การเหนี่ยวนำการพัฒนาการของฟอลลิเคิลและการตกไข่ในแกะเพศเมียลูกผสมโดยใช้ flugestone acetate ร่วมกับ Follicle Stimulating Hormone (FSH)

Induction of Multiple Follicular Development and Ovulation in Cross-Bred Ewes using Flugestone Acetate and Follicle Stimulating Hormone (FSH)

ไชยณรงค์ นาวานุเคราะห์[1] อัครพล บุญโสม[1] สมจิตร์ กันธาพรม[2] และไกรจักร แก้วพรม[3]

Chainarong Navanukraw[1], Akarapol Boonsoam[1], Somjit Guntaprom[2], and Kraijak Kaewprom[3]

Abstract

The objectives of this study were to induce multiple follicular growths and determine timing of ovulation in ewes treated with flugestone acetate and FSH. Cross-bred non pregnant ewes (n=8; 10 months of age) were intravaginaly inserted with flugestone acetate for 14 days and were intramuacularly injected with FSH twice daily for 3 days, starting on day 12 after flugestone acetate insertion. Ewes underwent laparotomy at 48 and 72 h after flugestone acetate removal (day 0) to count corpora hemorrhagica (CH) and at 192 h to count corpora lutea (CL). Blood samples were taken to determine plasma progesterone (P4) concentrations on day 0, 2, 3 and 8. Ovulation rates (numbers of CH expressed as a percentage of the total number of CL) increased ($P < 0.01$) from 37.0 % at 48 h, to 56.5 % at 72 h. Plasma P4 concentrations were high on day 0, and remained high on day 2, but increased ($P < 0.05$) on day 3 and greatest to 4.09 ng/ml on day 8, after formation of the mature CL. These results indicate that synchronization with flugestone acetate and FSH can be an effective protocol in ewes to induce multiple follicular development and ovulation in order to achieve successful embryo transfer programs or the development of reproductive technologies in farm animal species.

Keywords : Flugestone acetate, follicular development, FSH, sheep, ovulation

---

[1] ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

[2] คณะวิชาสัตวศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน จังหวัดกาฬสินธุ์ 46000

[3] คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม 44000

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาการเหนี่ยวนำการพัฒนาการของฟอลลิเคิลและการตกไข่ในแกะเพศเมียลูกผสมโดยใช้ flugestone acetate ร่วมกับ follicle stimulating hormone (FSH) โดยทำการทดลองในแกะเพศเมียลูกผสมที่ยังไม่ได้รับการผสมพันธุ์หรือตั้งท้องเป็นสัตว์ทดลอง (จำนวน 8 ตัว อายุเฉลี่ย 10 เดือน) ทำการสอด flugestone acetate ในช่องอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียเป็นเวลา 14 วัน และทำการฉีดฮอร์โมน FSH วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 3 วัน เริ่มต้นในวันที่ 12 ภายหลังการสอด flugestone acetate จากนั้นทำการนับจำนวน corpora hemorrhagica (CH) ที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ภายหลังจากการถอน flugestone acetate (วันที่ 0) และนับจำนวน corpora lutea (CL) ที่ เวลา 192 ชั่วโมง โดยวิธี laparotomy และทำการเก็บตัวอย่างเลือดในวันที่ 0, 2 , 3 และ 8 เพื่อนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโปรเจสเทอโรน (P4) ผลการทดลอง พบว่า อัตราการตกไข่ (คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของสัดส่วนระหว่างจำนวน CH กับจำนวน CL ทั้งหมด) เพิ่มขึ้น ($P < 0.01$) จาก 37.0 % ที่เวลา 48 ชั่วโมงเป็น 60.4 % ที่เวลา 72 ชั่วโมง ระดับความเข้มข้นของ P4 สูงในวันที่ 0 และเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย ในวันที่ 2 แต่จะเพิ่มสูงขึ้น ($P < 0.05$) ในวันที่ 3 และสูงสุด ($P < 0.05$) ในวันที่ 8 (4.09 ng/ml) ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าการใช้ flugestone acetate ร่วมกับ FSH ตามโปรแกรมข้างต้นสามารถเหนี่ยวนำการพัฒนาการของฟอลลิเคิลและการตกไข่ในแกะเพศเมีย ซึ่งน่าจะเป็นวิธีการที่จะใช้เพื่อนำไปสู่ความสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนของสัตว์เศรษฐกิจต่อไป

