

인공수정 및 수정란이식 후 젖소의 혈액과 유즙에서 Progesterone과 Estrogen 농도 변화와 수태율과의 상관관계

한영훈¹ · 김홍래¹ · 조운비¹ · 김영훈² · 우제석³ · 진동일^{1*}

Progesterone and Estrogen Levels in Holstein Blood and Milk Following Artificial Insemination and Embryo Transfer

Rong-Xun Han¹ · Hong-Rye Kim¹ · Yun-Fei Diao¹ · Young Hoon Kim² · Je Seok Woo³ · Dong-Il Jin^{1*}

ABSTRACT

Early pregnancy diagnosis of bovine is an essential component for efficient reproductive plan in farms because long term of non-pregnancy results in economic losses by failure of offspring production and low milk yield in dairy cattle. The major steroid hormones related with reproduction are known to be progesterone and estrogen in bovine pregnancy. To evaluate detection level of hormones in milk, plasma and milk progesterone and estrogen of Holstein cows was analyzed during artificial insemination (AI) and embryo transfer (ET). Progesterone concentration at 21 days postestrus was significantly different in plasma and milk between pregnant and non-pregnant cows. Estrogen concentration at estrus was higher in pregnant recipients than that in non-pregnant recipients. To analyze correlation between hormone levels and conception rates in Holstein, the conception and return rates were checked following AI, and the returned cows were on the track of pregnancy after consecutive AI. Pregnant cows following first AI were considered as high conception group while pregnant cows following third AI were rated as low conception group. Proportion of high and low conception groups in this study was 78.2% and 9.1%, respectively. Hormone analysis indicated that high conception group had higher estrogen level during estrus than low conception group (26.45±3.32 vs 19.017±2.97). Progesterone level was not different between high and low conception groups during estrus but increased significantly after 21 days postestrus (21 day: 4.95±1.12 vs 0.95±0.23, 35 day: 12.47±3.82 vs 2.41±1.21). In conclusion, the pattern of progesterone and estrogen secretion in Holstein milk samples could be a good candidate for early pregnancy detection and selection of recipients during ET.

Key words: Progesterone, Estrogen, Plasma, Milk, Holstein, Fertility

1. 서론

임신은 포유동물의 일생에 있어서 가장 복잡한 생리현상으로서 임신기간 동안에는 신체에 현저한 변화가 일어나는데, 그 중에서 큰 변화는 혈액 중 임신에 관여하는 호르몬의 변화인데 progesterone과 estrogen 등의 변화가 현저하게 관찰된다. 젖소에서 이상적인 번식주기는 분만간격이 약 360일, 분만 후 첫 수정일은 60일 이내이어야 하며, 우리나라 농가에서는 평균적으로 분만 후 60일 이내에 발정을 보이는 소의 수는 85%, 첫 수정 때의 수태율은 70% 이상, 수태당 수정회수는 2회 이하, 첫 분만 시의 연령은 24

개월을 유지하고 있다(Lee, 1999). 이러한 효율적인 번식주기를 유지하기 위해서는 번식관리가 중요하는데, 번식효율에 영향을 미치는 요인으로는 무발정, 발정장해, 수태장해, 조기태아사망, 유산, 분만지연과 난산 등이 있다(Borsberry와 Dobson, 1989; Son 등, 1990; Dohmen 등, 1995; Stevens 등, 1995; Parsley 등, 1997; Son 등, 1998; Lee 등, 2000). 번식효율을 증진시키기 위해서는 인공수정 혹은 수정란이식 후 임신진단의 정확성을 높여야 하는데, 현재 초기 임신진단에 주로 사용된 방법은 인공수정 혹은 수정란이식 30일 혹은 60일 경과 후에 초음파 혹은 직장검사를 통하여 진행하였다. 하지만 이러한 방법들은 진단 기기의 가격이 높거나 필요시 수의사나 전문가가 현장에서 직접 진단하여야 하는 문제점이 있어 일반농가에서 널리 사용되기 어려운 상황이다.

