

젖소 공란우 과배란 처리 후 난소주기 재개에 관한 연구

손준규¹ · 백광수¹ · 윤호백¹ · 임현주¹ · 권응기¹ · 조상래² · 정연섭¹ · 김선규¹ · 최창용^{1,†}

¹농촌진흥청 국립축산과학원 낙농과, ²농촌진흥청 국립축산과학원 난지축산시험장

Resumption of Ovarian Cyclicity after Superovulation Treatment to Donor Cow in Holstein Donor Cows

Jun-Kyu Son¹, Kwang-Soo Baek¹, Ho-Beak Yoon¹, Hyun-Joo Lim¹, Eung-Gi Kwon¹, Sang-Rae Cho², Yeon-Sub Jung¹, Sun-Kyu Kim¹ and Changyong Choe^{1,†}

¹Dairy Science Division, National Institute of Animal Science, RDA, CheonAn 331-801, Korea

²Subtropical Animal Experiment Station, National Institute of Animal Science, RDA, JeJu 690-150, Korea

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the effects of abnormal ovarian cycles after superovulation treatment of Holstein Donor Cows. CIDRs were inserted into the vaginas of twenty two head of Holstein cows, regardless of estrous cycle. Superovulation was induced using follicular stimulating hormone (FSH). For artificial insemination, donor cows were injected with PGF₂ α and estrus was checked about 48 hours after the injection. Then they were treated with 4 straws of semen 3 times, with 12-hour intervals. Embryos were collected by a non-surgical method 7 days after the first artificial insemination. The cows were considered to have resumed ovarian cyclicity on the day of ovulation if followed by regular ovarian cycles. Seventy two point seven percentage of the cows(16/22) had normal resumption of ovarian cyclicity(resumption within 40 days after superovulation), and 27.3%(6/22) had delayed resumption(resumption did not occur until >40 days after superovulation). Delayed resumption Type II(first ovulation did not occur until \geq 40 days after superovulation, i.e. delayed first ovulation 13.6%) were the most common types of delayed resumptions. The mean numbers of total ova from < 10 and $10 \leq$ of corpora lutea(CL) was 7.8 ± 1.8 and 12.7 ± 2.7 , respectively. The number of transferable embryos differed between < 10 and $10 \leq$ CL was 5.4 ± 1.3 and 8.1 ± 3.4 , respectively. Four point five percentage of the cows(1/22) did not resumption their ovarian cyclicity until 60 days after superovulation treatment. Diverse researches on the superovulation treatment method that is suitable for high-producing Holstein donor cows would contribute to preventing ovarian cyclicity disorder, as well as to the early multiplication of cows with superior genes by increasing the utilization value of donor cows.

(Key words : Holstein donors, *In vivo* embryo, Ovarian cyclicity, Superovulation)

서론

젖소의 고능력화 및 생리적, 환경적인 요인의 변화와 더불어 미약발정, 둔성발정의 현상이 많이 일어나고 있으며, 국내·외 젖소의 번식효율 및 수태율은 매년 저하되고 있는 실정이다(Roche 등, 2000; Lucy, 2001). 체내수정란 생산과 더불어 수정란 이식 기술은 가축의 능력 개량과 번식 효율의 증대는 농가의 경쟁력 강화와 생산성을

향상시킬 수 있으며, 사육 기반 조성 등 기술 체계의 확립을 위해 해결해야 할 중요한 과제이다. 최근 이용되고 있는 소의 수정란 이식 기술은 우리나라 축산 여건상 우수 종축의 기반 구축과 증식의 소요 기간을 단기화 할 수 있는 동시에 우수한 종축의 유전 능력을 신속히 확대 보급할 수 있기 때문에 이러한 목표에 접근하는데 매우 적절한 방법으로 인식되고 있다. 수정란 이식은 우수 유전형질을 보유하고 있는 암가축으로부터 다수의 수정란을 회수하여 다른 개체에 이식 후 자축을 생산함으로써 우

* 본 연구는 농촌진흥청 축산시험연구사업(PJ00859320)에 의해 수행되었음.

