

젖소 미경산우의 발정동기화 처리 시 번식호르몬 변화

최창용¹ · 허태영¹ · 정영훈¹ · 조용일¹ · 백광수¹ · 정연섭¹ · 한태석¹ · 이경석¹ · 권응기¹ · 강다원² · 손준규^{1,*}

¹농촌진흥청 국립축산과학원, ²경상대학교 의학전문대학원 생리학교실 · 건강과학연구원

Changes in Concentrations of Reproductive Hormones during Estrus Synchronization in Dairy Heifers

Changyong Choe¹, Tai-Young Hur¹, Young-Hoon Jung¹, Yong-Il Jo¹, Kwang-Soo Baek¹, Yeon-Sub Jung¹, Tai-Seok Han¹, Kyung-Seok Lee¹, Eung-Gi Kwon¹, Dawon Kang² and Jun-Kyu Son^{1,*}

¹National Institute of Animal Science, RDA, Cheonan 330-801, Korea

²Department of Physiology, Institute of Health Sciences, Gyeongsang National University School of Medicine, Jinju 660-751, Korea

ABSTRACT

The objective of this work was to analyze the concentrations of progesterone (P4) and estrogen (E2) hormones changed during estrus synchronization in dairy heifers. Estrus synchronization was carried out with CIDR[®] (Controlled Intravaginal Drug Release) devices. Corpus luteum (CL) was classified into three grades based on its size and palpable characteristics. The concentrations of P4 and E2 were measured by enzyme-amplified chemiluminescence. Serum P4 concentration was markedly low at the estrus stage (36 hrs after removal of CIDR) compared to other stages, while E2 concentration was kept high during estrus stage. The serum P4 concentration was highest in the CL classified into grade I. These results indicate that P4 concentration could be used as a criteria for determining recipients for artificial insemination or embryo transfer in dairy cattle.

(Key words : Estrus synchronization, Dairy cattle, P4, E2, Corpus luteum)

서 론

소의 번식관리 효율을 높이고 계획적인 번식을 위한 일괄번식, 수정란이식 및 번식장애 질환 등의 치료를 위해 사용하는 발정동기화 기술은 국내·외 여러 연구자들을 통하여 그 방법이 개발되어 활용되고 있다.

최근 가축의 사양 기술이 발달하여 전문화된 대규모 사육형태로 바뀌에 따라 젖소의 산유량 증가, 한우의 증체량 증가 등 고능력 젖소, 한우 사육이 증가하면서 번식관리도 그만큼 복잡해지고 있는 실정이다. 특히 젖소의 경우 개량과 사양관리 개선으로 인해 산유량이 지속적으로 향상되어 고능력 젖소의 비율이 높아지고 있으나, 상대적으로 사육의 대규모화 및 개체관리 미흡으로 인해 젖소의 번식능력이 저하되고 있는 실정인데(Butler, 1998; Darwash 등, 1999), 발정 발견과 수정 후 수태율이 번식간격에 중요한 영향을 미치는데도 불구하고, 농장에서의 발정 발견율은 저조한 실정이다(Rounsaville 등, 1979). 이

에 따라 발정 발견 및 발견의 효율성을 높이기 위해 발정동기화 기술을 폭넓게 사용할 필요가 있다. 가축의 개량을 위해 이용되는 수정란이식 기술은 소에서도 널리 이용되고 있는데, 특히 한우에서는 산업화되어 한우의 개량을 위해 폭넓게 활용되고 있으나, 상대적으로 젖소에서는 그 활용도가 보편화되지 않은 실정이다. 소에서 수정란이식을 실행하기 위해서는 공란우의 체내수정란 생산, 회수된 체내수정란을 수란우에 이식하기 위한 선행 조건으로 발정동기화 기술이 동반되어야 한다.