คำสำคัญ : การพัฒนาการของฟอลลิเคิล การตกไข่ แกะ flugestone acetate FSH

บทนำ

ถึงแม้ว่าจำนวนประชากรแกะของโลกจะมีแนวโน้มลดลงเนื่องจากต้นทุนการผลิตเพิ่มสูงขึ้น (FAO, 2006) แต่จากการพัฒนาการของเทคโนโลยีการสืบพันธุ์ขั้นสูงโดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตและการย้ายฝากตัวอ่อนได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมการผลิตแกะอย่างกว้างขวาง (Gordon, 1997) ในการที่จะผลิตตัวอ่อนจำนวนมากสำหรับการย้ายฝากตัวอ่อน จำเป็นจะต้องทำการเหนี่ยวนำการพัฒนาการของฟอลลิเคิลหรือการกระตุ้นการตกไข่ก่อน ความสามารถในการบ่งบอกเวลาของการตกไข่ได้อย่างแม่นยำ จึงเป็นสิ่งสำคัญต่อการพัฒนาการผสมเทียม การปฏิสนธิในห้องปฏิบัติการ การย้ายฝากตัวอ่อน การโคลนนิ่ง หรือการพัฒนาเทคโนโลยีการสืบพันธุ์ขั้นสูงต่อไป ถึงแม้ว่าแกะเพศเมียเป็นสัตว์ที่มีลักษณะทางชีววิทยาการสืบพันธุ์คล้ายคลึงกับมนุษย์มากที่สุด และสามารถใช้เป็นแบบจำลอง (model) ของการศึกษาในมนุษย์ได้ดี (Senger, 1997; Redmer et al., 2004) อย่างไรก็ตามการตอบสนองต่อฮอร์โมนในการกระตุ้นการตกไข่มีความแปรปรวนสูง (Gordon, 1997) ดังนั้นปัจจัยดังกล่าวจึงเป็นข้อจำกัดสำคัญในการผลิตตัวอ่อนในห้องปฏิบัติการและการพัฒนาการย้ายฝากตัวอ่อน (Cognie, 1999).

การทดสอบวิธีการในการกระตุ้นการตกไข่ในแกะมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางในระหว่างปี ค.ศ. 1985-2000 แต่มีการศึกษาน้อยมากในเรื่องเวลาของการตกไข่ภายหลังจากการเหนี่ยวนำการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิล (Walker et al., 1986; Joyce et al., 1998) ชนิดของฮอร์โมนที่นำมาศึกษา ได้แก่ GnRH, Syncro-Mate-B (SMB; norgestomet), PMSG และ/หรือ FSH ส่วนในประเทศไทยยังไม่มีรายงานใดๆ เกี่ยวกับการศึกษาการตอบสนองของการเหนี่ยวนำการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลและการกระตุ้นการตกไข่ในสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดเล็ก (small ruminants) ดังนั้น

วัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัยครั้งนี้เพื่อทดสอบการตอบสนองต่อการใช้ฮอร์โมนและประเมินเวลาของการตกไข่ในแกะลูกผสมที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย flugestone acetate ร่วมกับ follicle stimulating hormone (FSH)