† Corresponding author : Phone: +82-41-580-3409, E-mail: cychi@korea.kr

수한 유전 형질을 가진 개체를 효과적으로 증식시킬 수 있고, 형질이 동일한 다수의 자축을 단시간 내에 생산이 가능하므로 가축의 능력 개량에 매우 유용하게 이용할 수 있다(Christensen, 1991; Smith, 1984). 소의 수정란 이식에 있어 우수한 소의 생산을 통한 가축의 개량에 활용하고자 과배란 및 수정란이식(multiple ovulation and embryo transfer: MOTE) 기법이 이용되고 있다(Son 등, 2000; Smith, 1988; Seidel, 1981). 1980년대 초 국내에 수정란 이식 기술이 도입된 이래 수정란 이식기술의 효율이 크게 향상되었으나, 산업적으로 이용함에 있어서는 아직 해결해야 할 문제점이 많이 남아 있다. 과배란 및 수정란 이식 기법의 성공적인 수행을 위해서는 우수한 공란우를 선정하여 과배란 처리에 의해 양질의 수정란을 많이 회수하는 것이 무엇보다 중요하다.

과배란처리에 영향을 미치는 요인은 공란우 개체에 따른 난소 반응의 차이(Shea 등, 1984), 성선자극 호르몬의 종류(Staigmiller 등, 1992; Goulding 등, 1991; Elsdon 등, 1978), 호르몬 투여량(Pawlyshyn 등, 1986; Donaldson, 1984), 과배란 처리 방법(Im 등, 1998; Yamamoto 등, 1994; Takedomi 등, 1992), 공란우의 연령(Hasler 등, 1981; Donaldson, 1984), 번식경력(Isogai 등, 1993), 반복 과배란처리(Almeida, 1987; Warfeld 등, 1986; Donaldson과 Perry, 1983), 계절(Bastidas와 Randel, 1987; Shea 등, 1984) 등이 관계된다고 하였다. 국내에서도 소에서 과배란처리에 대한 보고(Son 등, 2006; Im 등, 1998; Kim 등, 1997; Son 등, 1997)가 되고 있다.

기존의 과배란 처리 방법에서는 발정주기의 황체기(발정 후 8~13일)에 성선 자극 호르몬의 투여가 필수적이었으며, 공란우의 발정 관찰이 요구되었다. 그러나 최근에는 발정주기에 구애받지 않고 임의의 시기에 progesterone (P4) 방출 기구를 자궁내 삽입하고, 성선 자극 호르몬으로 과배란 처리를 하는 방법으로도 기존의 과배란 처리 방법과 유사한 수정란 생산 성적을 나타내고 있다(Andrade 등, 2003). 이러한 새로운 과배란 처리 방법이 우수 수정란 생산 사업에 활용시에는 짧은 기간내 능력이 우수한 공란우의 활용을 극대화 시킴으로써 수정란의 생산 비용을 낮출 수 있을 것이다(Son 등, 2005).

우수 공란우로부터 다량의 수정란을 생산하기 위하여 다배란 처리의 반복 수행이 불가피하므로 효과적인 반복 처리 또한 중요한 요인이 되고 있다. 호르몬 반복처리에서 난소반응이 저하됨이 보고되고 있으며(Lee 등, 1987), Almeida(1987)는 과배란 처리의 반복으로 혈청 내 성선 자극 호르몬에 대한 항체가 생성되기 때문에 과배란 처리의 반복에 따라 난소 반응이 감소하는 경향이 있다고 보고하였다. 그러나 Donaldson과 Perry(1983)는 과배란 처리를 10회까지 반복하여도 이식 가능 수정란 수에 차이가 없다고 보고하였으며, 과배란의 반복처리에서 차이가 없다는 보고도 있다(Yang 등, 1988; Moor 등, 1984). 이식 가능 수정란을 안정적으로 다수 생산하는 것은 수정란 이식 기술의 실용화를 위한 가장 기초적이며, 매우 중요한 과제라 할 수 있다. 따라서 본 연구는 국립축산과학원 낙농과에서 실시한 성적 자료를 분석하여 고능력 젖소의 효율적인 수정란 생산체계를 정립하고자 과배란 처리 후 난소 주기 재개를 분석하였다.