현재까지 활용되는 소에서의 발정동기화 기술은 황체퇴행제인 prostaglandin F₂ α (PGF₂ α)를 사용하는 방법(Baek 등, 2005; Kim 등, 2006; Rantala 등, 2009; Park 등, 2010), progesterone 삽입제인 Controlled Intravaginal Drug Release (CIDR[®]) device (Kim 등, 2006; Colazo 등, 2009; Choe 등, 2011; Herlihy 등, 2012)나, Progesterone Releasing Intravaginal Device (PRID[®]) (Bulman 등, 1978; Hwang, 1984; Colazo 등, 2013) 또는 cue-mate[®] (Hanlon 등, 2005 a, b; Pfeifer 등, 2009; Butler 등, 2011, 2012) 등을 사용하

* 본 연구는 농촌진흥청 축산시험연구사업(PJ00859303)에 의해 수행되었음.

† Corresponding author : Phone: +82-41-580-3391, E-mail: : jkson@rda.go.kr

는 방법 등이 있다. PGF₂α 투여에 의한 발정동기화는 난소 내에 존재하는 황체를 용해시켜 발정을 발현시키는 방법이므로 발정주기 중 황체의 시기에 유효하다. 이와 같은 PGF₂α 투여에 의한 발정동기화 처리 시 효과는 우수한 편이지만, 발정 시 인공수정에 의한 수태율이 낮은 편인데, 그 원인은 PGF₂α 투여 후 일정 시기에 발정이 발현되는 것이 아니라 발정 발현 기간이 1~3일로 다양한 편이기 때문에, 발정 발현의 정확성이 떨어지는 것에 기인한 것으로 보고되고 있다(Folman 등, 1983). 이와 같은 PGF₂α의 단점을 보완하기 위해 질내 progesterone 삽입제를 사용하게 되었는데, 이를 질내에 일정기간 삽입함으로써 progesterone이 질 점막내로 흡수되어 혈중 progesterone이 일정 농도 이상으로 유지되는데, 일정기간이 지난 후 progesterone 삽입제를 질에서 제거하면 급격하게 progesterone 농도가 저하되어 난포가 발육되어 발정이 발현된다.

난소의 황체세포에서 대부분 분비되는 호르몬인 progesterone은 소의 번식기능을 평가하는 대표적인 번식 관련 호르몬으로서, 번식주기의 확인, 조기 임신진단, 번식 장애 진단, 난소 기능 진단 등에 활용되고 있다(Meisetelting과 Dailey, 1987). 소의 경우 progesterone 농도가 개체, 측정 방법 등에 따라 농도의 차이가 있을 수 있지만, 난소에서 기능성 황체의 존재 여부에 따른 기준치로 혈장, 혈청 및 탈지유에서 1 ng/ml, 전유에서 3 ng/ml, 지방유에서 30 ng/ml로 보고되고 있다(Nakao, 1980; Nakao 등, 1983).

난소의 난포에서 분비되는 estrogen은 암컷의 발정 행동을 유발한다. Estrogen의 농도는 발정 발현 시 최고의 정점을 나타내고, 뇌하수체로부터 황체형성호르몬 급증(LH-surge)을 유발하여 배란을 촉진하는 역할을 하는데, 이러한 estrogen은 그 기능이 단독으로도 작용하지만 progesterone과 협동하여 작용하기도 한다(Jung 등, 1996).

소에서 발정동기화 처리 시 P4 농도는 P4 삽입제를 질내에 삽입 후 제거하기 전까지 높은 농도를 유지하다 제거 후 급속도로 감소(Chebel 등, 2010)하며, 발정이 유도된 발정기 동안 혈중 P4는 낮은 농도를 유지한다(Kishimoto 등, 1987; Kim 등, 2008). 소의 발정주기 E2 농도는 발정기 높은 농도를 유지하다가 발정기 이후 낮은 농도를 지속하며, 다음 발정기인 20~22일에 다시 상승한다(Wetteman과 Hafs, 1972; Kim, 1985).