혈액 및 우유 중 progesterone 농도측정은 가축번식영역에서 황체기능을 추측하는 유일한 수단으로서 수정 적기의 판정, 조기임신진단, 번식장애진단 등에 사용되고 있다(Garland 등, 1976; Foote 등, 1982; Roelofs 등, 2006). 조기 임신진단은 소 사육 농장에서 성공적인 경영을 위한 중

¹ 충남대학교 동물자원생명과학과(Dept. of Animal Science & Biotechnology)

² 제주축산진흥원(The Livestock Promotion Agency of the Jeju Special Self-Governing Province)

³ 국립축산과학원(National Institute of Animal Science)

* Corresponding author: 진동일(Dong-Il Jin)

Tel.: +82-42-821-5876 Fax: +82-42-825-9754

E-mail: djjin@cnu.ac.kr

2010년 10월 7일 투고

2010년 11월 14일 심사완료

2010년 12월 13일 게재확정

요한 요인이 된다(Oltenacu 등, 1990). 이에 따라 임신성립에 따른 혈중 progesterone 농도가 임신한 후 증가하는 원리를 사용한 방사선면역법과 효소면역분석법을 이용하여 진단하는 방법이 개발되었는데 번식호르몬농도측정에 의한 조기임신진단의 임신진단 시기는 21~24일로, 진단시기가 빠르지만 그 정확성에 대해서는 연구보고에 따라 많은 차이를 보이고 있고 임신양성 진단율은 80~97%, 임신음성진단율은 84.6~100%로 보고되었다(Laing 등, 1980; Shemesh 등, 1983). Kim 등(1990)은 제주마에서 혈청 progesterone 수준측정을 통한 말에서 조기임신진단을 시도하였으며, Kim 등(2008년)은 개에서 혈중 progesterone 농도 측정에 의해 배란시기를 추정하는 실험을 하였다. 또한 분만 후 60일 이내 젖소 혈액과 우유에서 임신진단을 위해 progesterone의 농도측정을 통해 임신감별에 대한 연구가 활발히 시도되었으나 실용적인 방법은 아직 개발되지 못하고 있는 실정이다(Lamming과 Darwash, 1998; Lee, 1999). 더욱이 인공수정과 수정란이식을 실시한 젖소에서 임신초기인 수정 후 21일, 35일 및 40일 등에 따른 혈액과 우유 중 progesterone과 estrogen의 변화 패턴분석에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 젖소에서 인공수정 혹은 수정란이식 후 혈액과 우유 내에 존재한 progesterone과 estrogen의 변화패턴을 분석하고 수태율과의 상관관계를 분석하여 임신확률을 향상시키는데 필요한 기초자료를 만들고자 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 혈청 시료

충남대학교 동물사육장과 제주중축원에서 정상적으로 발정주기를 나타내는 36두의 소로부터 발정 시, 수정 후 21일령, 35일령 또는 42일령의 혈청을 확보하였고, 수정 후 50일령과 60일령에 임신감정을 실시하여 임신과 비임신으로 나누어 20두의 임신우와 16두의 비임신우의 혈청시료를 확보하였다. 충남대학교 동물사육장에서는 인공수정에 따른 혈액을 채취하였으며 제주중축원에서는 수정란이식용 수란우의 혈액을 채취하여 발정 시, 수정란 이식 시, 수정 후 21일령의 혈액시료를 확보하였다. 수란우는 수정란 이식 후 약 40일령에 초음파진단에 의해 임신여부를 확인하였다. 혈액은 채취 후 원심분리시켜 혈청만을 회수하여 분석 시까지 -20°C에 냉장 보관하였다.

2. 우유 시료

충남대학교 동물사육장에서 정상적으로 발정주기를 나타내는 젖소로부터 인공수정한 소로부터는 시기별 유즙을 채

취하였으며, 수정 후 30일령, 50일령, 70일령, 100일령 150일령 등의 우유를 채취하였다. 채취 후 pH를 4.6으로 낮추고 원심분리 하여 케이신 단백질을 제거하고 유청만을 회수하여 분석 시까지 -20°C에 냉장 보관하였다. 인공수정 후 약 60일령 사이에 직장검사와 초음파진단에 의해 임신여부를 확인하여 임신우유시료와 비임신 우유시료로 구분하였고, 그 후 임신 시기별로 우유를 채취하여 보관하였다. 우유시료는 총 80여개로 비임신 18개 및 임신 30일령전후 15개, 50일령전후 18개, 100일령 25개, 150일령 16개, 200일령 15개를 실험에 사용하였다.

