

การเปรียบเทียบจำนวนและขนาดของฟอลลิเคิล และระดับความเข้มข้น ฮอร์โมนสเตียรอยด์ระหว่างโครีดนมที่มีวงรอบการเป็นสัดตามธรรมชาติ และโครีดนมที่ได้รับการเหนี่ยวนำการตกไข่

Comparison of number and size of follicles and steroid hormone concentrations between natural cycling and synchronized ovulation lactating dairy cows

วิรุฬห์ อินทโมนี¹, ไชยณรงค์ นาวานุเคราะห์^{1,2,3*}, อารีย์ ไกรสุรีย์^{1,2} และ ณัฐวุฒิ กกรัมย์¹

Wiroon Inthamonee¹, Chainarong Navanukraw^{1,2,3*}, Aree Kraisoorn^{1,2}
and Nattawut Kogram¹

บทคัดย่อ: การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบจำนวนและขนาดฟอลลิเคิล และระดับความเข้มข้นฮอร์โมนสเตียรอยด์ระหว่างโครีดนมที่มีวงรอบการเป็นสัดตามธรรมชาติและโครีดนมที่ได้รับการเหนี่ยวนำการตกไข่ ใช้โครีดนมหลังคลอดพันธุ์ลูกผสมไฮลด์-ฟรีเซียนระดับสายเลือดมากกว่า 87.5% และมีคะแนนความสมบูรณ์ร่างกายไม่น้อยกว่า 2.5 จำนวน 8 ตัวสุ่มโครีดนมให้ได้รับทรีทเมนต์ คือ กลุ่มควบคุม (control) โครีดนมได้รับการตรวจสัดและผสมเทียมในระยะที่ต้องรอได้ก่อนผสมเทียม (voluntary waiting period) มากกว่า 60 วันขึ้นไป และกลุ่มที่ได้รับการโปรแกรมเหนี่ยวนำการตกไข่ (synchronized ovulation) ใช้โปรแกรม Double Ovsynch (GnRH - 7 วัน - PGF_{2α} - 3 วัน - GnRH - 7 วัน - GnRH - 7 วัน - PGF_{2α} - 2 วัน - GnRH และทำผสมเทียมแบบกำหนดเวลาในช่วงวันที่ 16 หลังฉีด GnRH เข็มสุดท้าย) จากการศึกษาพบว่า จำนวนฟอลลิเคิลขนาดกลางและขนาดใหญ่ของทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน ($P > 0.05$) แต่จำนวนฟอลลิเคิลขนาดเล็กของกลุ่ม synchronized ovulation มีค่ามากกว่ากลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) นอกจากนี้ขนาดของฟอลลิเคิลขนาดเล็กและขนาดกลางในกลุ่ม synchronized ovulation มีค่ามากกว่ากลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในขณะที่ขนาดของฟอลลิเคิลขนาดใหญ่และฟอลลิเคิลก่อนตกไข่ทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน ($P > 0.05$) ส่วนระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนเอสตราไดโอด (E2) ของกลุ่ม synchronized ovulation มีค่าสูงกว่ากลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ระดับความเข้มข้นฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (P4) ของทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน จากการศึกษาสรุปได้ว่าการใช้โปรแกรมเหนี่ยวนำการตกไข่ โดยวิธี Double Ovsynch ทำให้จำนวนและขนาดฟอลลิเคิลเพิ่มขึ้น รวมทั้งระดับความเข้มข้นสเตียรอยด์ฮอร์โมน (E2) สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับโครีดนมที่ผสมตามธรรมชาติ ซึ่งจะส่งผลดีต่อศักยภาพการตกไข่ และคุณภาพโอเอสตี

คำสำคัญ: ฟอลลิเคิล, ฮอร์โมนสเตียรอยด์, การเหนี่ยวนำการตกไข่, โครีดนม

¹ สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

² ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

Agricultural Biotechnology Research Center for Sustainable Economy (ABRCSE), Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

³ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรสำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ ประเทศไทย 10900

Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900

* Corresponding author: chanav@kku.ac.th

ABSTRACT: The objective of this study was to compare number and size of follicles and steroid hormone concentrations between natural cycling and synchronized ovulation lactating dairy cows. Postpartum crossbred Holstein-Friesian (HF) lactating dairy cows ($\geq 87.5\%$ HF) ($n = 8$), with the body condition score of 2.5 or greater, were randomly assigned to receive treatments: control (estrus detection and artificial insemination in the voluntary waiting period less 60 days) and synchronized ovulation with Double Ovsynch (GnRH - 7 days - PGF $_{2\alpha}$ - 3 days - GnRH - 7 days - GnRH - 7 days - PGF $_{2\alpha}$ - 2 days - GnRH - timed artificial insemination 16 hours after the final GnRH). The result demonstrated that the number of medium and large follicles in both groups was not significantly different. However, the number of small follicles in the Double Ovsynch group was significantly greater than the control group ($p < 0.05$). In addition, the size of small and medium follicles of Double Ovsynch group was greater than the control group ($p < 0.05$), but the size of large follicles, and preovulatory follicle did not differ between groups. The concentration of estradiol (E $_2$) of cow treated with Double Ovsynch was significantly greater than the control cows ($p < 0.05$), but concentration of progesterone (P $_4$) was not different between groups. Thus, this study can be concluded that synchronized ovulation with Double Ovsynch may affects number of growing follicles, follicle sizes, and concentration of steroid hormone (E $_2$) leading to have greater ovulation potential and oocyte quality in synchronized ovulation of lactating dairy cows.

Keywords: Follicle, Steroid hormone, Synchronized ovulation, Lactating dairy cows

บทนำ

ประสิทธิภาพทางการสืบพันธุ์ลดลงเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างมากต่ออุตสาหกรรมโคนม โดยเฉพาะโคนมในช่วง 3 สัปดาห์ก่อนคลอดถึง 3 สัปดาห์หลังคลอด (transition period) มีการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาอย่างมาก เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการคลอดและการสร้างน้ำนม ส่งผลต่อปริมาณการกินได้ที่น้อยลง ทำให้โภชนาการต่างๆ โดยเฉพาะพลังงานไม่เพียงพอกับความต้องการของร่างกาย ทำให้เกิดความไม่สมดุลของพลังงาน ซึ่งปัญหาเหล่านี้ส่งผลเสียต่อสุขภาพของมดลูก โคนมหลังคลอดใช้เวลาในการกลับสัติยาวนาน ไม่แสดงอาการเป็นสัดหรือเป็นสัดไม่ชัดเจน อัตราการผสมติดต่ำ ส่งผลให้ความสมบูรณ์พันธุ์ในโคนมลดต่ำลง (Walsh et al., 2011)

ในช่วงวงจรการเป็นสัดแต่ละรอบการเจริญเติบโตและพัฒนาการของฟอลลิเคิลเริ่มต้นจากการ recruitment และการเจริญเติบโตของ primary follicles ภายในรังไข่ ซึ่งการพัฒนาของฟอลลิเคิลจนถึง preovulatory follicle จะสำเร็จได้นั้นต้องอาศัยการเจริญเติบโตของเซลล์โดยการแบ่งเซลล์ และการเพิ่มจำนวนเซลล์ของ granulosa และ theca cells ซึ่งจะต้องอาศัยฮอร์โมน gonadotropins เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโต นอกจากนี้ฟอลลิเคิลหลายๆ ฟองที่เจริญเติบโต แต่จะมีเพียงหนึ่งฟอลลิเคิลเท่านั้นที่สามารถเจริญเติบโตและพัฒนาไปเป็น dominant follicle หรือพัฒนาไปสู่การตกไข่ได้ จึงมีกลไกที่