본 연구에서는 젖소에서 progesterone 삽입제인 CIDR를 이용하여 발정동기화 처리를 실시할 경우, 처리 기간별 주요한 번식 관련 호르몬인 P4와 E2의 혈중 농도를 확인하고, 황체의 등급별 P4의 농도를 분석하고자 수행하였다.

재료 및 방법

젖소 발정동기화

미경산 젖소의 발정동기화는 난소 및 자궁질환이 없는 건강한 미경산 젖소를 선발하여 progesterone 삽입제인 CIDR®(InterAg, New Zealand)를 질내에 삽입하고, es-

tradiol benzoate(EB) 1 mg(SY Esrone, Samyang, Seoul, Korea)을 근육주사하였다. CIDR 삽입 7일 후 CIDR를 제거하면서 dinoprost(Lutalyse™, Pharmacia & Upjohn)를 25 mg 근육주사하였고, dinoprost 투여 후 36시간째인 발정기에 GnRH 100 µg(Fertagyl®, Intervet) 근육주사하였으며, GnRH 주사 7일 후 hCG 1,500 IU(Chorulon®, Intervet)를 근육주사하였다. hCG 주사 1일 후 직장검사를 통하여 젖소의 황체등급을 확인하였다.

P4, E2 호르몬 농도 분석

혈액에서의 P4, E2 농도 분석을 위해 경정맥으로부터 채취한 젖소의 전혈을 3,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 혈청을 분리한 후 분석 시까지 냉동보관하였다. 보관된 혈청은 효소면역법 (Enzyme-amplified chemiluminescence)으로 Immulite 1000®(Siemens, USA)을 이용하여 P4, E2 농도를 분석하였다.

황체 발달 등급 확인

발정동기화를 실시한 젖소의 황체 발달 등급 측정은 수정란이식 직전 직장검사를 통하여 난소에 형성된 황체의 크기와 크라운 형성 여부로 판단하였다. 1등급 황체는 황체의 직경이 1.5 cm 이상이면서 크라운이 명확하게 형성되어 있는 반면, 2등급 황체는 황체의 직경이 1.5 cm 미만이면서 크라운 형성이 미약하고, 3등급 황체는 직장검사를 통하여 황체를 측정할 수 없을 경우로 구분하였다.

통계분석

실험결과와 통계학적 분석을 위해 처리군의 유의성 검정($p < 0.05$)은 F-test를 실시하였고, 처리군 간의 유의성 검정($p < 0.05$)은 ANOVA test를 실시하였다.

결과 및 고찰

발정동기화 처리 시기별 P4, E2 농도 변화

미경산 젖소를 대상으로 P4 삽입제인 CIDR를 사용하여 발정동기화를 실시하고, 시기별 혈청중 P4 및 E2 농도를 분석하여 Table 1 및 Table 2와 같은 결과를 나타내었다. 발정동기화 처리부터 CIDR 제거 전까지 P4의 농도가 2.2~2.8 ng/ml를 유지하다가 CIDR 제거 후에는 0.2 ng/ml의 수준으로 유의적으로 낮게 ($p < 0.05$) 떨어진 후 발정기가 7일 경과한 시점인 수정란이식 당일 2.0 ng/ml로 다시 상승하였다(Table 1). 반면, E2의 경우 유의적인 차이는 없으나, CIDR 제거 및 PGF₂α 투여 36시간 후인 발정기에 93.2 pg/ml로 높게 나타났다가 발정기가 7일 지난 수정란이식 당일에는 61.1 pg/ml로 혈중 농도가 감소하였다(Table 2).