อุปกรณ์และวิธีการ

ใช้แกะลูกผสมระหว่างพันธุ์ Rambouillet กับพันธุ์พื้นเมือง จำนวน 8 ตัว อายุเฉลี่ย 10 เดือน ซึ่งยังไม่ผ่านการผสมพันธุ์ มาทำการสอดฮอร์โมน flugestone acetate ซึ่งเป็นโปรเจสเทอโรนสังเคราะห์ (Chrono-gest ®, Intervet, UK) ในรูปฟองน้ำ (sponge) ซึ่งแต่ละอันบรรจุ flugestone acetate ขนาด 30 มิลลิกรัม เข้าทางอวัยวะเพศ (intravaginal insertion) เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นแกะทุกตัวจะถูกฉีดด้วยฮอร์โมน FSH (FSH-P, Sioux Biochemical, USA) เข้ากล้ามเนื้อวันละ 2 ครั้ง (เริ่มต้นในวันที่ 12 ภายหลังการสอด flugestone acetate) เป็นเวลา 3 วันติดต่อกันดังนี้ คือ วันที่ 1 ฉีด FSH 5 units; วันที่ 2 ฉีด FSH 4 units และวันที่ 3 ฉีด FSH 3 units วันที่ทำการถอน flugestone acetate ออกจากตัวสัตว์กำหนดให้เป็นวันที่ 0 (Day 0)

ทำการผ่าตัดเปิดช่องท้อง (laparotomy) ตามวิธีการของ Jarrell and Dziuk (1991)ที่เวลา 48, 72 และ 196 ชั่วโมง ภายหลังการถอน flugestone acetate และนับจำนวนของ corpora hemorrhagica (CH) และ corpora lutea (CL) ที่ปรากฏอยู่บนรังไข่ เพื่อนำไปคำนวณหาอัตราการตกไข่ ดังนี้ คือ จำนวน CH ที่ปรากฏแต่ละเวลาต่อจำนวนของ CL ที่ปรากฏเมื่อเวลา 196 ชั่วโมง ตามวิธีการของ Stenbak et al., (2003) โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้ สัตว์ทดลองจะถูกฉีดยาสลบ 2 ชนิด คือ Xylazine hydrochloride (Rompun) ในปริมาณ 0.075 มล. และ Ketamine hydrochloride (Ketaset) ในปริมาณ 1.0 มล. จากนั้นทำการเปิดช่องท้อง (abdomen) ให้มีความยาวประมาณ 3.5 นิ้ว เพื่อตรวจหารังไข่และทำการนับจำนวนของ CH และ CL ในแต่ละช่วงเวลา เมื่อนับจำนวนของ CH และ CL เสร็จแล้ว ปิดปากแผลทันทีโดยการเย็บปิดหน้าท้องและฉีดยาปฏิชีวนะชนิด Penstrep 5 มล. เพื่อป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรีย

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากเส้นเลือดดำที่คอ (jugular vein) ของแกะทุกตัว ในวันที่ 0 (ก่อนทำการถอน flugestone acetate), วันที่ 2 (48 ชั่วโมง), วันที่ 3 (72 ชั่วโมง) และวันที่ 8 (196 ชั่วโมง) เพื่อนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ P4 โดยวิธี Immunoassay ตามวิธีการของ Munro and Stabenfeldt, 1984. โดยใช้ P4 enzyme immunoassay kit (Assay Design, MI, USA)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของอัตราการตกไข่ทำได้โดยวิธี Mantel-Haenszel Chi-Square ส่วนข้อมูลต่อเนื่อง ได้แก่ จำนวน CH, CL และ ความเข้มข้นของ P4 ทำได้โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนตามวิธีการ GLM procedure (SAS, 2001).

ผลการทดลอง

จากการทดลองพบว่าจำนวน CH และ CL ของแกะแต่ละตัวในแต่ละระยะเวลามีความแปรผันสูง (Table 1) จำนวน CH ตั้งแต่ 1-10 และ 2-12 ในวันที่ 2 (48 ชม.) และวันที่ 3 (72 ชม.) ตามลำดับ ในขณะที่พบจำนวน CL ตั้งแต่ 7-20 ในวันที่ 8 (192 ชม.) เมื่อพิจารณาถึงค่าเฉลี่ยของจำนวน CH, CL และอัตราการตกไข่ที่ระยะเวลาต่างๆ พบว่า จำนวน CH, CL และอัตราการตกไข่ ณ เวลา ต่างๆ กันมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$) ได้แก่ จำนวน CH หรือ CL เพิ่มขึ้นจาก 5.0 เป็น 7.6 และ 13.5 ในวันที่ 2, 3, และ 8 ตามลำดับ ในขณะที่อัตราการตกไข่เพิ่มสูงขึ้น ($P < 0.05$) จาก 37.0 เป็น 56.5 % ภายในเวลา 24 ชั่วโมง (จาก 48 ถึง 72 ชม.) เมื่อพิจารณาถึงความเข้มข้นของฮอร์โมน P4 ในพลาสมา (Fig. 1) พบว่า ความเข้มข้นของฮอร์โมน P4 มีค่าเฉลี่ยในระดับสูง (1.58 ng/ml) ในวันที่ 0 และไม่เปลี่ยนแปลง (1.41 ng/ml) ในวันที่ 2 แต่จะเพิ่มสูงขึ้น ($P < 0.05$) ในวันที่ 3 (1.97 ng/ml) และสูงสุด ($P < 0.05$) ในวันที่ 8 (4.09 ng/ml) ซึ่งเป็นวันที่ CL มีความสมบูรณ์เต็มที่ (mature CL)