จำเพาะและมีประสิทธิภาพในกระบวนการคัดเลือกฟอลลิเคิล (selection) ที่จะสามารถเจริญเติบโตไปจนถึงเกิดการตกไข่ได้ (Ginther et al., 2003) ดังนั้นหากกระบวนการเจริญเติบโตและพัฒนาการของฟอลลิเคิลล้มเหลวก็จะส่งผลเสียต่อการให้ลูกของสัตว์เหล่านี้ ด้วยเหตุนี้หากมีองค์ความรู้ความเข้าใจ และสามารถควบคุมการเจริญเติบโตและพัฒนาการของฟอลลิเคิล รวมทั้งการทำงานของคอร์ปัส ลูเทียม (corpus luteum, CL) ได้อย่างมีประสิทธิภาพก็จะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพทางการสืบพันธุ์ได้ จึงได้มีการพัฒนาโปรแกรมเหนี่ยวนำการตกไข่และการผสมเทียมแบบกำหนดเวลา โดยการใช้ฮอร์โมน 2 ชนิดร่วมกัน ได้แก่ ฮอร์โมน GnRH และ PGF $_{2\alpha}$ เช่น Ovsynch protocol ซึ่งสามารถช่วยเพิ่มอัตราการผสมติด และอัตราการตั้งท้องได้ (Wiltbank and Pursley, 2014) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าโปรแกรมนี้มีข้อจำกัดหลายๆ เช่น ความแตกต่างของสถานะวงจรการเป็นสัดต่อมาได้มีการพัฒนาโปรแกรม Double Ovsynch เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว และช่วยเพิ่มความสมบูรณ์พันธุ์ในโคนมเมื่อเทียบกับ Ovsynch protocol (Ayres et al., 2013; Dirandeh et al., 2014) นอกจากนี้สามารถชักนำให้โคนมที่ไม่มีวงจรการเป็นสัดและเกิดการตกไข่ได้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปรียบเทียบจำนวนและขนาดฟอลลิเคิล และระดับความเข้มข้นฮอร์โมนสเตียรอยด์ระหว่างโครีดนมที่มีวงจรการเป็นสัดตามธรรมชาติและโครีดนมที่ได้รับการเหนี่ยวนำการตกไข่

วิธีการศึกษา

งานวิจัยนี้ได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยการบรรณาการใช้สัตว์ทดลองของมหาวิทยาลัยขอนแก่น (ACUC-KKU-2560) ใช้โครีดนมหลังคลอด (postpartum) จำนวน 8 ตัวพันธุ์ลูกผสมไฮลส์ไคร์-ฟรีเซียนที่มีระดับสายเลือดมากกว่า 87.5% ระยะที่ท้องรอได้ก่อนผสมเทียม (voluntary waiting period) มากกว่า 60 วันขึ้นไปโครีดนมมีระดับคะแนนร่างกายมากกว่า 2.5 ตามระบบ A quarter-point scale ทำการสุ่มโครีดนมให้ได้รับวิธีเมเนตต์ดั่งนี้กลุ่มควบคุม (control) เป็นโครีดนมได้รับการตรวจจสัดตามธรรมชาติและผสมเทียมและกลุ่มที่ได้รับโปรแกรมเหนี่ยวนำการตกไข่ (synchronized

ovulation) เป็นโครีดนมที่ได้รับโปรแกรมเหนี่ยวนำการตกไข่และผสมเทียมแบบกำหนดเวลา (Timed artificial insemination, TAI) โดยใช้โปรแกรม Double Ovsynch ดังนี้ วันแรกฉีด GnRH (Receptal®, Intervet, Auckland, New Zealand) ขนาด 100 µg ต่อจากนั้นอีก 7 วันฉีด PGF_{2α} (Lutalyse®, Pfizer Animal Health, New York, USA) ขนาด 25 mg หลังจากนั้นอีก 3 วันฉีด GnRH เข็มที่สองขนาด 100 µg ต่อจากนั้นอีก 7 วัน จึงเริ่มโปรแกรม Ovsynch โดยฉีด GnRH เข็มแรกขนาด 100 µg หลังจากนั้น 7 วันฉีดฮอริโมน PGF_{2α} ขนาด 25 mg อีก 1 วันต่อจากนั้นฉีด GnRH เข็มสุดท้ายขนาด 100 µg และ TAI ในช่วงเวลาที่ 16 หลังฉีด GnRH เข็มสุดท้ายโดยทั้งสองกลุ่มใช้น้ำเชื้อแช่แข็งจากพ่อพันธุ์ตัวเดียวกันในการผสมเทียมดังแสดงใน Figure 1