재료 및 방법

공시우

본 연구의 자료는 국립축산과학원 낙농과에서 보유하고 있는 형질이 우수한 고능력 암소로 선발된 젖소 미경산우 22두를 공시하였다.

공란우 과배란처리 및 인공수정

시험군은 공란우의 발정주기와 관계없이 progesterone releasing intravaginal device (CIDR-plus, InterAg, New Zealand)를 질내 삽입하고, 4일째부터 FSH(Antorin, 2 AU=1 ml, Kawasaki Mitaka, Japan)를 4일에 걸쳐 28AU 근육주사하였으며, CIDR 삽입 후 7일째 PGF₂ α (LutalyseTM, Phamacia Co., Belgium)를 오전 25 mg, 오후 15 mg을 12시간 간격으로 근육 주사하였으며, CIDR를 제거하였다. 인공수정은 PGF₂ α 주사 후 48시간 전후 발정을 확인하고, 12시간 간격으로 정액 4개의 스트로우를 3회에 걸쳐 실시하였으며, 1차 인공수정 후 100 µg Gonadotropin (GnRH, Fertagyl[®], Intervet, Holland)를 근육주사하였다.

수정란 회수, 평가 및 초음파 검사

인공 수정 후 7일째에 수정란을 회수하였으며, 회수를 위한 관류액은 Embryo Collection Medium(Agtech, BiolifeTM, USA)를 이용하여 비외과적인 방법으로 회수하였다. 회수된 수정란은 Manual of the International Embryo Transfer Society(Stringfellow와 Seidel, 1998)의 기준에 따라 code 1(excellent or good)과 code 2(fair)로 평가된 수정란은 이식가능 수정란, code 3(poor)과 code 4(dead or degenerating)로 평가된 수정란은 이식 불가능 수정란으로 구분하였으며, 과배란 처리한 공란우의 황체수를 파악하기 위한 난소 초음파(Sonoace 600 with a 5.0 MHz linear array transducer; Medison Co., Led., Seoul, Korea) 검사를 실시하였다.

채혈 및 호르몬 분석

호르몬 분석을 위해 젖소 공란우 22두를 공시하여 CIDR 삽입하는 날부터 일주일 1회, 수정 후 100일까지 채혈하여 호르몬을 분석하였다. 채혈 방법은 오전 10~11시 사이 heparin 처리된 15 ml vacutainer를 사용하여 정맥에서 약 10 ml를 채혈하여 곧바로 실험실로 운반하였고, 3시간 이내에 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 후 혈청을 분리하여 분석시까지 냉동보존(-20°C)하였다. 혈중 P4 농도는 의료용면역흡광측정장치(Immulite 1000, DPC CIRRUSS, Inc, USA)를 이용하여 측정하였다.

다양한 난소주기형의 정의 및 번식지표별 계산법

적어도 2번의 연속적으로 채혈된 혈액에서 P4 수준이 ≥ 1 ng/ml일 경우에 황체활성을 가지고 있다고 간주하였다. 배란은 P4 수준이 ≥ 1 ng/ml로 증가되기 5일전에 일어난 것으로 분류하였다(Shrestha 등, 2004). 난소주기의 재개는 약 2주의 황체기와 약 1주의 난포기를 보여

주는 정상적인 주기가 따르면 배란으로 정의하였다. P4 수준변화 특성에 따라 분류하였다(표 1).

