หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวคิดและทฤษฎี

การสังเกตการเป็นสัดที่มีประสิทธิภาพต่ำจะทำให้ประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ของฝูงโคนมลดลงได้ การเหนี่ยวนำการเจริญของฟอลลิเคิลและการตกไข่โดยการใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนร่วมกับเอสตร้าไดออล เบนโซเอทและพรอสตาแกลนดิน เอฟ ทู อัลฟา แล้วทำการผสมเทียมแบบกำหนดเวลาเพื่อลดความผิดพลาดจากการสังเกตการเป็นสัดสามารถเพิ่มสมรรถภาพการสืบพันธุ์ของแม่โคนมในฝูงได้

การสังเกตอาการเป็นสัดมีความสำคัญต่อการจัดการระบบสืบพันธุ์ของโคนมมาก ถ้าการสังเกตการเป็นสัดมีประสิทธิภาพต่ำจะทำให้ประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ต่ำลงด้วย การจัดการเพื่อให้การสังเกตการเป็นสัดสะดวกหรือมีประสิทธิภาพสูงขึ้นหรือทำให้โคแสดงอาการเป็นสัดและผสมพันธุ์ได้ใกล้เคียงกัน เช่นการใช้ฮอร์โมนเพื่อเหนี่ยวนำการเป็นสัด แต่ก็ยังจำเป็นต้องอาศัยวิธีการสังเกตอาการเป็นสัดที่ดีเพื่อให้สามารถผสมเทียมได้ในเวลาที่เหมาะสม จะทำให้ประสิทธิภาพการสืบพันธุ์เพิ่มสูงขึ้นได้มีการพัฒนาโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและกำหนดเวลาผสมเทียมโดยไม่ต้องอาศัยการสังเกตอาการเป็นสัดจะช่วยลดปัญหาที่เกิดจากความผิดพลาดของการสังเกตการเป็นสัดได้ และทำให้แม่โคได้รับการผสมทุกตัวและมีอัตราการตั้งท้องเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งจะทำให้ระยะหลังจากคลอดลูกจนผสมติดลดลงด้วย

การเหนี่ยวนำให้เป็นสัดพร้อมกันและกำหนดเวลาผสมเทียม (Synchronization of estrus and fixed-time AI)

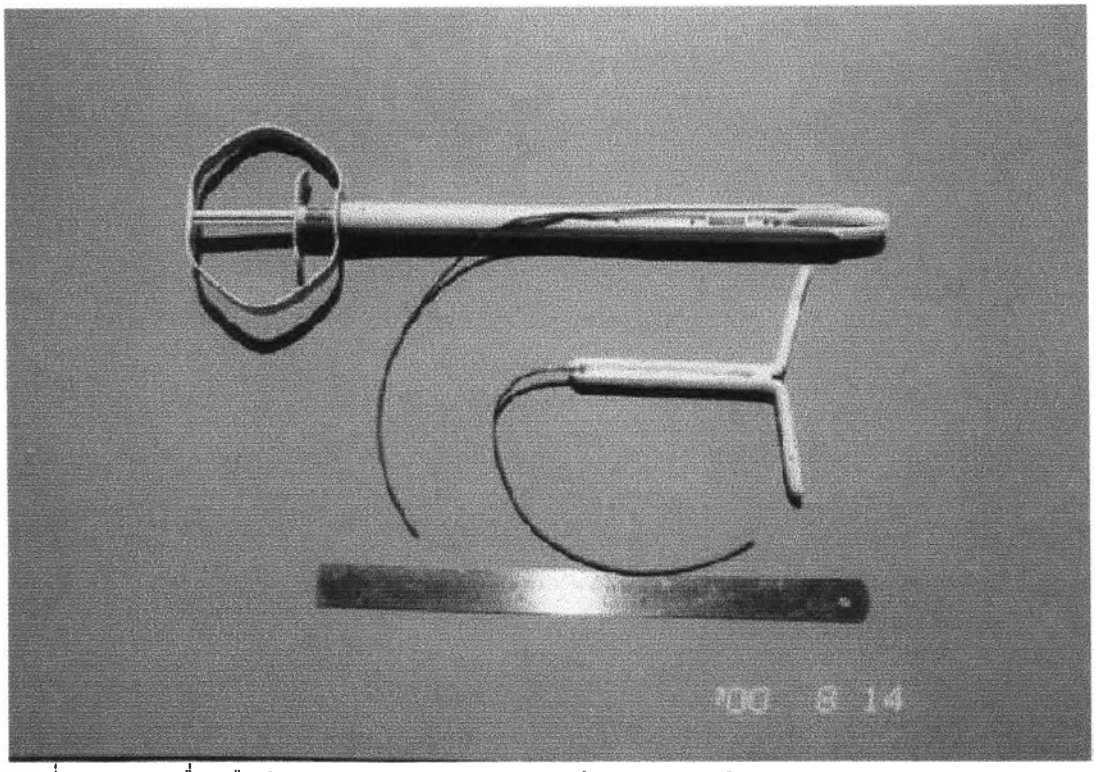
จุดประสงค์หลักของการเหนี่ยวนำให้โคเป็นสัดพร้อมกันคือ 1) เพื่อให้โคทุกตัวเป็นสัดในเวลาที่แน่นอนใกล้เคียงกันหลังจากการเหนี่ยวนำและสามารถผสมได้ในเวลาที่ใกล้เคียงกันด้วย และ 2) เพื่อให้แม่โคมีอัตราการตั้งท้อง (Pregnancy rate) สูงใกล้เคียงหรือดีกว่าแม่โคที่ผสมตามการจัดการปกติของฝูง นอกจากนี้วิธีการเหนี่ยวนำควรจะต้องเป็นวิธีที่มีการจับหรือบังคับโคน้อยและเสียค่าใช้จ่ายน้อยที่สุด (Macmillan and Peterson, 1993)