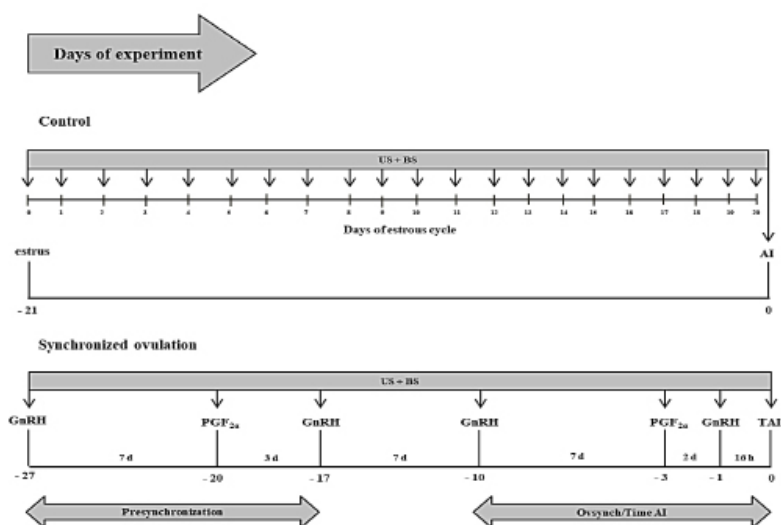


Figure 1 Experimental protocol used for control and synchronized ovulation (Double Ovsynch) in lactating dairy cows. Transrectal ultrasonography (US) and collection of blood samples

ทำการเก็บรวบรวมผลการทดลอง โดยติดตามการพัฒนาและการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลบนรังไข่ โดยการใช้เครื่องอัลตราซาวด์ (HS-2000, HONDAELECTRONICS, Japan) โดยกลุ่ม control เริ่มตั้งแต่โคแสดงอาการเป็นสัดจนถึงวันที่ทำการผสมเทียม และกลุ่ม synchronized ovulation จะเริ่มตั้งแต่วันที่ -27, -20, -17, -10, -3, -1, และวันที่ทำ TAI

จากนั้นนับจำนวนและวัดขนาดฟอลลิเคิลบนรังไข่ทั้งสองข้าง โดยทำการแยกฟอลลิเคิลตามขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเป็น 3 กลุ่ม คือฟอลลิเคิลขนาดเล็ก (small follicles) ขนาด ≤ 4 มิลลิเมตร ฟอลลิเคิลขนาดกลาง (medium follicles) ขนาด 5-9 มิลลิเมตร และฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ (large follicles) ขนาด ≥ 10 มิลลิเมตร ตามวิธีการของ Shabankareh et al. (2013) พร้อม

กับวัดขนาดฟอลลิเคิลก่อนตกไข่ (Preovulatory follicle size) และเก็บตัวอย่างเลือด เพื่อวัดความเข้มข้นของฮอร์โมนเอสตราไดโอด (E2) และฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (P4) โดยกลุ่ม control เริ่มตั้งแต่แสดงอาการเป็นสัดจนถึงวันที่ทำการผสมเทียม และกลุ่ม synchronized ovulation จะเริ่มตั้งแต่วันที่ -27, -20, -17, -10, -3, -1, และวันที่ทำ TAI จะเก็บตัวอย่างเลือดจาก coccygeal vein จำนวน 7 มิลลิลิตร แล้วนำตัวอย่างเลือดเก็บที่อุณหภูมิ 4°C นาน 24 ชั่วโมง เพื่อให้เลือดแข็งตัว แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงโดยเครื่อง centrifuge ด้วยความเร็ว 3,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที (Navanukraw et al., 2004) แล้วนำซีรัมที่อยู่ด้านบน (Supernatant) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของฮอร์โมน E2 ด้วยวิธี ELISA Kit และฮอร์โมน P4 ด้วยวิธี competitive ELISA (Crane et al., 2006)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

แสดงค่าเฉลี่ยในรูปแบบ Mean±SEM และใช้การวิเคราะห์ SAS software (SAS Institute Inc., Cary, NC) ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Student's t-test (Steel et al., 1997)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