통계분석

젖소 공란우 과배란 처리 후 난소주기 재개와 관련한 유의성 분석은 SAS program의 Chi-square를 이용하였고, $p < 0.05$ 이하의 경우 유의한 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

젖소 공란우 22두 중 황체수가 10 이하와 10 이상인 공란우의 과배란 처리하여 수정란을 회수한 결과는 표 2와 같다. 황체수가 10 이하일 때와 10 이상일 때 회수된 총 난자수는 각각 7.8 ± 1.8 개와 12.7 ± 2.7 개였으며, 이식가능 수정란 수는 황체수가 10 이하인 경우 5.4 ± 1.3 개, 10 이상인 경우는 8.1 ± 3.4 개로 나타났다. Son 등(2010)의 보고에서는 한우에서 황체수가 10 이하와 10 이상인 공란우의 총 회수된 난자수는 각각 7.3개와 13.9개로 본 연구와 유사한 경향을 보였으나, 이식가능 수정란수는 황체수가 10 이하인 경우 4.2개, 10 이상인 경우 5.1개로 본 연구에서의 이식가능 수정란수의 비율이 높게 나타났다. 또한 Greve 등(1983)은 다배란 처리시 황체수가 9개, 총 회수란수가 7개, 이식가능 수정란수가 4개 정도라고 보고하였다. 본 연구에서는 Greve 등(1983)과의 결과에 비해 유의적인 차이는 인정되지 않았으나, 평균 총 회수란 수와 이식 가능한 수정란 수에서 모두 높게 나타났다.

그림 1에 과배란 처리 후 난소주기 재개의 몇 가지 형을 P4 수준 변화로 나타내었다. 총 22두의 공란우 중 16두(72.7%)만이 정상적인 난소주기 재개를 보였으며, 6두의 공란우(27.3%)들은 난소주기 재개의 지연을 보여주었다(그림 2). 후자의 공란우에서 2두(9.1%)는 황체기의 연장을 보여주는 난소주기 재개 지연 I형, 3두(13.6%)는 과배란 처리 후 배란이 지연되는 난소주기 재개 지연 II형, 1두(4.5%)는 난소주기가 없어지는 난소주기의 재개 지연 III형이었다. 약 27%의 공란우가 과배란 처리 후 난소주기의 재개가 지연됨을 보여주었다. 공란우 과배란 처리 후 그 지연의 정도에 대한 보고는 되어 있지 않지만, 젖소가 분만 후 지연의 사례를 보고한 초기연구 결과(Opsomer 등, 1998; Lamming과 Darwash, 1998)와 최근의 Shrestha 등(2004a)의 연구 결과보다는 적게 나타났다. 하지만 젖소의 분만 후 황체기가 연장되는 난소주기의 재개 지연 I형(Delayed resumption Type I)의 발생이 심화되는 반면, 공란우 과배란 처리 후에는 황체기가 연장되는 난소주기의 재개 지연 I형(Delayed resumption Type I)의 발생은 적었다. 과배란 처리 후 첫 배란이 지연되는 난소주기의 재개 지연 II형(Delayed resumption Type II)에서도 분만 후 난소주기의 재개 지연보다는 발생 빈도가 낮았다. 본 연구와 다른 연구(Opsomer 등, 1998; Shrestha 등, 2004a)에서는 난소주기가 정지하는 난소주기의 재개 지연 III형(Delayed resumption Type III)의 발생율이 5% 이하에 불과하지만, Son 등(2010), Lamming과 Darwash(1998)은 10% 이상으

로 빈도가 높다고 보고보다 낮은 경향을 나타냈다. 난소주기 재개의 이상율이 높은 Shrestha 등(2004a)의 연구는 고능력우만을 대상으로 연구한 결과이다. Shrestha 등(2004b)은 황체기의 연장을 보여주는 난소주기의 재개 지연 I형의 개체는 자궁오염과 자궁회복 지연과 같은 비정상적인 자궁환경과 관련이 있음을 지적하였고, 자궁의 오염을 가진 개체들은 더 낮은 수태율을 보여준다(Opsomer 등, 1998; Opsomer 등, 2000). 그러므로 자궁오염에 의해 황체기가 연장되어지는 이상이 발생하고, 그로 인해 수태율이 저하되었다고 사료된다.