การเหนี่ยวนำการเป็นสัดในโคสามารถทำได้หลายวิธี แต่ละวิธีจะให้ผลตอบสนองต่างกัน ซึ่งอาศัยหลักการขยายหรือลดระยะ luteal phase เพื่อให้ระดับโปรเจสเตอโรนลดต่ำลงใกล้เคียงกัน เช่นการใช้สารพรอสตาแกลนดิน เอฟ ทู อัลฟา ($PGF_{2\alpha}$) เพื่อสลายคอร์ปัส ลูเตียม หรือการให้โปรเจสเตอโรนจากภายนอกติดต่อกันเป็นระยะเวลาช่วงหนึ่งแล้วจึงลดระดับให้ต่ำลง โคจะแสดงอาการเป็นสัดภายใน 2-5 วันต่อมา แต่เนื่องจากการใช้ฮอร์โมนเพื่อเหนี่ยวนำการเป็นสัดยังมีความจำเป็นต้องมีการตรวจการเป็นสัดที่ดีเพื่อให้การผสมพันธุ์นั้นมีประสิทธิภาพสูง เพราะถ้าการสังเกตอาการโคเป็นสัดไม่ดีจะทำให้เวลาในการผสมไม่เหมาะสมได้ จากการศึกษาการผสมแม่โคแบบกำหนดเวลาโดยไม่สังเกตอาการเป็นสัดหลังจากให้$PGF_{2\alpha}$แล้วพบว่ามีอัตราการตั้งท้องต่ำกว่าการผสมหลังจากที่มีการสังเกตอาการเป็นสัด (Lucy *et al.*,1986;Stevenson *et al.*,1987; Archibald *et al.*,1992)ซึ่งอัตราการตั้งท้องที่ต่ำกว่านี้ อาจเนื่องมาจากความแปรผันของระยะการเจริญของฟอลลิเคิลในขณะที่ให้$PGF_{2\alpha}$ทำให้เวลาในการตกไข่แปรผันไปด้วย เนื่องจากฟอลลิเคิลจะต้องใช้เวลาในการเจริญต่อหลังจากระดับของโปรเจสเตอโรนลดลงต่ำแล้วจึงเกิดการตกไข่ (Ovulation) ทำให้มีอัตราการผสมติดแตกต่างกันเมื่อกำหนดเวลาผสมเทียม (Hanlon *et al.*,1997) ระยะเวลาหลังจากฉีด$PGF_{2\alpha}$จนแสดงอาการเป็นสัดนั้นขึ้นอยู่กับระยะการเจริญของฟอลลิเคิลในขณะที่ฉีด $PGF_{2\alpha}$ ทำให้มีผลกระทบต่อการผสมแบบกำหนดเวลาเช่นโคที่มีฟอลลิเคิลระยะdominant follicle อยู่ในขณะที่ฉีด $PGF_{2\alpha}$ จะแสดงอาการเป็นสัดภายใน 48-60ชม.ต่อมา ส่วนโคที่dominant follicle อยู่ในระยะเริ่มฝ่อตัวในขณะที่ฉีด $PGF_{2\alpha}$ จะแสดงอาการเป็นสัดภายใน 5-7วัน เนื่องจากต้องใช้เวลาในการเจริญของฟอลลิเคิลชุดใหม่จนถึงระยะตกไข่ (Kastelic *et al.*,1990a) ฉะนั้นการเหนี่ยวนำให้เกิดการเป็นสัดพร้อมกัน(Synchronization of estrus) ไม่ได้ขึ้นอยู่กับการควบคุมระยะ luteal phase เพียงอย่างเดียว แต่ต้องควบคุมระยะการเจริญของฟอลลิเคิลในช่วงที่ทำการเหนี่ยวนำนั้นด้วยเพื่อให้ฟอลลิเคิลมีการเจริญและตกไข่ได้ใกล้เคียงกันหรือตกไข่ในเวลาที่แน่นอนขึ้นจะช่วยให้โปรแกรมการผสมแบบกำหนดเวลามีประสิทธิภาพสูงขึ้น

