효과적이라고 하였다. 본 연구에서 GnRH 처리가 배 발달율에는 효과가 없었으나, 회수된 난포란의 개수가 증가함에 따라 이식 가능한 배반포의 생산이 증가하므로 OPU-IVF 수정란 산업화에 효과적이라고 판단된다. 또한 국내 실정에서 FSH와 LH 호르몬은 가격이 고가여서 GnRH를 응용하는 방법이 생산성 증가

에 효과적일 것으로 판단된다.

Cho 등(2017)은 한우 공란우 개체별로 회수된 난포란이 평균 8.8~14개였고, 배반포 발달율은 개체별로는 25~30%로 차이가 있었다고 하였으며, Jin 등(2015)은 한우 공란우에서 회수된 난포란의 개수가 평균 8.5~17.0개, 배 발달율도 28.9~64.4% 및 생산 배반포도 평균 2.8~7.1개로 유의적인 차이가 있음을 보고하였다. 본 연구에서도 한우 공란우 개체별로 회수된 난포란의 개수가 공란우에 따라서 평균 3.3개에서 평균 20.3개로서 개체별로 유의한 차이가 있었다($P<0.05$). 2세포기 발달율(평균 66.9~84.4%) 및 배반포 발달율(평균 18.6~46.5%)도 개체별로 유의한 차이가 있었다($P<0.05$) (Table 3). Kim과 Park (2011)은 한우 육질과 육량 등급에 따라 회수되는 난포란의 개수가 차이가 있으며, 육질 A 등급, 육량 1++ 및 1+ 등급이 타 등급에 비하여 많은 난포란이 회수되었으나, 유전적 요인인 계대수는 차이가 없었다. 특히 영양적인 측면에서 농후사료 과급은 과배란 반응성을 감소시키고(Staigmiller 등, 1979; Nolan 등, 1998; Yaakub 등, 1999), 수정란의 포도당 대사를 변화시켜 세포사멸을 촉진시킨다(Santos 등, 2008). 과도한 단백질 흡수는 체액에서 요소와 암모니아를 증가시켜 수정란의 발달에 유해하게 작용한다고 하였다(Santos 등, 2008). 또한 과도한 지방 축적에 따른 난포액내의 지방산 농도의 증가도 수정과 초기 배 발달에 유해하게 작용한다(Leroy 등, 2005). 이상의 결과와 본 연구의 결과를 비교하면 한우 공란우의 난포란 회수율과 배 발달율에는 유전 또는 혈통에 따른 개체 차이보다는 개체별 영양상태가 많은 영향을 미치는 것으로 판단되며, 향후 공란우에 적합한 사양체계와 관련된 연구가 필요할 것으로 판단된다.

주별 1회 난포란의 회수는 우세 난포가 매 회 채란시에 형성되므로 성장 난포(중숙 난포)는 퇴행한다. 하지만 2회/주 간격의 난포란 회수는 우세난포가 형성되지 않기 때문에 가시난포의 회수 효율이 증가한다. 따라서 호르몬 자극없이 2회/주 간격으로 난포란을 채취하는 것이 우세난포 출현을 피하면서(Marchatková 등, 2004), 부작용 없이 OPU에 효과적이다(Galli 등, 2001, 2014; Chastant-Maillard 등, 2003). De Roover 등(2008)은 매주 2회 OPU는 회당 평균 0.7개를, 2주마다 1회 OPU는 평균 3.4개의 수정란 생산을 보고하여 빈번한 채란보다 일정 간격을 두고 하는 것이 수정란 생산에 효과적이라고 하였다. 또한 빈번한 채란은 난소 표면이 딱딱해지는 문제로 반복 채란이 어려울 수도 있다. 특히 한우의 자궁 및 난소의 표면이 상대적으로 젖소나 타 육우에 비하여 약하기 때문에 빈번한 난포란 회수는 생식기 이상 등의 문제를 초래할 수 있다. 본 연구의

사전 실험으로 한우 공란우에 주 2회 난포란 회수를 시도하였으나, 난포란 회수율 감소, 공란우 통증 유발 및 직장과 생식기 부종 등으로 인한 어려움이 있었다. 따라서 본 연구에서는 단기간 다회 채란 보다는 한우의 특성을 감안하여 충분한 회복기를 가지면서 장기간 공란우의 활용을 목표로 하였다. 난포란 회수 간격이 2, 4 및 8주는 회수된 난자가 평균 9.7~9.9개였으며, 12주 간격에서는 평균 4.3개로 유의하게 감소되었으나($P<0.05$), 배 발달율은 차이가 없었다(Table 4). 따라서 적정 회복기간은 2~4주가 효과적이며, 장기간의 회복은 오히려 OPU-IVF의 효율성이 낮아지는 것으로 판단된다.