จำนวนและขนาดของฟอลลิเคิล

จำนวนของฟอลลิเคิลขนาดกลางและขนาดใหญ่ของทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน ($P>0.05$) อย่างไรก็ตามจำนวนของฟอลลิเคิลขนาดเล็กของกลุ่ม synchronized ovulation มีค่ามากกว่ากลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญ (4.5 ± 0.65 และ 7.5 ± 1.04 ตามลำดับ; $P<0.05$) นอกจากนี้ขนาดของฟอลลิเคิลขนาดเล็กและขนาดกลางในกลุ่ม synchronized ovulation มีค่ามากกว่ากลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (2.5 ± 0.11 mm vs. 4.1 ± 0.08 mm และ 5.9 ± 0.31 mm vs. 7.5 ± 0.32 mm ตามลำดับ; $P<0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Ayres et al. (2013) และ Dirandeh et al. (2014) พบว่าการใช้โปรแกรม Double ovulation สามารถกระตุ้นการพัฒนาของฟอลลิเคิลไปสู่ฟอลลิเคิลที่เจริญเติบโตเต็มที่ก่อนการตกไข่ในขณะที่ขนาดของฟอลลิเคิลขนาดใหญ่และฟอลลิเคิลก่อนตกไข่ของทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน ($P>0.05$) ดังแสดงใน Table 1

Table 1 Number of follicles, follicle size, and preovulatory follicle size of the control and synchronized ovulation lactating dairy cows

Parameters	Treatments	
	Control (n=4)	synchronized ovulation (n=4)
Number of follicles		
Small (≤ 4)	4.5 ± 0.65^b	7.5 ± 1.04^a
Medium (5 - 9)	2.0 ± 0.41	2.5 ± 0.65
Large (≥ 10)	1.25 ± 0.25	1.5 ± 0.29
Follicle size (mm)		
Small (≤ 4)	2.5 ± 0.11^b	4.0 ± 0.08^a
Medium (5 - 9)	5.9 ± 0.31^b	7.5 ± 0.32^a
Large (≥ 10)	14.7 ± 0.82	14.8 ± 0.63
Preovulatory follicle size (mm)	15.2 ± 0.55	15.3 ± 0.07

^{a,b} Within a row, means with different superscripts differ ($P<0.05$), Values are mean $\pm$ SEM

ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน E2 และ P4

ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน E2 ของกลุ่ม synchronized ovulation มีค่าสูงกว่ากลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (4.2 ± 0.58 pg/ml และ 7.9 ± 0.28 pg/ml ตามลำดับ; $P < 0.05$) (Figure 2A) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Dirandeh et al. (2014) โดยระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน E2 ที่เพิ่มขึ้น จะส่งผลต่อระดับความเข้มข้นฮอร์โมน LH เพิ่มขึ้น ทำให้ preovulatory follicle มีศักยภาพในการตกไข่เพิ่มขึ้น (Santos et al., 2010) ในขณะที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน P4 ของทั้งสองกลุ่ม ไม่มีความแตกต่างกัน ($P > 0.05$) (Figure 2B)

สอดคล้องกับการศึกษาของ Ayres et al. (2013) ในการใช้โปรแกรม Double Ovsynch ไม่มีผลต่อระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน P4 แต่อย่างไรก็ตาม ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน P4 ลดลงในช่วงระหว่างการผสมเทียม โดยผลจากการสลายของ CL แสดงถึงขนาดของ preovulatory follicle ที่ใหญ่ขึ้น และระยะเวลาช่วงก่อนการเป็นสัด (proestrus) ที่ยาวขึ้น เช่นเดียวกับระดับความเข้มข้นฮอร์โมน E2 ที่เพิ่มขึ้นในช่วงระยะก่อนการตกไข่ รวมทั้งระดับความเข้มข้นฮอร์โมน P4 เพิ่มขึ้นในช่วงระยะหลังการตกไข่ซึ่งส่งผลดีต่อความสมบูรณ์พันธุ์ในโคนม (Wiltbank and Pursley, 2014)