Kim 등(2008)과 Kishimoto 등(1987)은 발정기에 낮은 P4 농도를 나타내다가 황체기에 4~5 ng/ml로 상승한다고 하였는데, 이는 본 시험에서도 유사하게 CIDR 제거 후 낮은 P4 농도를 보이다가 수정란이식 시점인 황체기

Table 1. Effect of CIDR-treated time on the serum progesterone concentration in dairy heifers

Estrus synchronization	No. of animals	Concentration of progesterone (ng/ml)			
		CIDR insert	CIDR removal	36 hrs after CIDR removal	at embryo transfer
1 st	15	3.3±2.7 ^a	1.6±0.7 ^a	0.1±0.1 ^b	1.5±0.7 ^a
2 nd	9	2.0±2.1 ^a	3.1±1.7 ^a	0.4±0.2 ^b	2.7±0.6 ^a
Total	24	2.8±2.4 ^a	2.2±1.4 ^a	0.2±0.2 ^b	2.0±0.8 ^a

Data are represented as mean±SD.

^{a,b} Different superscripts indicate significant difference ($p < 0.05$).

Table 2. Effect of CIDR-treated time on the serum estradiol-17β concentration in dairy heifers

Estrus synchronization	No. of animals	Concentration of estradiol-17β (pg/ml)			
		CIDR insert	CIDR removal	36 hrs after CIDR removal	at embryo transfer
1 st	15	107.6±35.1	93.0±25.2	99.2±30.5	51.1±19.5
2 nd	9	64.8±18.3	68.6±17.0	80.4±14.3	71.7±37.2
Total	24	91.9±35.8	84.7±24.7	93.2±26.8	61.1±30.7

에 상승하는 것으로 조사되었다. 본 시험에서 수란우의 발정동기화 처리 시 CIDR를 제거하고 36시간이 경과한 시기(공란우 인공수정 시기)의 P4 농도는 0.2 ng/ml 아주 낮은 농도를 나타내었는데, 이는 비임신 한우의 발정기 혈장 progesterone 농도가 0.58 ng/ml로 1 ng/ml 이하의 낮은 농도(Kim 등, 2008), 발정 종료 직후 및 인공수정을 실시한 소에서 0.3 ng/ml로 보고(Kishimoto 등, 1987)된 것과 동일한 결과를 나타내었으나, Baek 등(1995)은 한우에서 발정동기화 처리 후 인공수정 시점에서 progesterone 농도가 1.77 ng/ml로 보고하여 본 시험이나 Kim 등(2008), Kishimoto 등(1987)의 연구 결과에 비해 progesterone 농도를 높게 보고하였다.

Nakada 등(2000)은 E2 농도가 젖소의 발정주기 동안 2~3 pg/ml의 농도를 유지한다고 하였다. Han 등(2010)은 발정 7일이 경과한 수정란이식 시기에 13.9 pg/ml의 농도를 나타내다가 발정기인 21일령에 26.2 pg/ml로 상승한다고 하였고, Kim(1985)은 발정기 E2 농도가 12.32 pg/ml를 나타내다가 발정 주기 8일령의 황체에 5.08 pg/ml의 농도를 나타내는 등 발정기 이후 3~5 pg/ml로 감소 유지되다가 다음 발정기인 20~22일에 다시 12.78 ng/ml로 상승하였다. Wetteman과 Hafs(1972)도 E2의 농도가 발정기 최고치를 떠다가 이후 다음 발정기로 접어들 때까지 낮은 농도를 유지한다고 하였다. 본 연구에서는 E2의 농도가 CIDR를 제거하고, 2일이 경과한 발정기인 인공수정 시기에 93.2 pg/ml로 상승하였다가 수정란이식 시기에 61.1 pg/ml로 떨어졌다고 하였는데, 이는 전체적인 E2의 수치가 이전 연구 결과에 비해 높게 나타났으나, 발정기에 상승하였다가 이후 떨어진다는 내용과는 동일한 경향을 나타내었다. 소의 발정기동안 E2가 높게 분비되면 결론적으로 배란율을 높여 주어 수태율을 증진시킨다(Lo-

pez 등, 2002; Han 등, 2010)고 하는데, 이는 수정란이식을 위하여 수란우를 선발할 경우 E2의 농도가 수란우를 선택하는 하나의 요인으로 사용될 수 있는 것을 의미한다.