Chaubal 등(2006)은 1회/주 또는 2회/주 간격으로 채란한 결과 10주까지 배반포 발달이 0.8~0.9개로 10주까지는 차이가 없는 것으로 보고하였다. Jin 등(2010)은 1주일 2회씩 채란하였을 때 회수된 난포란의 개수는 1~3개월까지는 평균 5.2~6.2개로 차이가 없었으나, 4개월부터 6개월까지는 3.7~1.2개로 급격히 감소하였다. 또한 배 발달율과 이식 가능한 배반포 개수도 4개월 이후 급격히 감소하는 경향을 보고하였다. 본 연구에서도 5회차인 4~5개월까지는 난포란 회수율은 차이가 없었으나, 이후에는 급격히 감소하였다. 한편 배반포 발달율도 7회차까지는 차이가 없었고 8회차에는 낮아져서, 시기의 차이는 있었으나 일정 기간 동안 채란에 활용하고 나면 난포란 회수율과 배 발달율이 감소하는 경향을 확인할 수 있었다. Table 4와 Table 5의 결과를 종합하면 OPU-IVP 활용 측면에서 한우 공란우는 2~4주 간격으로 7회 정도까지 이용에는 문제가 없는 것으로 판단된다.

수정란이식 임신율에는 수정란의 품질뿐만 아니라 수란우의 건강, 시술자 기술을 포함한 많은 요인들이 영향을 미친다(Hasler, 2001). 과배란처리 체내생산 수정란의 임신율이 체외생산 수정란에 비하여 높다(Numabe 등, 2000). 또한 OPU-IVF 수정란의 임신율에는 난포란의 개수에 따른 영향은 없었다(Snijders 등, 2000). 한우에서 일반적으로 체외생산된 수정란의 임신율은 40% 정도로 보고되고 있고, 유전적 요인인 등록 기준 및 개체 특이성인 육량과 육질 등급에 따른 임신율의 차이는 없는 것으로 보고되었다(Kim과 Park, 2011). 본 연구에서도 공란우의 개체별 체외수정란의 임신율을 조사한 결과 평균 41.8%였고 33.3~46.4%의 차이를 나타냈으나 유의차는 없었고(Table 6), 이전 한우 임신율과 유사한 경향이였다. 따라서 한우 공란우에서 개체별로 정상적으로 발달된 수정란을 이식한다면 평균 40% 이상의 임신율은 확보가 가능할 것으로 판단된다.

이상에서와 같이 다양한 요인들을 기준으로 OPU-IVP 과정에서 난포란의 회수 및 배 발달율을 비교한 결과를 요약하면

다음과 같다. 한우 공란우의 특성을 고려하면, 진공압력은 60 mmHg, GnRH 전처리를 통한 난포 성장 유도, 2~4주 간격으로 7회까지 활용 기준을 설정할 수 있었다. 본 연구 결과는 우량 한우를 이용한 수정란 생산 및 산업화에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 2020~2021년도 경상국립대학교 대학회계 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

CONFLICT OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

ORCID

Yong Soo Park, <https://orcid.org/0000-0002-1948-0919>
Jun Ho Kong, <https://orcid.org/0000-0002-5882-4809>
Jun Koo Yi, <https://orcid.org/0000-0003-2593-6529>
Dong yep Oh, <https://orcid.org/0000-0003-4412-7719>
Ki Hwa Chung, <https://orcid.org/0000-0002-6446-5312>