총 22두의 공란우 중 2두(9.1%)는 분만 후 20일 이내에

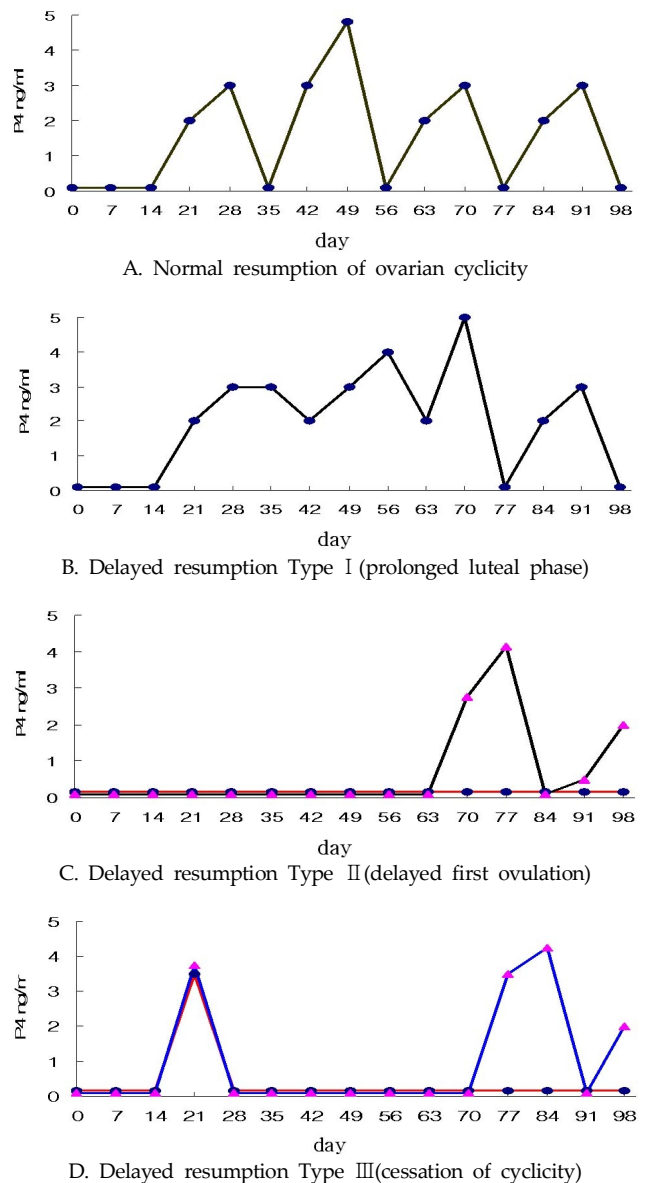


Fig. 1. Different types of resumption of ovarian cyclicity after superovulation treatment in Holstein donors with representative progesterone profiles in Holstein.

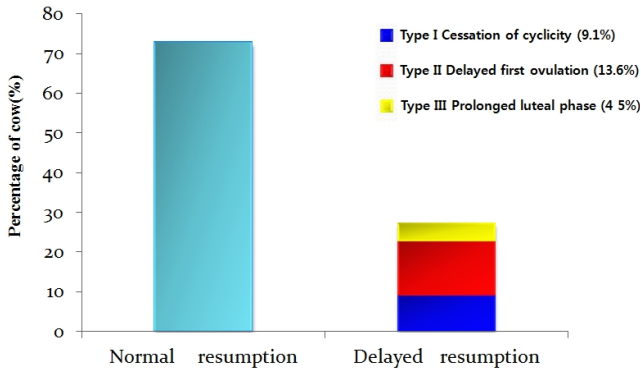


Fig. 2. Normal and delayed(with different type) resumption of ovarian cyclicity after superovulation treatment in Holstein donors.

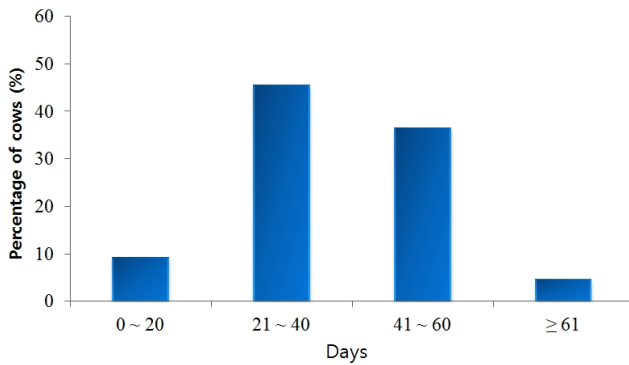


Fig. 3. Percentage of cows that resumed ovarian cyclicity after superovulation treatment in Holstein donors.