การใช้โปรเจสเตอโรนเหนี่ยวนำการเป็นสัด

การเหนี่ยวนำให้โคเป็นสัดพร้อมกันโดยใช้โปรเจสเตอโรนจะช่วยทำให้สามารถผสมเทียมโคได้จำนวนมากและจัดการได้สะดวกขึ้นซึ่งจะช่วยให้สามารถปรับปรุงพันธุ์ได้เร็วขึ้น นอกจากนี้โปรเจสเตอโรนสามารถช่วยกระตุ้นการทำงานของรังไข่ (Ovarian activity) เพื่อเพิ่มอัตราการตั้งท้องได้ (Robinson *et al.*,1989) หรือสามารถลดระยะท้องว่างหรือระยะหลังจากคลอดจนผสมติดได้โดยการปรับปรุงการจัดการผสมพันธุ์(Folman *et al.*,1984)

การเหนี่ยวนำให้โคเป็นสัดโดยใช้โปรเจสเตอโรนอาศัยหลักการที่ทำให้มีระดับโปรเจสเตอโรนในพลาสมาสูงติดต่อกัน (มากกว่า 1.5 ng/ml) เพื่อยับยั้งการหลั่งของ Luteinizing Hormone (LH) (Roche *et al.*,1981) การศึกษาระยะแรกใช้วิธีการฉีดฮอร์โมนติดต่อกันทุกวันเป็นเวลานาน 10 วัน สามารถเหนี่ยวนำให้โคเป็นสัดและผสมพันธุ์ได้ใกล้เคียงกันหลังจากหยุดฉีด แต่มีผลให้ความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำ ต่อมามีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่มีโปรเจสเตอโรนใช้ในรูปแบบต่างๆกันเช่น ชนิดให้กิน ชนิดใช้ฝังใต้ผิวหนังบริเวณหลังใบหูเช่น Syncromate-B® และชนิดใช้สอดเข้าช่องคลอดเช่น PRID®(Progesterone Releasing Intravaginal Device) และ CIDR®(Controlled Internal Drug Releasing) CIDR สำหรับสอดเข้าช่องคลอดที่ออกแบบมาสำหรับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดในสัตว์เคี้ยวเอื้องหลายชนิดเช่น CIDR-S ใช้สำหรับแกะ CIDR-G ใช้สำหรับแพะ และ CIDR-B ใช้สำหรับกวางหรือโค(Macmillan and Peterson, 1993) (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 แสดงเครื่องมือสำหรับสอด CIDR-B (บน) เข้าช่องคลอดโคและ CIDR-B (ล่าง)