발정동기화 처리에 따른 황체 발달 등급 및 등급별 P4 농도

발정동기화를 실시한 젖소를 대상으로 수정란이식 당일 직장검사를 통한 황체 발달 등급과 등급별 P4의 농도를 조사하여 Table 3과 같은 결과를 나타내었다. CIDR를 이용한 발정동기화 처리 시 황체의 발달 등급은 1등급 45.8%, 2등급 37.5%, 3등급 16.7%로 분포되었으며, P4의 농도는 1등급 황체 2.5 ng/ml, 2등급 황체 1.6 ng/ml, 3등급 황체 1.3 ng/ml를 나타내어 황체의 등급이 좋을수록 혈중 P4의 농도도 상승하는 것을 확인할 수 있었다. 수정란이식 시 황체의 발달 등급이 좋을수록 수태율이 좋은 것으로 알려져 있는데(Kim 등, 2008; Baruselli 등, 2010), 본 연구에서는 직장검사를 통하여 검사한 황체의 등급이

Table 3. Changes in concentration of serum progesterone in grades of corpus luteum in dairy heifers

Grade of corpus luteum	No(%) of animals	Concentration of progesterone (ng/ml)
I	11 (45.8)	2.5±0.6 ^a
II	9 (37.5)	1.6±0.9 ^{a,b}
III	4 (16.7)	1.3±0.4 ^b

Data are represented as mean±SD.

^{a,b} Different superscripts indicate significant difference ($p < 0.05$).

Table 4. Concentration of serum progesterone at the time of embryo transfer in dairy heifers

Concentration of P4	No. of animals	Proportion of animals(%)
> 3	2	8.3
2~3	10	41.7
1~2	9	37.5
< 1	3	12.5

좋을수록 혈중 P4의 농도도 상승하는 것으로 조사되었다. 따라서 수란우의 수정란이식 당일 직장검사나 초음파 진단을 통한 황체 등급 판정과 함께 혈중 P4 농도를 확인한 후 수정란이식 여부를 결정하는 것이 수정란이식 수태율을 높일 수 있는 방법으로 사료된다.

발정동기화 처리에 따른 수정란이식 당일 수란우의 P4 농도 분석

발정동기화를 실시한 젖소를 대상으로 수정란이식 당일 채취한 혈액에서의 P4 농도는 Table 4에서 보는 바와 같다. 발정동기화 처리 후 수정란이식 당일 수란우의 평균 P4 농도는 2.0 ng/ml를 나타내었는데, P4의 농도가 3 ng/ml 이상인 개체는 8.3%, 2~3 ng/ml의 경우 41.7%, 1~2 ng/ml의 경우 37.5%, 1 ng/ml 미만을 나타낸 개체가 12.5%로 분포되었다.

본 조사에서 수정란이식 당일 P4의 농도가 2 ng/ml 이상인 개체는 전체의 50.0%, 2 ng/ml 미만인 개체는 50.0%로 조사되었는데, 이는 Kim 등(2006)이 조사한 평균 P4 농도 9.1 ng/ml에 비해 본 연구는 2.0 ng/ml로 평균 P4 농도가 낮은 편이었고, P4 농도가 2.0 ng/ml 이상인 개체가 Kim 등(2006)의 경우 96.5%로 높은 비율을 차지한 것에 비해 50.0%로 상대적으로 낮은 비율을 나타내었다.