3. 호르몬 측정

소 호르몬 분석용 ELISA kit(Endocrine Technologies Inc, Newark, CA, USA)를 이용하여 혈청내 estrogen과 progesterone의 농도를 시기별로 분석하였다. 먼저 냉장된 혈청 샘플과 ELISA kit을 상온에서 약 30분간 해동 후 microplate well에 스탠다드 시료와 QC 콘트 시료, 그리고 소혈청 시료를 각각 25 µL(estrogen) 또는 50 µL(progesterone)씩 분주하고, 각각의 well에 enzyme conjugate 용액을 100 µL씩 첨가하였다. anti-rabbit antibodies를 각 50 µL씩 첨가한 후 30초간 shaker에서 섞은 후 37°C 배양기에서 2시간 배양하였다. 배양이 끝난 microplate을 세척용액으로 5번 세척하였고 microplate에 TMB substrate 용액을 100 µL씩 분주하고, 상온에서 20분간 배양하였다. 정지반응 용액을 50 µL씩 첨가한 후 shaker에서 섞어준 다음 microplate reader를 이용하여 450 nm의 파장으로 시료의 progesterone과 estrogen농도를 분석하였다.

우유시료도 ELISA 방법으로 progesterone과 estradiol의 농도를 조사하여 임신과 비임신에 따른 변화를 비교 분석하였다. 소 호르몬 분석용 ELISA kit(Endocrine Technologies Inc, Newark, CA, USA)를 이용하여 우유 내 호르몬농도를 시기별로 분석하였다. 냉장된 우유시료와 ELISA kit를 상온에 약 30분간 정체시킨 후 microplate well에 스탠다드 시료와 QC 콘트 시료, 그리고 우유 시료를 각 well에 넣고 anti-rabbit antibodies를 첨가한 후 배양기에서 2시간 배양하고, 배양이 끝난 microplate을 세척용액으로 5번 세척하였고, microplate reader를 이용하여 450 nm의 파장으로 시료를 분석하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 혈청 호르몬 분석

ELISA kit를 이용하여 소 혈청에 대해 estrogen과 progesterone의 농도를 분석하였다. progesterone의 농도는 발정 시에는 임신우와 비임신우에서 큰 차이를 나타내지는 않

Table 1. Mean plasma concentrations of progesterone and estrogen in pregnant and non-pregnant Holstein cows at the time of estrus, embryo transfer and 21 days postestrus.

Days	Non-pregnant		Pregnant	
	Estradiol (pg/mL)	Progesterone (ng/mL)	Estradiol (pg/mL)	Progesterone (ng/mL)
Estrus	17.05±3.53	1.38±0.59	18.37±7.15	1.19±0.51
Embryo transfer	13.91±5.08	1.92±1.29	25.98±10.25	3.66±1.12
Day 21	26.21±9.53	0.63±0.11 ^a	21.71±13.95	5.60±1.28 ^b

^{a, b} Within a row, different superscripts imply significant differences (P<0.05).

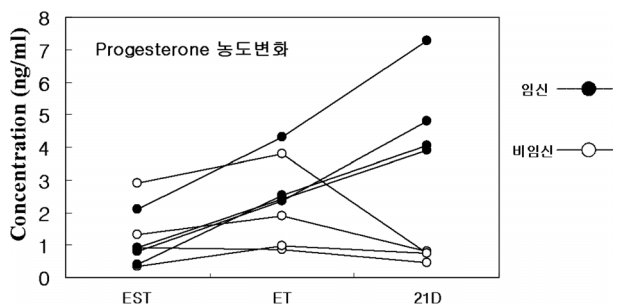


Fig. 1. Plasma progesterone concentrations of pregnant and non-pregnant recipients in estrus, embryo transfer and 21 days postestrus (EST; estrus, ET: embryo transfer, 21D; 21 days postestrus).

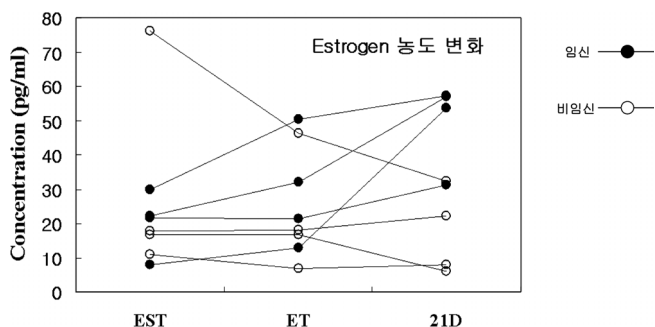


Fig. 2. Plasma estrogen concentrations of pregnant and non-pregnant recipients in estrus, embryo transfer and 21 days postestrus (EST; estrus, ET: embryo transfer, 21D; 21 postestrus).