การใช้ $PGF_{2\alpha}$ เพื่อเหนี่ยวนำการเป็นสัดที่ได้ผลจำเป็นต้องตรวจพบคอร์ปัส ลูเตียมหรือแม่โคอยู่ในระยะ luteal phase หรือต้องเป็นโคที่มีรอบวงจรการเป็นสัดปกติ ต่อมาได้มีการพัฒนาการใช้โปรเจสเตอโรนซึ่งสามารถเหนี่ยวนำการเป็นสัดได้ทั้งในระยะ follicular phase และ luteal phase และสามารถเหนี่ยวนำหรือรักษาแม่โคที่ไม่แสดงอาการเป็นสัดหลังคลอด หรือแม่โคที่อยู่ในระยะเลี้ยงลูกได้ (Galloway *et al.*,1987;Fike *et al.*,1997) แต่อัตราการผสมติดจะต่ำเมื่อให้โปรเจสเตอโรนติดต่อกันนานมากกว่า14วัน (Macmillan and Peterson,1993) ความสมบูรณ์พันธุ์ที่ลดลงเมื่อให้โปรเจสเตอโรนจากภายนอกติดต่อกันเป็นระยะยาวนานมีผลจากการเปลี่ยนแปลงการเจริญของฟอลลิเคิล (Savio *et al.*,1993) หรือมีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะการคงอยู่ของ ฟอลลิเคิล(Persistent dominant follicle) Taylor และคณะ(1993)และ Kinder และคณะ (1996) พบว่าการให้โปเจสเตอโรนจากภายนอกในระยะ follicular phase จะทำให้เกิดภาวะการคงอยู่ของ dominant follicleได้ เนื่องจากการให้โปรเจสเตอโรนจากภายนอกอาจทำให้ระดับของโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือดต่ำกว่าในระยะ luteal phase ปกติ (Subluteal phase) ทำให้การหลั่งของLHเปลี่ยนแปลงไปโดยทำให้มีความถี่ในการหลั่งสูงขึ้น(High frequency)แต่มีปริมาณต่ำ

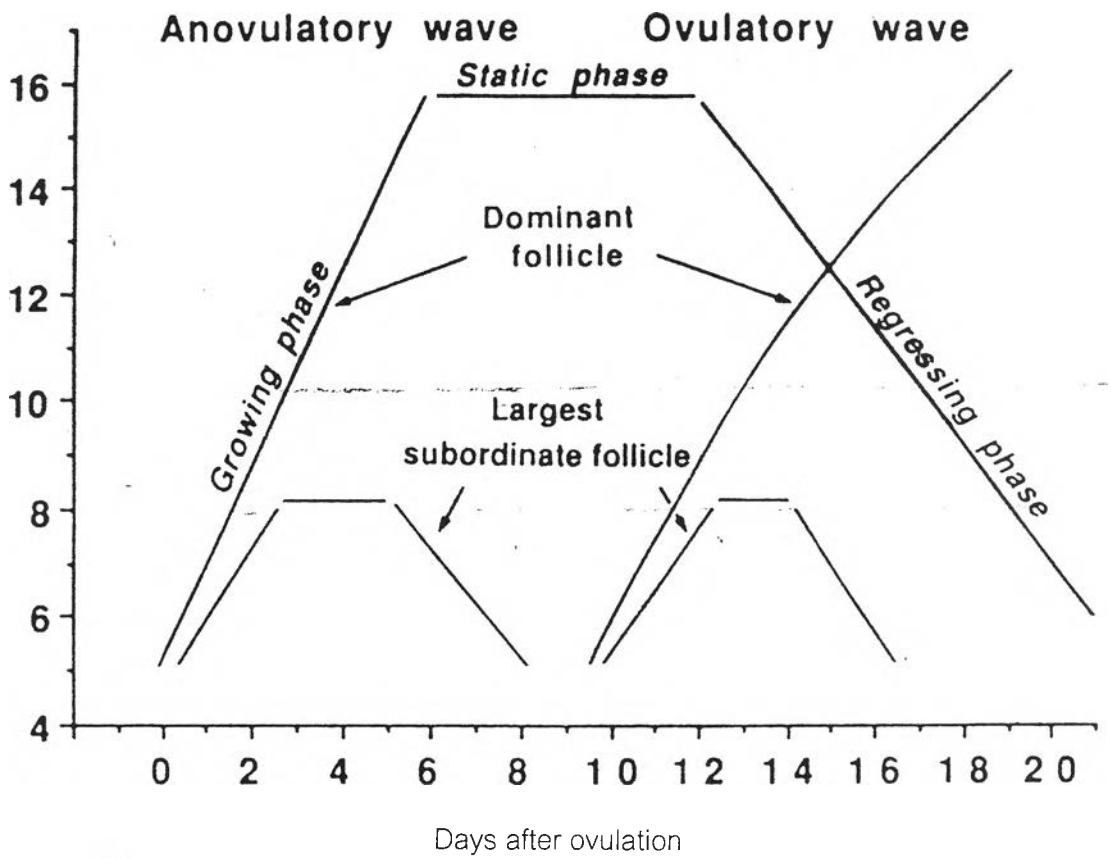
(Low amplitude) ทำให้ dominant follicle ที่มีอยู่ในช่วงนี้คงอยู่ต่อไปไม่ฝ่อตัวและสามารถเกิดการตกไข่ได้เมื่อเอาโปรเจสเตอโรนออก แต่อัตราการตั้งท้องจะลดลงเมื่อระยะเวลาของการคงอยู่ของ dominant follicle เพิ่มขึ้นจาก 4 วันเป็น 8 วันและจะลดลงต่ำมากถ้าอยู่นานมากกว่า 10 วัน (Mihm *et al.*,1994) ความสมบูรณ์พันธุ์ที่ลดลงของ persistent dominant follicle เนื่องจากไข่ (Oocyte)มีการเจริญที่ผิดปกติไป(Kinder *et al.*,1996) แต่ถ้าลดระยะเวลาการให้โปรเจสเตอโรนให้สั้นลงเหลือ 7 วันร่วมกับการฉีด $PGF_{2\alpha}$ ในวันสุดท้ายหรือก่อนวันสุดท้าย 1 วันช่วยทำให้อัตราการผสมติดดีขึ้น (Macmillan and Peterson,1993)