REFERENCES

- 농림축산식품부. 2020. 정액증명서등. 축산법 제18조.
- Blondin P, Sirard MA. 1995. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 41: 54-62.
- Bols PEJ, Ysebaert MT, Van Soom A, de Kruif A. 1997. Effect of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocytes complexes. *Theriogenology* 46: 899-909.
- Chastant-Maillard S, Quinton H, Lauffenburger J, Cordonnier-Lefort N, Richard C, Marchal J, Mormede P, Renard JP. 2003. Consequences of transvaginal follicular puncture on well-being in cows. *Reproduction* 125: 555-63.
- Chaubal SA, Ferre LB, Molina JA, Faber DC, Bols PJ, Rezamand PTX, Yang X. 2007. Hormonal treatments for increasing the oocyte and embryo production in an OPU-IVP system. *Theriogenology* 67: 719-728.
- Chaubal SA, Molina JA, Ohlrichs CL, Ferre LB, Faber DV, Bols PEJ, Riesen JW, Tian X, Yang X. 2006. Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over at 10-week period in cows. *Theriogenology* 65: 1631-1648.
- Cho SR, Kang SK, Kim UH, Lee SD, Lee MS, Yang BC. 2017. Study on ovum-pick up for improvement of embryo transfer efficiency in hanwoo cows. *J. Emb. Trans.* 32: 147-151.
- De Roover R, Feugang JM, Bols PE, Genicot G, Hanzen C. 2008. Effects of ovum pick-up frequency and FSH stimulation: a retrospective study on seven years of beef cattle in vitro embryo production. *Reprod. Domest. Anim.* 43: 239-45.
- De Roover R, Genicot G, Leonard S, Bols P, Dessy F. 2005. Ovum pick up and in vitro embryo production in cows superstimulated with an individually adapted superstimulation protocol. *Ani. Reprod. Sci.* 86: 13-25.
- Demetrio D, Looney C, Rees H, Werhman M. 2020. Statistical information committee report (2019 DATA). Annual Report of the AETA Statistical Information Committee. (https://www.aeta.org/docs/2019_Stats.pdf)
- Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R, Lazzari G. 2001. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology* 55: 1341-57.
- Galli C, Duchi R, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G. 2014. Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: from the research laboratory to clinical practice. *Theriogenology* 81: 138-151.
- Galli C, Grotti G, Notari C, Turini P, Duchi R, Lazzari G. 2000. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology* 55: 1341-1357.

- Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, Mower SA, Neely B, Shuey LS, Stokes JE, Trimmer SA. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 43: 141-152.
- Hasler JF. 2001. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* 56: 1401-1415.
- Hasler JF. 2014. Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology* 81: 152-169.
- Hawk HW, Wall RJ. 1995. Improved yield of bovine blastocysts from in vitro produced oocytes selection of oocytes and zygotes. *Theriogenology* 41: 1571-1583.
- Hendriksen PJM, Vos PLAM, Steenweg WNM, Bevers MM, Dieleman SJ. 2000. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. *Theriogenology* 53: 11-20.
- Jin JI, Choi BH, Kim SS, Jo HT, Sun DW, Lim HT, Lee JG, Min CS, Kong IL. 2014. Transplantation and production of OPU derived hanwoo IVP embryos. *J. Emb. Trans.* 29: 273-281.
- Jin JI, Choi BH, Kim SS, Park BY, Lee JG, Kong IL. 2015. Possibility of repeated use of elite cows for mass production of OPU-derived embryos. *J. Emb. Trans.* 30: 149-159.
- Jin JI, Kwon TH, Choi BH, Kim SS, Jo HT, Kong IK. 2010. Effect of OPU(ovum pick-up) duration on the rate of collected ova and in vitro produced blastocyst formation. *J. Emb. Trans.* 25: 15-20.
- Kim SS, Park YS. 2011. Associations between pedigree, meat quality, and meat quantity of slaughterhouse donor cows and oocyte recovery, embryo development, and pregnancy after embryo transfer. *Live-stock Science* 142: 42-47.
- Leroy JL, Opsomer G, Van Soom A, Goovaerts IG, Bols PE. 2008a. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part I. The importance of negative energy balance and altered corpus luteum function to the reduction of oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.* 43: 612-622.
- Leroy JL, Rizos D, Sturmey R, Bossaert P, Gutierrez-Adan A, Van Hoeck V, Valckx S, Bols PEJ. 2011. Intrafollicular conditions as a major link between maternal metabolism and oocyte quality: a focus on dairy cow fertility. *Reprod. Fertil. Dev.* 24: 1-12.
- Leroy JL, Van Soom A, Opsomer G, Goovaerts IG, Bols PE. 2008b. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part II. Mechanisms linking nutrition and reduced oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.* 43: 623-632.
- Leroy JL, Vanholder MR, Mateusen T, Christophe B, Opsomer A, de Kruif G, Genicot A, Van Soom A. 2005. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. *Reproduction* 130: 485-495.
- Lonergan P, Fair T, Corcoran D and Evans ACO. 2006. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology* 65: 137-152.
- Machatkova M, Krausova K, Jokesova E, Tomanek M. 2004. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. *Theriogenology* 61: 329-335.
- Matoba S, Yoshioka H, Matsuda H, Sugimura S, Aikawa Y, Ohtake M, Hashiyada Y, Seta T, Nakagawa K, Lonergan P, Imai K. 2014. Optimizing production of in vivo-matured oocytes from superstimulated-Holstein cows for in vitro production of embryos using X-sorted sperm. *J. Dairy Sci.* 97: 743-753.
- Merton JS, Ask B, Onkundi DC, Mullaart E, Colenbrander B, Nielen M. 2009. Genetic parameters for oocyte number and embryo production within a bovine ovum pick-up-in vitro production embryo-production program. *Theriogenology* 72: 885-893.