난소주기가 재개되었고, 1두(4.5%)는 분만 후 60일까지도 난소주기가 재개되지 않았으며, 단지 45.5%와 36.4%의 공란우가 과배란처리 후 21과 40일 사이 및 41일에서 60일 사이에 난소주기가 각각 재개되었다(그림 3). 국내에서 사육되는 젖소군에서도 분만 후 비정상적인 난소주기를 가진 개체의 발생빈도가 높고, 특히 황체가 연장과 무배란이 난소주기 이상의 대표적 형태이다. 아직 많은 연구가 이루어지지 않았지만, 공란우의 과배란 처리 후 비정상적인 난소주기를 가진 개체의 발생 빈도도 높아질

Table 2. Effect of number of corpora lutea (CL) number on *in vivo* holstein embryo productivity

No. CL	Cows (n)	Embryo yield	
		No. total ova	No. transferable embryos
< 10	7	7.8±1.8	5.4±1.3
≥ 10	15	12.7±2.7	8.1±3.4

Within a column, no significant differences were observed($p>0.05$).

수 있었으며, 기전과 요인에 대해서 명확하지 않지만 이러한 난소주기의 이상에 의해 난자 회수율 및 이식가능 수정란 수의 저하가 초래할 것으로 생각된다. 과배란처리 방법의 다각적인 연구와 적절한 영양관리에 의해 공란우의 적절한 영양 상태를 유지한다면 난자 회수율, 이식가능 수정란 수의 향상 및 체내수정란 생산 후 난소주기 이상 등의 발생을 예방하여 공란우의 활용 가치를 높일 수 있을 뿐 아니라, 고능력 공란우의 우수한 개체 수정란을 효과적으로 생산하여 유전능력이 우수한 개체의 조기 증식 및 수정란 이식 기술의 향상 등 고능력 젖소 개량에 널리 활용될 것으로 생각된다.

결론

본 연구는 젖소 공란우의 과배란 처리 후 난소주기 재개 이상이 미치는 영향을 규명하기 위해 수행하였다. 젖소 22두에 대하여 발정주기에 관계없이 CIDR를 질내에 삽입 후 4일째부터 성선자극호르몬(안토린) 28AU를 4일간 12시간 간격으로 근육주사하였다. 투여 3일째 CIDR를 제거하였으며, 동시에 PGF₂α 25 mg을 근육 주사하여 과배란을 유도하였다. 공란우의 인공수정은 PGF₂α 주사 후 48시간 전후 발정을 확인하고, 12시간 간격으로 정액 4개의 스트로우를 3회에 걸쳐 실시하였으며, 1회 인공수정 전 GnRH 100 μg을 근육 주사하였다. 수정란 회수는 1차 인공수정 후 7~8일째에 비외과적 방법으로 채란하였다. 정상적인 난소주기가 진행이 되면 배란된 날에 난소

Table 1. Defining of different types of resumption of ovarian cycles after superovulation treatment in Holstein donors using P4 levels

Type of resumption of ovarian cyclicity	Definition
Normal resumption of ovarian cyclicity	Ovulation occurred ≤ 40 days after superovulation, followed by regular ovarian cycles
Delayed resumption of ovarian cyclicity	Ovulation followed by regular ovarian cycles did not occur until > 40 days after superovulation treatment
Delayed resumption Type I	One or more ovarian cycles with luteal activity > 20 days(prolonged luteal phase)
Delayed resumption Type II	First ovulation did not occur until > 40 days after superovulation treatment(delayed first ovulation)
Delayed resumption Type III	Absence of luteal activity for at least 14 days between the first and second luteal phase(cessation of cyclicity)