การเหนี่ยวนำระยะการเจริญของฟอลลิเคิลจะช่วยให้มีฟอลลิเคิลที่สมบูรณ์ในขณะที่สิ้นสุดการให้โปรเจสเตอโรนได้ Bo และคณะ (1995) และ Burke และคณะ (1999) พบว่าการให้ estradiol-17β ร่วมกับโปรเจสเตอโรนจะทำให้ dominant follicle ที่มีในขณะนั้นฝ่อตัวและเกิดฟอลลิเคิลใหม่ใกล้เคียงกันประมาณ 4 วันต่อมา ทำให้โคที่เหนี่ยวนำมีการเป็นสัดและการตกไข่ใกล้เคียงกัน

การเจริญของฟอลลิเคิลในโค

จากสมมติฐานที่ว่าในแต่ละวงรอบการเป็นสัดของโคจะมีกลุ่มฟอลลิเคิลเจริญอยู่ 2 ชุด (Rajakoski ,1960 cited in Ginther *et al.*,1989) จนเมื่อมีการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasound)มาใช้ศึกษาจำนวนฟอลลิเคิลขนาดต่างๆบนรังไข่เพื่อสนับสนุนสมมตฐานดังกล่าว โดยการใช้อัลตร้าซาวด์ตรวจฟอลลิเคิลบนรังไข่ทุกวัน จึงพบว่าการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่ของโคมีลักษณะคล้ายคลื่น (Wave-like) จำนวน 2-3 คลื่นในแต่ละวงรอบการเป็นสัดโดยมีฟอลลิเคิลขนาดเล็ก(4-5มม.)เจริญเป็นกลุ่มพร้อมกันหลังจากนั้นจะมีการคัดเลือกฟอลลิเคิลหลัก(Dominant follicle)เพียง1ฟอลลิเคิลที่สามารถเจริญต่อไปได้และกดการเจริญของฟอลลิเคิลขนาดรองลงมา (Subordinate follicles)และฟอลลิเคิลขนาดเล็กทำให้ฝ่อตัวลง ต่อมาเมื่อฟอลลิเคิลหลักของคลื่นแรกฝ่อตัวลงจะมีกลุ่มฟอลลิเคิลขนาดเล็กชุดใหม่เกิดขึ้น โคที่มี 2 คลื่นในวงจรการเป็นสัดจะพบฟอลลิเคิลกลุ่มแรกซึ่งเป็นที่ไม่เกิดการตกไข่ (Anovulatory follicular wave) ประกอบด้วยฟอลลิเคิลขนาดเล็ก (4-5 มม.) หลายใบในวันแรกของวงจร ภายหลังจากมีการคัดเลือกฟอลลิเคิลหลักจะใช้เวลาในการเจริญเป็น dominant follicle ประมาณ 6 วัน เรียกว่าระยะการเจริญ (Growing phase)และจะมีขนาดเท่าเดิม(เฉลี่ย15.8 มม.)ต่อไปอีกประมาณ 6 วัน เรียกว่าระยะคงที่ (Static phase) หลังจากนั้นจะเริ่มฝ่อตัวลงเรียกว่าระยะฟอตัว (Regressing phase) เมื่อฟอลลิเคิลหลักของชุดแรกฝ่อตัวลง จะเริ่มพบฟอลลิเคิลกลุ่มที่ 2 ซึ่งสามารถเจริญจนเกิดการตกไข่