았으나 수정란이식 시와 21일령 및 AI 후 21일령, 35일령, 42일령에서는 임신우에서 비임신우보다 유의적으로 높게 나타났다(Table 1, Fig. 1). 또한 임신우의 경우 시간이 흐르면서 progesterone의 농도가 증가하는 반면, 비임신에서는 오히려 감소하는 경향을 나타내고 있어, 임신 초기의 임신 여부 지표로서 progesterone의 측정이 확실한 임신진단수단으로 활용되고 있는 것이 당연한 것으로 사료된다. estrogen의 경우는 각 시기별 임신우와 비임신우 사이에는 큰 차이를 나타내지 않았으며, 비임신우의 시기별 농도를 살펴보면 21일령에서 estrogen농도가 다시 상승하는 특징을 나타내고 있으나 임신우의 경우 비임신우에 비해 21일령에서 estrogen이 높은 경향을 나타내고 있다(Fig. 2). 또한 수란우의 경우 발정 시에 estrogen의 농도가 높은 것이 임신 확

률이 높은 것으로 나타났다.

이러한 혈청에서의 progesterone 농도의 변화를 이용하면 젖소에서 배란시기나 임신을 예측할 수 있는데 수정 후 7일령 이후에 5-10 ng/mL 농도에서 임신가능성을 확인하는데 이용할 수 있는 것으로 보고되고 있다(Laing 등, 1980; Foote 등, 1982; Roelofs 등, 2006). Roelofs 등(2006)은 젖소에서 progesterone의 농도를 활용하여 배란시기와의 상관관계를 추정하였으나 배란 전후에 progesterone 농도의 큰 변이가 관찰되어 정확한 배란시기의 예측을 할 수 없었다. 본 연구에서는 progesterone 농도에서 발정시 임신우와 비임신우 사이에 큰 차이를 나타내지는 않았으나 수정란이식 시와 21일령 및 AI 후 21일령 및 그 이후에서는 임신우에서 비임신우보다 유의적으로 높게 나타나 기존의 보고와 일치하는 것으로 나타났다.

Pape-Zambito 등(2008)은 임신초기 젖소의 혈청에서 estrogen의 농도는 0.5- 2.0 pg/mL을 나타내고 임신 말기가 되면 급격히 증가(40 pg/mL)하는 것으로 보고하였다. 또한 젖소의 발정주기 시 2-3 pg/mL을 나타낸다는 보고(Nakada 등, 2000)도 있어 연구기간에 차이를 보이고 있으나 estrogen의 변화 패턴은 일치하는 경향을 보이고 있다. 본 연구에서는 estrogen경우는 각 시기별 임신우와 비임신우 사이에는 큰 차이를 나타내지 않았으며, 발정시 17-20 pg/mL의 농도를 나타내는 것으로 분석되었고 비임신우의 경우 21일령시 다시 estrogen 농도가 회복되는 경향을 나타내어 estrogen의 발정주기에 다른 경향치에서 앞의 결과와 일치하는 것을 보여주고 있다. progesterone의 농도변화를 임신우의 경우 임신말기로 가면서 progesterone의 농도가 계속 증가하였고 비임신에서는 낮은 상태로 유지되고 있고, estradiol의 경우 임신과 큰 상관관계가 없어 보이지만, 발정 시에 estrogen 수준이 높았던 소들이 임신확율이 높은 것을 알 수 있었다.

2. 우유 중 호르몬 분석

progesterone의 농도가 임신 우유와 비임신 우유에서 큰 차이를 나타내었는데 임신 30일령 및 그 이후의 일령에서는 임신 우유에서 비임신 우유보다 유의적으로 높게 나타났다(Table 2). 또한 임신 우유의 경우 시간이 흐르면서

Table 2. Mean concentrations of progesterone and estrogen in pregnant and non-pregnant Holstein milk during pregnancy.