Table 1 Number of CH, CL and percentage of ovulation at several observation times after induced by flugestone acetate และ FSH

Ewe no.	Time after flugestone acetate removal		
	No. of CH Day 2 (48 h)	No. of CH Day 3 (72 h)	No. of CH Day 8 (192 h)
1	1	2	12
2	1	8	8
3	4	6	7
4	5	5	9
5	8	10	13
6	5	9	19
7	10	12	20
8	6	9	20
Average	5.0 ± 1.1^{b}	7.6 ± 1.1^{c}	13.5 ± 1.9^{d}
Ovulation rate[a] (%)	37.0^{e}	56.5^{f}	100.0^{g}

[a] Calculated by expressing the number of CH observed at laparotomy as a percentage of the number of CL observed on day 8.

[bcd] Means ± S.E.M. differ within row, $P < 0.05$

[efg] Percentage of ovulation differ within row, $P < 0.05$ (Chi-square test)

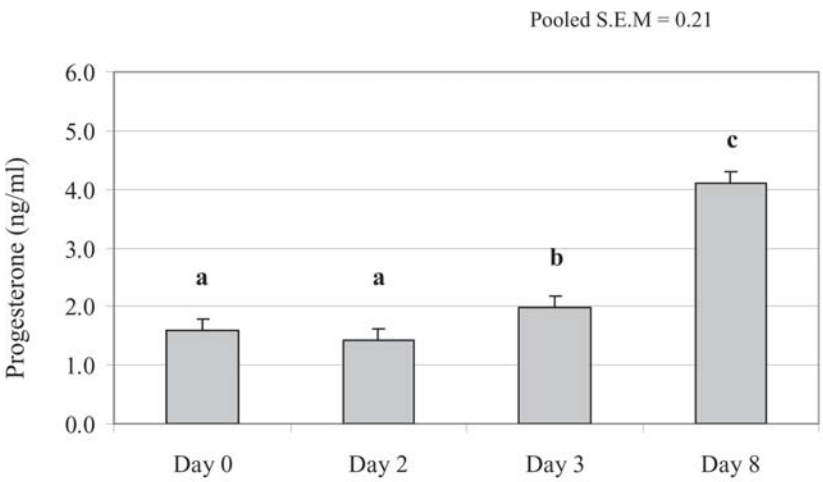

Fig. 1 Concentration of plasma P4 on days 0, 2-3, and 8 (day 0; day of flugestone acetate removal) in ewes treated with FSH for 3 days and evaluated for time of ovulation