ได้ (Ovulatory follicular wave) ประกอบด้วยฟอลลิเคิลขนาดเล็ก(4-5 มม.)หลายใบในวันที่ 9-10 ของรอบวงจรการเป็นสัดและมีเพียง 1 ฟอลลิเคิลเท่านั้นที่สามารถเจริญเติบโตเป็นฟอลลิเคิลหลักที่มีขนาดไม่แตกต่างกับ dominant follicle ของชุดแรกแต่สามารถเจริญต่อไปจนตกไข่ได้ (ovulatory follicle)ในวันที่เป็นสัด หลังจากนั้นก็จะมีฟอลลิเคิลชุดใหม่เกิดขึ้นคล้ายๆกันในวงรอบการเป็นสัดต่อมา (Ginther *et al.*,1989) ดังแสดงแผนภาพที่ 2



แผนภาพที่ 2 แสดงระยะเจริญ (Growing phase) และระยะคงที่ (Static phase) และระยะฝ่อตัว (Regressing phase) ของฟอลลิเคิลชุดที่ไม่เกิดการตกไข่(Anovulatory wave) และฟอลลิเคิลชุดที่เกิดการตกไข่(Ovulatory wave) ของโคที่มีฟอลลิเคิล 2 ชุดในวงรอบการเป็นสัด(Ginther *et al.*,1989)

การเหนี่ยวนำการเจริญของฟอลลิเคิล

เนื่องจากความความแตกต่างของระยะการเจริญของฟอลลิเคิลทำให้การตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและการตกไข่เกิดความแตกต่างกันดังนั้นถ้าทราบระยะการเจริญของฟอลลิเคิลหรือเหนี่ยวนำระยะการเจริญของฟอลลิเคิลก่อนที่จะเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยฮอร์โมนเพื่อให้มีฟอลลิเคิลอยู่ในระยะเดียวกัน และสามารถเจริญจนเกิดการตกไข่ได้ใกล้เคียงกันพอดี (Bo *et al.*, 1995)

ระยะการเจริญของฟอลลิเคิลสามารถตรวจได้โดยใช้อัลตร้าซาวด์ตรวจดูการเจริญของฟอลลิเคิลทุกวัน แต่ในทางปฏิบัตินั้นไม่สะดวกที่จะต้องตรวจเป็นรายตัวเสียเวลาและแรงงานมาก จึงพัฒนาวิธีการควบคุมระยะการเจริญของฟอลลิเคิลเพื่อเหนี่ยวนำให้มีฟอลลิเคิลอยู่ในระยะเดียวกันและสามารถเจริญต่อไปจนเกิดการตกไข่ได้ใกล้เคียงกันเมื่อระดับโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือดลดต่ำลง เนื่องจาก dominant follicleสามารถผลิตสารประกอบบางอย่างไปกดการเจริญของฟอลลิเคิลขนาดเล็กทำให้ไม่เกิดการเจริญฟอลลิเคิลชุดใหม่(Kastelic *et al.*, 1990b และ Ko *et al.*, 1991) การเหนี่ยวนำการเจริญของฟอลลิเคิลสามารถทำได้โดยทำให้เกิดการฝ่อตัวของ dominant follicle และเกิดฟอลลิเคิลชุดใหม่เจริญขึ้นมาแทนซึ่งอยู่ในระยะเดียวกัน (Growing dominant follicle) และสามารถเจริญจนเกิดการตกไข่ได้ใกล้เคียงกันเมื่อทำให้ระดับของโปรเจสเตอโรนลดลงต่ำสุด

การเหนี่ยวนำการเจริญของชุดฟอลลิเคิลโดยการทำให้ dominant follicle ฝ่อตัวไปเพื่อกำจัดกลไกที่ควบคุมการเจริญของฟอลลิเคิลอื่นๆทำให้มีฟอลลิเคิลชุดใหม่เกิดขึ้นมาแทน สามารถทำได้หลายวิธีเช่น

1.การทำลาย dominant follicle โดยการเจาะด้วยเข็มจะพบว่ามีฟอลลิเคิลชุดใหม่เกิดขึ้นใน 1.5 วันต่อมาและสามารถทำให้เกิดการตกไข่ได้ใกล้เคียงกันหลังจากฉีด $PGF_{2\alpha}$ (Bergfelt *et al.*,1994)

2.การใช้ GnRH เพื่อทำให้ dominant follicle เจริญไปเป็นคอร์ปัส ลูเตียม (Luteinization) หรือเกิดการตกไข่ (Ovulation) แล้วจะเกิด dominant follicle ใหม่ภายใน 3-4 วันหลังจากให้ GnRH ซึ่ง dominant follicle ใหม่นี้สามารถทำให้เกิดการตกไข่ได้โดยการฉีด $PGF_{2\alpha}$ ในวันที่ 6 หลังจากฉีด GnRH (Twagiramungu *et al.*,1994)