Hormones	Status	30D	50D	70D	100D	150D	200D
Progesterone (ng/L)	pregnant	1.10±0.11	1.60±0.07	2.18±0.08	2.18±0.07	2.44±0.13	3.82±0.07
	non-pregnant	0.23±0.04	0.31±0.03	0.23±0.02	0.33±0.03		
Estradiol (pg/L)	pregnant	<7	<7	<7	<7	11.3±0.26	15±0.41
	non-pregnant	<7	<7	<7	<7	<7	<7

Table 3. Non-Return and pregnant rates of lactating Holstein cows following consecutive artificial inseminations.

Days	First AI	Second AI	Third AI
Estrus/AI	55	11	5 (13.8%)
NR at day 21	45	7	3
Pregnant at day 35	43 (78.2%)	6 (total 49/55, 89.1%)	2

Table 4. Mean plasma concentrations of progesterone and estrogen in high conception group and low conception group bovine in early pregnant phase.

Days	Low conception		High conception	
	Estradiol (pg/mL)	Progesterone (ng/mL)	Estradiol (pg/mL)	Progesterone (ng/ml)
Estrus/AI	19.02±2.97 ^a	1.38±0.59	26.45±3.32 ^b	1.19±0.51
Day 21	20.15±6.32	0.95±0.23 ^a	19.89±6.31	4.95±1.12 ^b
Day 35	17.36±7.63	2.41±1.21 ^a	19.82±5.74	12.47±3.82 ^b

^{a, b} Within a row, different superscripts imply significant differences (P<0.05).

progesterone의 농도가 증가하였다. 임신우의 경우 우유에서 임신 1개월에 progesterone의 농도는 1 pg/mL에서 임신 200일령에는 3.8 pg/mL까지 상승하는 것으로 나타났다. 비임신 유즙에서는 0.5 ng/mL이하를 나타내고 있는 반면, 임신 30일령부터 1 ng/mL 이상의 절대치에서 나타나고 있어 임신 초기의 임신여부 지표로서 progesterone의 측정이 확실한 임신진단 수단으로 활용될 수 있을 것으로 사료된다. Ranasinghe 등(2010)은 젖소에서 발정주기 중 우유에서의 progesterone을 측정하였는데 황체기에는 10-20 pg/mL을 기록하다가 배란직후에는 거의 측정되는 않는 것으로 보고하였고, 임신을 예측할 수 있는데 수정 후 7일령 이후에 5-10 ng/mL 농도에서 임신가능성을 확인하는데 이용할 수 있을 것으로 예측하였다. Lamming과 Darwash(1998)은 우유에서 progesterone의 농도가 3 ng/mL을 기준으로 분만 후 재발정이나 수태율과 밀접한 관계가 있는 것으로 보고하였다. 이러한 수치는 본 연구에서의 우유 progesterone의 수치와 거의 일치하는 것으로 우유에서 progesterone을 약 1 ng/mL이 수준이 임신여부를 판단하는데 중요한 지표로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

유즙내의 estrogen의 경우는 각 시기별 임신우와 비임신우 사이에는 큰 차이를 나타내지 않았으며, 절대농도에서도 낮은 수치(10 pg/mL 이하)를 나타내었다. 그러나 임신우의 경우 임신 150일령부터 약 10 pg/mL으로 탐지되기 시작하여 임신 200일령에는 15 pg/mL로 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 임신 중 우유에서의 estrogen의 변화는 Pape-

Zambito 등(2007)이 임신 초기에는 우유에서 estrogen의 농도가 낮게 유지되다가 임신 후반기에 증가한다는 보고와 일치하는 것이다. Pape-Zambito 등(2008)은 임신 초기, 중기 및 말기에 우유 내 estrogen의 농도가 각각 0.3, 0.9, 5.0 pg/mL로 측정되었고, 혈액 내 estrogen의 수치와 큰 차이는 나타내지 않은 것으로 보고 하였다. 그러나 Lopez 등(2002)은 우유와 혈액 내 estrogen의 농도가 유의적으로 차이가 난다고 보고하여 본 연구에서의 임신 21일령 혈액에서 약 20 ng/mL과 비슷한 시기에 우유 내에서는 아주 미약하게 분석된 결과와 일치하는 것으로 나타났다.