주기가 재개된 것으로 간주하였다. 공시우의 72.7%(16/22)가 정상적인 난소주기의 재개를 하였고, 27.3%(6/22)의 소에서 난소주기의 재개가 지연되었다. 과배란 처리 후 40일 이전에 첫 배란이 나타나지 않는 난소주기의 재개 지연 II형(3, 13.6%)이 난소주기 재개 지연의 일반적인 형태였다. 공란우 22두 중 황체수가 10 이하와 10이상인 공란우의 과배란 처리하여 수정란을 회수한 결과, 10 이하와 10이상인 공란우의 총 회수된 난자수는 각각 7.8 ± 1.8 개와 12.7 ± 2.7 개였으며, 이식가능 수정란수는 황체수가 10 이하인 경우 5.4 ± 1.3 개, 10 이상인 경우 8.1 ± 3.4 개로 나타났다. 공시우의 4.5%(1/22)는 과배란 처리 후 60일이 경과되어도 난소주기가 재개되지 않았다.

인용문헌

- Almeida AP (1987): Superovulatory response in dairy cows repeatedly treated with PMSG. *Theriogenology* 27:205.
- Andrade JC, Oliveira MA, Lima PF, Guido SI, Bartolomeu CC, Tenorio Filho F, Pina VM, Iunes-Souza TC, Paula NR, Freitas JC (2003): The use of steroid hormones in superovulation of Nelore donors at different stages of estrous cycle. *Anim Reprod Sci* 77:117-125.
- Bastidas P, Randel RD (1987): Seasonal effects on embryo transfer results in Brahman cows. *Theriogenology* 28:531-540.
- Christensen LG (1991): Use of embryo transfer in future cattle breeding schemes. *Theriogenology* 35: 141-149.
- Donaldson LE, Perry B (1983): Embryo production by repeated superovulation of commercial donor cows. *Theriogenology* 20:163-168.
- Donaldson LE (1984): Effect of age of donor cows on embryo production. *Theriogenology* 21:963-967.
- Elsden RP, Nelson LD, Seidel GE (1978): Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. *Theriogenology* 9:17-26.
- Goulding D, Williams DH, Roche JF, Boland MP (1991): Superovulation in heifers using pregnant mare's serum gonadotropin or follicle stimulating hormone during the mid luteal stage of the estrus cycle. *Theriogenology* 36:949-958.
- Greve T, Callesen H, Hyttel P (1983): Endocrine profiles and egg quality in the superovulated cow. *Nord Vet Med* 35:408-421.
- Hasler JF, Brooke GP, McCauley AD (1981): The relationship between age and response to superovulation in Holstein cows and heifers. *Theriogenology* 15:109.
- Im SK, Woo JS, Jean GJ, Chang SS, Kang SW, Yun SK, Son DS (1998): Superovulation in Korea cattle with a single subcutaneous injection of follitropin-V dissolved in polyethylene glycol. *Korean J Emb Trans* 13:207-212.
- Isogai T, Shimohira I, Kimura K (1993): Factors affecting embryo production following repeated superovulation treatment in Holstein donors. *J Reprod Dev* 39:79-84.
- Kim HR, Kim DI, Won YS, Kim CK, Chung YC, Lee KS, Suh KW (1997): Studies on *in vivo* embryo production by FSH-P and SUPER-OV in Korean native cattle I. The factors influencing *in vivo* embryo production by condition of superovulation treatment. *Korean J Emb Trans* 12:37-48.
- Lamming GE, Darwash AO (1998): The use of milk progesterone profiles to characterize components of subfertility in milked dairy cows. *Anim Reprod Sci* 52:175-190.
- Lee JH, Suh TK, Park HK (1987): Factors affecting superovulatory responses in dairy donor cows. *Korean J Emb Trans* 2(1):27-32.
- Lucy MC (2001): Reproductive loss in high producing dairy cattle: Where will it end? *J Dairy Sci* 84:1277-1293.
- Moor RM, Kruip Th AM, Green D (1984): Intra-ovarian control of folliculogenesis : Limits to superovulation. *Theriogenology* 21:103-116.
- Opsomer G, Coryn M, Kruif A (1998): An analysis of ovarian dysfunction in high yielding dairy cows after calving based on progesterone profiles. *Reprod Dom Anim* 33:193-204.
- Opsomer G, Grohn YT, Hertl J, Coryn M, Deluyker H, Kruif A (2000): Risk factors for postpartum ovarian dysfunctions in high producing dairy cows in Belgium: a field study. *Theriogenology* 53: 841-857.
- Pawlyshyn V, Lindsell CE, Braithwaite M, Mapletoft RJ (1986): Superovulation of beef cows with FSH-P : A dose-response trial. *Theriogenology* 25: 179.
- Roche JF, Mackey D, Diskin MD (2000): Reproductive management of postpartum cows. *Anim Reprod Sci* 60:703-712.
- Seidel GE (1981): Superovulation and embryo transfer in cattle. *Science* 211:351-358.
- Shea BF, Janzen RE, McDermand DP (1984): Seasonal variation in response to stimulation and related embryo transfer procedures in Alberta over a nine year period. *Theriogenology* 21:186-195.
- Shrestha HK, Nakao T, Higaki T, Suzuki T, Akita M (2004a): Resumption of postpartum ovarian cyclicity in high-producing Holstein cows. *Theriogenology* 61:637-649.
- Shrestha HK, Nakao T, Suzuki T, Higaki T, Akita