3.การใช้เอสโตรเจนร่วมกับโปเจสเตอโรน Bo และคณะ (1994) พบว่าการให้เอสตร้าไดออล เบนโซเอท (Estradiol-17β) 5 มก.ร่วมกับโปรเจสเตอโรนจะทำให้ dominant follicleหยุดการเจริญและฝ่อตัวลงซึ่งเป็นผลให้มีฟอลลิเคิลกลุ่มใหม่เกิดขึ้นในเวลาใกล้เคียงกัน

(เฉลี่ย 4.3±0.2 วัน)หลังจากฉีดเอสตร้าไดออล เบนโซเอท แต่ถ้าให้เอสตร้าไดออล เบนโซเอทเพียงอย่างเดียวและในกระแสเลือดมีระดับโปรเจสเตอโรนต่ำจะไม่สามารถกดการเจริญของ dominant follicleได้สมบูรณ์ทำให้ฟอลลิเคิลกลุ่มใหม่เกิดล่าช้ากว่านอกจากนี้ยังพบว่ามีการหลั่งของ luteinizing hormone (LH surge) เพิ่มขึ้นในโคที่ให้เอสตร้าไดออล เบนโซเอทเพียงอย่างเดียว เช่นเดียวกับ Burke และคณะ(1999) พบว่าการให้เอสตร้าไดออล เบนโซเอทเพียงอย่างเดียวในช่วงกลางระยะ diestrus หรือ luteal phase หรือให้ร่วมกับโปรเจสเตอโรนจะทำให้ dominant follicle ฝ่อตัวลงและเกิด dominant follicleใหม่ขึ้นมาแทน (เฉลี่ย 4.0±0.3วัน)เช่นกัน

การใช้เอสตร้าไดออล เบนโซเอทหลังจากถอดโปรเจสเตอโรนออก 24 ชั่วโมงเพื่อเหนี่ยวนำการตกไข่ให้ใกล้เคียงกัน

ความสำเร็จของการผสมเทียมขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของการสังเกตการเป็นสัด การเหนี่ยวนำการเป็นสัดจะช่วยทำให้การสังเกตอาการเป็นสัดของโคได้สะดวกขึ้นแต่ถ้าการสังเกตอาการเป็นสัดมีประสิทธิภาพต่ำอาจทำให้เวลาในการผสมเทียมไม่เหมาะสมได้ ทำให้มีอัตราการผสมติดต่ำดังนั้นนั้นการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและผสมเทียมแบบกำหนดเวลาจะช่วยแก้ปัญหานี้ได้ การใช้เอสตร้าไดออล เบนโซเอทขนาดต่ำ(low dose) ในโคสาวและแม่โคหลังจากถอดโปรเจสเตอโรนออก 24-30 ชม.จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเหนี่ยวนำการเป็นสัดได้ Short และคณะ(1973)พบว่าเอสโตรเจนสามารถเหนี่ยวนำการการหลั่งของLHในแม่โคได้ซึ่งจะพบระดับLHสูงสุด (LHpeak)ในช่วง16-24ชม.หลังจากฉีดเอสโตรเจน แต่ถ้าในพลาสมามีระดับโปรเจสเตอโรนมากกว่า 0.5 ng/ml เอสโตรเจนจะไม่สามารถกระตุ้นการหลั่งของ LH ได้ (Alam and Dobson, 1987; Nanda *et al.*,1988) ซึ่ง Lammoglia และคณะ (1998) พบว่าขนาดของเอสตร้าไดออล เบนโซเอทที่เหมาะสมในโคสาวคือ 0.4 มก.ส่วนแม่โคคือ1.0 มก.ขนาดนี้ทำให้จำนวนแม่โคหรือโคสาวแสดงพฤติกรรมการเป็นสัดสูงขึ้นและทำให้ระดับของestradiol-17βและLHในซีรั่มสูงขึ้นภายใน 24 ชม.(พิสัย16-28 ชม.) เช่นเดียวกับ Lemaster และคณะ(1999) พบว่าเมื่อฉีดเอสตร้าไดออล เบนโซเอทที่24ชม.หลังจากถอดโปรเจสเตอโรนออกทำให้ระดับของLHสูงที่สุดในเวลาเฉลี่ย 48.8 ชม.หลังจากถอดโปรเจสเตอโรน และเกิดการตกไข่ในเวลาเฉลี่ย 28.8±4.9 ชม. หลังจากมีระดับของ LH สูงสุด การฉีดเอสตร้าไดออล เบนโซเอทหลังจากถอดโปรเจสเตอโรนออก 24-48 ชม. จะทำให้เวลาในการเป็นสัดและตกไข่เร็วขึ้นกว่าโคที่ไม่ได้ฉีด (50.0-60.3 ชม. vs. 66.1 ชม.) และ (74.5-78.9 ชม. vs. 93.5 ชม.)ตามลำดับ โคสาวมากกว่า 83% ที่ฉีดเอสตร้าไดออล เบนโซเอทหลังถอดโปรเจสเตอโรน 24ชม.แสดงอาการเป็นสัดระหว่าง48-59 ชม.หลังจากถอดโปรเจสเตอโรน