3. 수태율과 임신특이 호르몬의 상관관계 분석

특히 수태율과 호르몬 분비 상태와의 상관관계를 분석하기 위해 첫 인공수정 후 21일 전후에 재발정 여부를 관찰하고, 재발정이 온 소는 2차 인공수정을 실시하였다. 총 55두의 착유우를 2년 정도를 추적하여 조사한 결과 1차 인공수정 후 수태율이 78.2%(43두/55두)로 나타났으며, 2차후에는 9.1% 증가한 87.3%(48두/55두)로 나타났다. 약 9.1%인 5두는 3차까지 인공수정을 실시해야 하는 저 수태우로 분류하였다(Table 3).

고수태우와 저수태우의 호르몬을 분석한 결과 발정 시 progesterone의 농도는 유의적인 차이가 없었으나 21일령 이후 임신 혈청에서 큰 차이로 증가하는 것으로 나타났다(임신 21일: 4.95±1.12 vs 0.95±0.23, 임신 35일: 12.47±

3.8 vs 2.41±1.21)(Table 4). 또한 수태율이 높은 소의 경우 발정 시 progesterone 농도가 저수태우에 비해 낮은 경향치를 나타내었다. estrogen의 농도는 고수태우에서 발정 시 저수태우에 비해 유의적으로 높게 나타났으며(26.45±3.32 vs 19.017±2.97), 이후에는 전반적으로 estrogen 수준이 낮았다. 이러한 estrogen의 경향치는 수정란이식에 사용된 수란우에서도 같은 경향을 나타내었다. 저수태우에서 발정 시 progesterone의 수준이 높은 것은 아마도 황체가 완전히 퇴행되지 못하였고, 이로 인해 공태기간이 길어진다고 보고한 Stevenson과 Call(1983), Lamming과 Darwash(1998) 및 Stronge 등(2005)의 연구결과와 일치하는 것으로 나타났다. 또한 발정시 estrogen의 높은 수준으로 분비되는 것은 배란율을 높여주어 수태율을 증진시킨다는 보고(Lopez 등, 2002)와도 부합하는 것으로 수정란이식용 수란우의 선발 시 estrogen의 농도가 높은 것을 이용하면 수태율을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

IV. 결론

본 연구에서는 젖소의 임신 초기 혈액과 우유에서 progesterone과 estrogen의 농도를 분석하고 수태율과의 상관관계를 분석하였는데, 수정 후 임신초기에 수태가능성을 나타내는 수치로는 우유의 progesterone 농도가 활용될 수 있고 특히 수정란이식 시(발정 후 7일령)의 progesterone 농도는 그 이후의 임신 유지와 높은 상관관계가 나타나고 있어, 이를 활용하면 수태율을 높일 수 있을 것으로 사료된다. 또한 수정란이식용 수란우의 발정 시 estrogen 농도가 높은 수란우를 선정하면 수태율을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

이 논문은 2010년도 교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단(No. 2010-0001356)과 농업진흥청 바이오그린 21(No. 20070401034031) 및 공동연구사업(No. PJ007793)이 지원으로 연구되었음.