- M (2004b): Effects of abnormal ovarian cycles during pre-service period postpartum on subsequent reproductive performance of high-producing Holstein cows. *Theriogenology* 61: 1559-1571.
26. Smith C (1984): Application of embryo transfer in animal breeding. *Theriogenology* 29:203-212.
 27. Son DS, Kim IH, Lee HJ, Suh KH, Lee DW, Ryu IS, Lee KW, Chun KJ, Son SK, Choe SY (1997): Studies on embryo cryopreservation and native cattle I. Transfer of frozen-thawed embryos and production of calves. *Korean J Emb Trans* 12:75-90.
 28. Son DS, Kim IH, Ryu IS, Yeon SH, Suh GH, Lee DW, Choi SH, Park SB, Lee CS, Choi YL, Ahn BS, Kim JS (2000): Embryo production and transfer dairy MOET scheme application. *Korean J Emb Trans* 15:57-65.
 29. Son DS, Han MH, Choe CY, Choi SH, Cho SR, Kim HJ, Ryu IS, Choi SB, Lee SS, Kim YK, Kim SK, Kim SH, Shin KH, Kim IH (2006): Embryo production in superior Hanwoo donor and embryo transfer. *Korean J Emb Trans* 21:147-156.
 30. Son JK, Choe CY, Cho SR, Yeon SH, Choi SH, Kim NT, Jung JW, Kim SJ, Jung YS, Bok NH, You YH, Son DS (2010): Resumption of ovarian cyclicity after superovulation treatment to donor cow in Hanwoo. *Korean J Emb Trans* 25(3):149-154.
 31. Staigmiller RB, Bellows RA, Anderson GB, Seidel GE, Foot WD, Menino AR, Wright RW (1992): Superovulation of cattle with equine pituitary extract and porcine FSH. *Theriogenology* 37:1091-1099.
 32. Stringfellow DA, Seidel SM (1998): Manual of the International Embryo Transfer Society. 3rd ed International Embryo Transfer Society Inc Illinois pp. 165-170.
 33. Takedomi T, Aogagi Y, Konish M, Kishi H, Taya K, Watanabe G, Sasamoto S (1992): Superovulation in Holstein heifers by a single injection of porcine FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology* 39:327.
 34. Warfield SJ, Seidel GE, Eldsen RP (1986): A comparison of two FSH regimens for superovulating cows and heifers. *Theriogenology* 25:213.
 35. Yamamoto M, Ooe M, Kawaguchi M, Suzuki T (1994): Superovulation in the cow with a single intramuscular injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology* 41:747-755.
 36. Yang BS, Oh SJ, Yoo SH, Kim HS, Chung YH, Lee KS (1988): Studies on repeated superovulation and frozen-thawed embryo transfer in Korean native cattle. *Korean J Emb Trans* 3:38-42.

(Received: 8 March 2013/ Accepted: 14 March 2013)