- Merton JS, de Roos AP, Mullaart E, de Ruigh L, Kaal L, Vos PL, Dieleman SJ. 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* 59: 651-674.
- Nasser LF, Sa Filho MF, Reis EL, Rezende CR, Mapletoft RJ, Bo GA, Baruselli PS. 2011. Exogenous progesterone enhances ova and embryo quality following superstimulation of the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* 76: 320-327.
- Nolan R, O'Callaghan D, Duby RT, Lonergan P, Boland MP. 1998. The influence of short-term nutrient changes on follicle growth and embryo production following superovulation in beef heifers. *Theriogenology* 50: 1263-1274.
- Numabe T, Oikawa T, Kikuchi T, Horiuchi T. 2000. Production efficiency of Japanese black calves by transfer of bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology* 54: 1409-1420.
- Park SJ, Yang S, Im KS, Sang HH, Chang WK, Cheong IC, Park CS. 2000a. The study of factor concentrating ovum pick-up and conception rate by ultrasound-guided follicular aspiration in hanwoo heifers. *Korean J. Animal Reprod.* 24: 199-208.
- Park SJ, Yang BS, Im GS, Seong HH, Chang WK, Park CS. 2000b. Studies on the ultrasound-guided transvaginal retrieval of oocytes in korean native, hanwoo heifers I. Characteristics of hanwoo ovary during the estrous cycle. *Korean J. Animal. Reprod.* 24: 77-82.
- Park SJ, Yang BS, Im GS, Seong HH, Chang WK, Park CS. 2000c. Studies on the ultrasound-guided transvaginal retrieval of oocytes in korean native, hanwoo heifers II. Effects of repeated ovum pick-up on oocyte recovery and estrous cycle. *Korean J. Animal. Reprod.* 24: 83-88.
- Pieterse MC, Kappen KA, Kruop ThAM, Taverne NAM. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 30: 751-762.
- Pursely JR, Martins JP. 2011. Impact of circulating concentrations of progesterone and antral age of the ovulatory follicle on fertility of high-producing lactating dairy cows. *Reprod. Fertil. Dev.* 24: 267-271.
- Rivera FA, Mendonca LGD, Lopes Jr. G, Santos JEP, Perz RV, Amstalden M, Correa-Calderon A, Chebel C. 2011. Reduced progesterone concentration during growth of the first follicular wave affects embryo quality but has no effect on embryo survival post transfer in lactating dairy cows. *Reproduction* 141: 333-342.
- Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P. 2002. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro verses in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol. Reprod. Dev.* 61: 234-248.
- Sakaguchi K, Maylem ERS, Tilwani RC, Yanagawa Y, Katagiri S, Atabay EC, Atabay EP, Nagano M. 2019. Effects of follicle-stimulating hormone followed by gonadotropin-releasing hormone on embryo production by ovum pick-up and in vitro fertilization in the river buffalo (*Bubalus bubalis*). *Anim. Sci. J.* 90: 690-695.
- Santos JEP, Cerri RLA, Sartori R. 2008. Nutritional management of the donor cow. *Theriogenology* 69: 88-97.
- Scott CA, Robertson L, de Moura RTD, Patterson C, Boyd JS. 1994. Technical aspects of transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration in cows. *Vet. Rec.* 134: 440-443.
- Snijders SEM, Dillon P, O'Callaghan D, Boland MP. 2000. Effect of genetic merit, milk yield, body condition and lactation number on in vitro oocyte development in dairy cows. *Theriogenology* 53: 981-989.
- Staigmiller RB, Short RE, Bellows RA, Carr JB. 1979. Effect of nutrition on response to exogenous FSH in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 48: 1182-1190.
- Su L, Yang S, He X, Li X, Ma J, Wang Y, Presicce GA, W Ji. 2012. Effect of donor age on the developmental

- competence of bovine oocytes retrieved by ovum pick up. *Reprod. Dom. Anim.* 47: 184-189.
- Sunderland SJ, Crowe MA, Boland MP, Roche JF, Ireland JJ. 1994. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *J. Reprod. Fertil.* 101: 547-555.
- Van Wagendonk-de Leeuw AM, Mullaart E, Roos de APW, Merton JS, Den Daas JHG and de Ruigh L. 2000. Effects of different reproduction techniques: AI, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology* 53: 575-597.
- Ward FA, Lonergan P, Enright BP, Boland MP. 2000. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technology. *Theriogenology* 54: 433-446.
- Yaakub H, O'Callaghan D, Boland MP, 1999. Effect of type and quantity of concentrates on superovulation and embryo yield in beef heifers. *Theriogenology* 51: 1259-1266.