참고문헌

- Borsberry, S., H. Dobson. 1989. Periparturient diseases and their effect on reproductive performance in five dairy herds. *Vet. Rec.* 124: 217-218.
- Dohmen, M.J.W., J.A.C.M. Lohuis, G. Huszenicza. 1995. The relationship between bacteriological and clinical finding in cows with subacute/chronic endometritis. *Theriogenology* 43: 379-1388.
- Foote, R.H., P.C. Ladd, N.A. Lafaunce, A.D. McCauley, J.F. Hasle. 1982. Milk progesterone concentration and production in superovulated Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 65: 2164-2169.
- Gartland, P., J. Schiavo, C.E. Hall, R.H. Foote, N.R. Scott. 1976. Detection of estrus in dairy cows by electrical measurements of vaginal mucus and by milk progesterone. *J. Dairy Sci.* 59: 982-985.
- Kim, J.K., C.C. Choung, D.J. Chang. 1990. Studies on the progesterone level for early pregnancy diagnosis of Cheju native mares. *Journal of Livestock Animals* 5: 3-9.
- Kim, J.B., B.S. Kim, B.G. Mun, C.J. Yun, C.H. Park, J.S. Moon, G.H. Suh, K.S. Oh, C.H. Son. 2008. Estimating the ovulation time based on plasma estradiol-17β and progesterone concentrations in miniature schnauzer dogs. *The Korean Society of Veterinary Clinics* 25: 77-84.
- Laing, J.A., H.A. Gibbs, S.A.K. Eastman. 1980. A herd test for pregnancy in cattle based on progesterone levels in milk. *Br. Vet. J.* 136: 413-415.
- Lamming, G.E., A.O. Darwash. 1998. The use of milk progesterone profiles to characterize components of subfertility in milked dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 52: 175-190.
- Lee, B.C., K.N. Lee, E.S. Lee, C.H. Son, I.S. Yul, S.Y. Choe, G.J. Rho, S.J. Oh, K.K. Jung, S.C. Kim, K.S. Kim, S.C. Joo, J.M. Lim, G. Jang, W.S. Hwang. 2000. Studies on development of breeding technique to increase Hanwoo (*Bos taurus coreanae*) I: Survey of reproductive status and effect of intraovarian PGF2α administration on luteolysis and subsequent estrus induction. *Journal of Embryo Transfer* 15: 77-83.
- Lee, J.W. 1999. Studies on the improvement of reproductive efficiency of dairy cattle on assay of progesterone in blood and milk. *Journal of Industrial Development* 7: 103-114.
- Lopez H., T.D. Bunch, M.P. Shipka. 2002. Estrogen concentrations in milk at estrus and ovulation in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 72: 37-46.
- Nakada K., M. Moryyoshi, T. Nakao, G. Watanabe, K. Taya. 2000. Changes in concentrations of plasm immunoreactive follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, estradiol-17β, testosterone, progesterone, and inhibin in heifer from birth to puberty. *Dom. Anim. Endocrinol.* 18: 57-69.
- Oltenucu, P.A., J.D. Ferguson, A.J. Lednor. 1990. Economic evaluation of pregnancy diagnosis in dairy cattle: a decision analysis approach. *J. Dairy Sci.* 73: 2826-2831.
- Pape-Zambito D.A., A.L. Magliaro, R.S. Kensinger. 2007. Concentrations of 17β-Estradiol in Holstein Whole Milk. *J. Dairy Sci.* 90: 3308-3313.
- Pape-Zambito D.A., A.L. Magliaro, R.S. Kensinger. 2008.

- 17 β -estradiol and estrone concentrations in plasma and milk during bovine pregnancy. *J. Dairy Sci.* 91: 127-135.
16. Parsley J.R., M.C. Wiltbank, J.S. Stevenson, J.S. Ottobre, H.A. Garverick, L.L. Anderson. 1997. Pregnancy rates per artificial insemination for coes and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchersonized estrus. *J. Dairy Sci.* 80: 295-300.
 17. Ranasinghe R.M.S.B.K., T. Nakao, K. Yamada. K. Koike. 2010. Silent ovulation, based on walking activity and milk progesterone concentrations, in Holstein cows housed in a free-stall barn. *Theriogenology* 73: 942-949.
 18. Roelofs J.B., F.J.C.M. Van Eerdenburg, W. Hazeleger, N.M. Soede, B. Kemp. 2006. Relationship between progesterone concentrations in milk and blood and time of ovulation in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 91: 337-343.
 18. Shemesh M., N. Ayalon, S. Lavi. 1983. A new approach to the use of Progesterone levels for pregnancy determination. *Br. Vet. J.* 139: 14-48.
 20. Son, C.H., B.K. Kang, H.S. Choi, C.G. Lee, G.H. Suh. 1990. Studies on the improvement of reproductive efficiency in Korean native cows. Plasma progesterone concentrations during the estrous cycle and early pregnancy. *Journal of Veterinary Science* 30: 246-247.
 21. Son, C. H., B.K. Kang, H.S. Choi, H.G. Kang, K.S. Oh, D.H. Seo, G.H. Suh. 1998. Development of differential diagnosis and treatment method of reproductive disorders using ultrasonography in cows II: Differential diagnosis of subestrous dairy cows. *Journal of Veterinary Clinics* 15: 307-318.
 22. Stevenson J.S., E.P. Call. 1983. Influence of early estrus, ovulation, and insemination on fertility in postpartum Holstein cows. *Theriogenology* 19: 367-375.
 23. Stevens R.D., R.P. Dinsmore, L. Ball. 1995. Postpartum pathologic changes associated with a palpable uterine lumen in dairy cattle. *Bovine Pract.* 29: 93.
 24. Stronge A.J.H., J.M. Sreenan, M.G. Diskin, J.F. Mee, D.A. Kenny, D.G. Morris. 2005. Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. *Theriogenology* 64: 1212-1224.