ซึ่งจะเห็นได้ว่าการใช้เอสตร้าไดออล เบนโซเอทฉีดให้ 24 ชม.หลังจากการเหนี่ยวนำการเป็นสัดโดยใช้โปรเจสเตอโรนนาน 7 วัน ร่วมกับฉีด $PGF_{2\alpha}$ 1 วันก่อนถอดโปรเจสเตอโรนสามารถเหนี่ยวนำให้แสดงอาการเป็นสัดได้ใกล้เคียงกันและพฤติกรรมการเป็นสัดไม่เปลี่ยนแปลงรวมทั้งเวลาในการตกไข่เร็วขึ้นด้วย และเวลาที่เหมาะสมในการผสมเทียมให้ได้อัตราการตั้งท้องสูงที่สุดคือที่ 60 ชม.หลังจากถอดเอาโปรเจสเตอโรนออก (Lemaster *et al.*,1999) นอกจากนี้การเหนี่ยวนำระยะการเจริญของฟอลลิเคิลในวันที่เริ่มสอดโปรเจสเตอโรนโดยใช้เอสตร้าไดออล เบนโซเอทจะช่วยให้เวลาในการตกไข่ใกล้เคียงกันยิ่งขึ้น (Bo *et al.*,1995)

ผลกระทบของฤดูกาลต่อสมรรถภาพการสืบพันธุ์ของแม่โคนม

จากการศึกษาของ Chantaraprateep และ Humbert (1994) พบว่าอัตราการผสมติดสำหรับการผสมครั้งแรกหลังจากคลอดลูกของแม่โคในพื้นที่จังหวัดนครปฐมและราชบุรีมีความสัมพันธ์กับเดือนที่แม่โคได้รับการผสมเทียมโดยในช่วงฤดูที่อากาศแห้งได้แก่เดือนพฤศจิกายน-กุมภาพันธ์ มีอัตราการผสมติดสูงกว่าช่วงฤดูฝน (53.6% vs 15.6%) และพบว่าแม่โคที่ผสมในช่วงฤดูที่อากาศแห้งมีสมรรถภาพการสืบพันธุ์ดีกว่าแม่โคที่ผสมในช่วงฤดูฝน ซึ่งชี้ให้เห็นว่าช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการคลอดลูกได้แก่เดือนกันยายน-มกราคมและผสมพันธุ์ในช่วงเดือนพฤศจิกายน -พฤษภาคม Ryanและคณะ (1993) พบว่าอัตราการตั้งท้องในฤดูร้อนต่ำกว่าฤดูหนาวอย่างมีนัยสำคัญ(21 และ 36 %; $p<0.05$) จากการศึกษาของ Wolfenson และคณะ (2000) พบว่าความเครียดจากความร้อนเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลทำให้แม่โครีดนมมีความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำเนื่องจากฟอลลิเคิลหลักถูกกดการเจริญ ทำให้ความสามารถในการสังเคราะห์ฮอร์โมนของฟอลลิเคิลลดลงซึ่งอาจทำให้เวลาในการแสดงอาการเป็นสัดหรือเวลาในการตกไข่เปลี่ยนแปลงไป Rodtian และคณะ (1996) พบว่าในช่วงฤดูร้อนจะทำให้เวลาการแสดงอาการเป็นสัดของแม่โครีดนมจะสั้นกว่าปกติ (น้อยกว่า 18 ชม.) นอกจากนี้ความเครียดจากความร้อนทำให้ไข่ (Oocyte) มีคุณภาพลดลง (Badinga *et al.*,1993) รวมทั้งทำให้ความสามารถในการเจริญของตัวอ่อนลดลงและทำให้ตัวอ่อนมีอัตราการตายเพิ่มสูงขึ้น (Ryan *et al.*,1993 และ Rocha *et al.*,1998)