인용문헌

- Baek KS, Park SJ, Park SB, Kim HS, Lee HJ, Lee WS, Jeon BS, Ahn BS, Kim JG, Jeong GY, Son JK (2005): Effect of PGF₂α+PGF₂α+CIDR program on estrous response in Holstein with varying BCS in early postpartum. Korean J Emb Trans 20:279-287.
- Baek KS, Seong HH, Oh SJ, Yang BS, Lee MS, Jung JK (1995): Prgenancy diagnosis of Hanwoo(Korean native cattle) by serum progesterone concentration during early gestation. Korean J Animal Reprod 19:197-203.
- Baruselli PS, Ferreira RM, Filho MF, Nasser LF, Rodrigues CA, Bo GA (2010): Bovine embryo transfer recipient synchronisation and management in tropical environments. Reprod Fertil Dev 22:67-74.
- Bulman DC, McKibbin PE, Appleyard WT, Lamming GE (1978): Effect of a progesterone-releasing intravaginal device on the milk progesterone levels, vaginal flora, milk yield and fertility of cyclic and non-cyclic dairy cows. J Reprod Fertil 53:289-296.
- Butler SA, Phillips NJ, Boe-Hansen GB, Bo GA, Burns BM, Dawson K, McGowan MR (2011): Ovarian responses in *Bos indicus* heifers treated to oxynchronize ovulation with intravaginal progesterone releasing devices, oestradiol benzoate, prostaglandin F₂α and equine chorionic gonadotrophin. Anim Reprod Sci 129: 118-126.
- Butler SA, Phillips NJ, Boe-Hansen GB, Bo GA, Burns BM, Dawson K, McGowan MR (2012): Animal-level factors affecting ovarina function in *Bos indicus* heifers treated to synchronize ovulation with intravaginal progesterone-releasing devices and oesradiol benzoate. Reprod Dom Anim 47:463-471.
- Butler WR (1998): Review: effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. J Dairy Sci 81:2533-2539.
- Chebel RC, Al-Hassan MJ, Fricke PM, Santos JEP, Lima JR, Martel CA, Stevenson JS, Garcia R, Ax RL (2010): Supplementation of progesterone via controlled internal drug release inserts during ovulation synchronization protocols in lactating dairy cows. J Dairy Sci 93:922-931.
- Choe C, Son JK, Cho SR, Kang D, Yeon SH, Choi SH, Kim NT, Jung YS, Kim SJ, Jung JW, Bok NH, Choi JS, Son DS (2011): Effects of corpus luteum grade of estrus synchronized recipients on pregnancy rate following embryo transfer in Korean cattle. J Emb Trans 26:33-36.
- Colazo MG, Dourey A, Rajamahendran R, Ambrose DJ (2013): Progesterone supplementation before timed AI increased ovulation synchrony and pregnancy per AI, and supplementation after timed AI reduced pregnancy losses in lactating dairy cows. Theriogenology 833-841.
- Clazo MG, Ree TO, Emmanuel DGV, Ambrose DJ (2009): Plasma luteinizing hormone concentrations in cows given repeated treatments or three different doses of gonadotropin releasing hormone. Theriogenology 71:984-992.
- Darwash AO, Lamming GE, Wooliams JA (1999): The potential for identifying heritable endocrine parameters associated with fertility in postpartum dairy cows. Anim Sci 68:333-347.
- Folman Y, McPhee SR, Cumming IA, Davis IF, Chamley WA (1983): Conception rates in cows after various synchronisation techniques using progesterone releasing intravaginal devices. Aust Vet J 60: 44-47.
- Han RX, Kim HY, Diao YF, Kim YH, Woo JS, Jin DI (2010): Progesterone and estrogen levels in Hols-