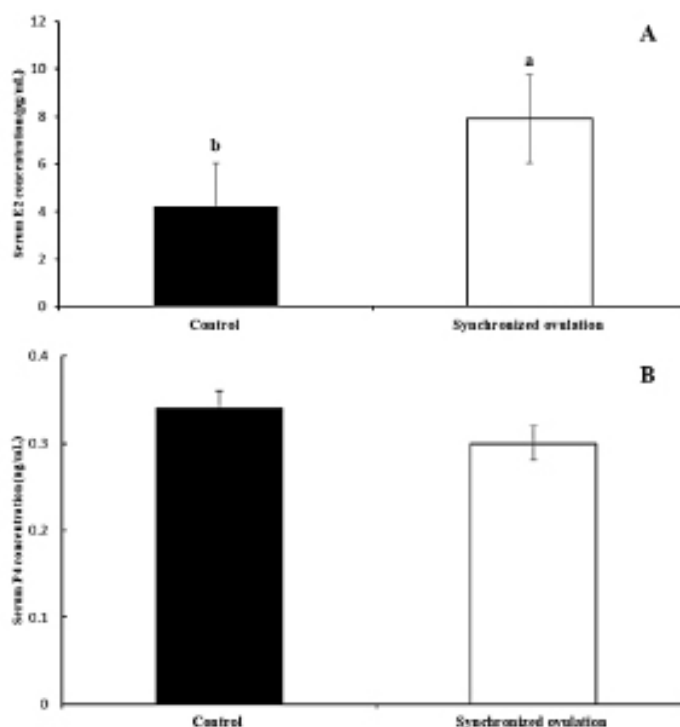


Figure 2 Mean ($\pm$ SEM) serum E2 (A) and P4 (B) concentrations of receiving control (n=4; open bars) and synchronized ovulation lactating dairy cows (n=4; solid bars)

สรุป

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าโคนมที่ได้รับ การเหนี่ยวนำการตกไข่โดยวิธี Double Ovsynch ส่งผลให้จำนวนและขนาดฟอลลิเคิลเพิ่มขึ้น รวมทั้ง

ระดับความเข้มข้นฮอร์โมนสเตียรอยด์(E2) สูงขึ้นซึ่ง จะส่งผลดีต่อศักยภาพการตกไข่และคุณภาพโอโอไซต์ เนื่องจากฟอลลิเคิลมีลักษณะเป็นฟอลลิเคิลที่สมบูรณ์ และมีระดับความเข้มข้นฮอร์โมน E2 สูง

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนการศึกษาโครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) ระดับปริญญาโท สัญญาทุนเลขที่ MSD61I0010 สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย (สกว.) และ สหกรณ์โคนมขอนแก่น จำกัด และขอขอบคุณภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่เชื้อเพื่อสัตว์ทดลองและสถานที่ทำงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Ayres, H., R.M. Ferreira, A.P. Cunha, R.R. Araújo ,and M.C. Wiltbank. 2013. Double-Ovsynch in high-producing dairy cows: Effects on progesterone concentrations and ovulation to GnRH treatments. *Theriogenology*. 79: 159-164.
- Crane, M.B, J. Bartolome, Melendez, A. de Vries, C. Risco, and L.F. Archbald. 2006. Comparison of synchronization of ovulation with timed insemination and exogenous progesterone as therapeutic strategies for ovarian cysts in lactating dairy cows. *Theriogenology*. 65: 1563-1574.
- Dirandeh, E., A. Rezaei Roodbari, and M.G. Colazo. 2014. Double Ovsynch, compared with presynch with or without GnRH, improves fertility in heat-stressed lactating dairy cows. *Theriogenology*. 83: 438-443.
- Ginther, O.J., M. A. Beg, F.X. Donadeu, and D.R. Bergfelt. 2003. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Anim. Reprod. Sci.* 78: 239-257.
- Navanukraw, C., D.A. Redmer, L.P. Reynolds, J.D. Kirsch, A.T. Grazul-Bilska, and P.M. Fricke. 2004. A modified presynchronization protocol improves fertility to timed artificial insemination in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87: 1551-1557.
- Santos, J.E.P., C.D. Narciso, F. Rivera, W.W. Thatcher ,and R.C. Chebel. 2010. Effect of reducing the period of follicle dominance in a timed AI protocol on reproduction of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93: 2976-2988.
- Shabankareh, H.K., F.Kafilzadeh,V.Piri, and H. Mohammadi.2013. Effects of feeding dry glycerol to primiparous Holstein dairy cows on follicular development, reproductive performance and metabolic parameters related to fertilityduring the early post-partum period. *Reprod.Domest. Anim.* 48: 945-953.
- Steel, R. G. D., J. H. Torrie, and D. A. Dickey. 1997. Principles and procedures of statistics a biometrical approach. 666 p.
- Walsh, S.W., E.J. Williams, and A.D.O. Evans. 2011. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 123: 127-138.
- Wiltbank, M. C., and J. R. Pursley. 2014. The cow as an induced ovulator: Timed AI after synchronization of ovulation. *Theriogenology*. 81: 170-185.