- tein blood and milk following artificial insemination and embryo transfer. *J Agri Sci* 37:393-398.
15. Hanlon DW, Davidson PJ, Hittmann AR, Joe AK (2005a): Supplementing previously treated anestrous dairy cows with progesterone does not increase first-service conception rate. *Theriogenology* 63:239-245.
 16. Hanlon DW, Jarratt GM, Davidson PJ, Millar AJ, Douglas VL (2005b): The effect of hCG administration five days after insemination on the first service conception rate of anestrous dairy cows. *Theriogenology* 63:1938-1945.
 17. Herlihy MM, Crowe MA, Diskin MG, Butler ST (2012): Effects of synchronization treatments on ovarian follicular dynamics, corpus luteum growth, and circulating steroid hormone concentrations in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 95:743-754.
 18. Hwang WS (1984): Effect of treatment with progesterone releasing intravaginal device (PRID) on conception rate and calving interval of postpartum dairy cows. *J Korean Soc Vet Clin Med* 1:25-31.
 19. Jung YC, Lee GS, Kim CK, Park CS, Suh GW (1996): *Dictionary of Reproduction* pp 484-487.
 20. Kim CH, Bhak JS, Shin JB, Kang CH (2008): A study on the early pregnancy diagnosis by changing of plasma progesterone concentration and morphology of ovary in pregnancy and non-pregnancy cows. *Korean J Vet Serv* 31:397-414.
 21. Kim IH, Kim YH, Suh GH, Kang HG (2006): Factors affecting estrous exhibition and conception following a single administration of PGF₂α in dairy cows. *J Vet Clin* 23:453-457.
 22. Kim SK (1985): Studies on the changes of sex hormone concentration in serum during the estrus cycle, and before and after estrus of Korean native cows. *Korean J Dairy Sci* 7:12-20.
 23. Kim YH, Koo JC, Oh CW, Kang SY, Yang BS, Oh SJ, Kim CN, Song JY, Kim IH (2006): *In vivo* embryo production and embryo transfer in Hanwoo and Jeju cattle using CIDR. *Korean J Emb Trans* 21:191-198.
 24. Kim YJ, Park H, Lee HL, Shin DS, Jo SW, Kim YS, Kim SH (2008): Results of embryo transfer with Hanwoo embryos produced *in-vivo* or *in-vitro* to Holstein cows as recipients. *J Emb Trans* 23:167-175.
 25. Kishimoto Y, Kato H, Mitani M (1987): Enzyme immunoassay of progesterone in bovine plasma and skim milk and its application to early pregnancy diagnosis. *J Jpn Vet Me Assoc* 40:161-164.
 26. Lopez H, Bunch TD, Shipka MP (2002): Estrogen concentrations in milk at estrus and ovulation in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 72:37-46.
 27. Meisterling EM, Dailey RA (1987): Use of concentrations of progesterone and estradiol-17β in milk in monitoring postpartum ovarian function in dairy cows. *J Dairy Sci* 70:2154-2161.
 28. Nakada K, Moryyoshi M, Nakao T, Watanabe G, Taya K (2000): Changes in concentrations of plasma immunoreactive follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, estradiol-17β, testosterone, progesterone, and inhibin in heifer from birth to puberty. *Dom Anim Endocrinol* 18:57-69.
 29. Nakao T (1980): Practical procedure for enzyme immunoassay of progesterone in bovine serum. *Acta Endocrinol* 93:223-227.
 30. Nakao T, Sugihashi A, Kawata K (1983): Milk progesterone levels in cows with normal or prolonged estrus cycles, referenced to an early pregnancy diagnosis. *Jpn J Vet Sci* 45:495-499.
 31. Park CH, Lim WH, Suh GH, Oh KS, Son CH (2010): Relationship between the conception rate after estrus induction using PGF₂α and other parameters in Holstein dairy cows. *J Emb Trans* 25:133-139.
 32. Pfeifer LF, Mapletoft RJ, Kastelic JP, Small JA, Adams GP, Dionello NJ, Singh J (2009): Effects of low versus physiologic plasma progesterone concentrations on ovarian follicular development and fertility in beef cattle. *Theriogenology* 72:1237-1250.
 33. Rantala MH, Katila T, Taponen J (2009): Effect of time interval between prostaglandin F₂α and GnRH treatments on occurrence of short estrous cycles in cyclic dairy heifers and cows. *Theriogenology* 71:930-938.
 34. Rounsaville TR, Oltenacu PA, Milligan RA, Foote RH (1979): Effects of heat detection, conception rate and culling policy on reproductive performance in dairy herds. *J Dairy Sci* 62:1435-1442.
 35. Wettelman RP, Hafs HD (1972): Estradiol and progesterone in blood serum during the bovine estrous cycle. *J Ani Sci* 34:1020-1024.
- (Received: 7 March 2013/ Accepted: 14 March 2013)