วิจารณ์ผลการทดลอง

การใช้ฮอร์โมน 2 ชนิดร่วมกันในการเหนี่ยวนำการพัฒนาการของฟอลลิเคิลและการตกไข่ในแกะทั้ง 8 ตัว พบว่า ส่วนใหญ่ (56.5 %) จะมีการตกไข่ภายในเวลา 72 ชม. ภายหลังการถอนฮอร์โมน ส่วนที่เหลือประมาณ 43.5 % จะมีการตกไข่หลังจาก 72 ชม. ซึ่งไม่สามารถบ่งบอกได้แน่ชัดว่าการตกไข่เกิดขึ้น ณ เวลาใด ซึ่งคล้ายคลึงกับรายงานของ Walker et al., (1986) พบว่าการใช้ FSH หรือ PMSG ร่วมกับ GnRH หรือไม่ใช้ GnRH ในการเหนี่ยวนำแกะพันธุ์เมอรอโน (Merino breed) ให้ตกไข่หลายใบ (multiple ovulations) ได้ผลที่แน่นอน คือ 79 % มีการตกไข่ภายใน 54-66 ชม. ในแกะ ส่วน Stenbak et al., (2003) รายงานว่าการใช้โปรเจสเทอโรนสังเคราะห์ (SMB; norgestomet) เป็นเวลา 14 วัน ร่วมกับ FSH ส่วนใหญ่จะมีการตกไข่เกิดขึ้นภายใน 36-48 ชม. ดังนั้นเมื่อรวบรวมข้อมูลของต่างประเทศและจากผลการศึกษาครั้งนี้เข้าด้วยกัน พบว่าวิธีการใช้โปรเจสเทอโรนสังเคราะห์ร่วมกับ FSH ส่วนใหญ่จะมีการตกไข่เกิดขึ้นระหว่าง 36-72 ชม. ภายหลังการถอนฮอร์โมนออกจากร่างกาย ค่าเฉลี่ยของจำนวน CL ในวันที่ 8 ของการทดลอง คือ 13.5 $\pm$ 1.9 เป็นผลจากการใช้ FSH ติดต่อกันเป็นเวลา 3 วัน แบบลดความเข้มข้นลงในแต่ละวัน (decreasing dose) ซึ่งพบว่าแกะทุกตัวในการทดลองนี้มีการตอบสนองต่อ FSH โดยพิจารณาจากจำนวน CL ที่ปรากฏ ณ วันที่ 8 (ถ้าหากจำนวนCL มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 4 แสดงว่า สัตว์มีการตอบสนองต่อการใช้ฮอร์โมน FSH และ หากจำนวน CL น้อยกว่า 4 แสดงว่าสัตว์ไม่มีการตอบสนองต่อการใช้ฮอร์โมน FSH; Stenbak et al., 2003) อย่างไรก็ตามการตอบสนองต่อการใช้ฮอร์โมน FSH ยังขึ้นอยู่กับชนิดและบริษัทที่ผลิต รวมทั้งปัจจัยอื่นๆ เช่น พันธุ์ อาหาร และการจัดการต่างๆ (Cognie, 1999) สำหรับการศึกษาครั้งนี้ใช้ฮอร์โมน FSH-P (Sioux Biochemical, SD, USA) ซึ่งมีส่วนผสมของฮอร์โมน LH ประมาณ 10 %

ระดับความเข้มข้นของ P4 ในพลาสมาของแกะ ณ วันที่ 0 ซึ่งวัดก่อนทำการถอน flugestone acetate อยู่ในระดับสูง (หมายถึง ความเข้มข้นของ P4 มากกว่า 1 ng/ml ตามคำอธิบายของ Munro and Stabenfeldt, 1984) แสดงให้เห็นว่าการสอด flugestone acetate ทำให้ระดับ P4 มีสูงในระบบหมุนเวียนโลหิตและมีผลต่อการยับยั้ง (negative feedback) การหลั่งฮอร์โมนโกนาโดโทรพินส์ (gonadotropin hormone) จากต่อมใต้สมอง ทำให้สัตว์ทดลองไม่แสดงอาการเป็นสัด เมื่อทำการถอน flugestone acetate ระดับ P4 จะลดลง ส่งผลต่อการทำงานของฮอร์โมนโกนาโดโทรพินส์ สัตว์จะแสดงอาการสัดและตกไข่ตามมา (Senger, 1997; Bister et al., 1999) จากการทดลองครั้งนี้ พบว่าในวันที่ 2 ระดับของ P4 ไม่เปลี่ยนแปลงซึ่งขัดแย้งกับทฤษฎี ทั้งนี้อาจมีสาเหตุจากแกะตัวที่ 1 และ 2 ส่วนใหญ่มีการตกไข่เกิดขึ้นหลังจาก 48 ชม. จึงส่งผลให้ระดับของ P4 ยังไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก ภายหลังจากการตกไข่ โครงสร้างของฟอลลิเคิลที่แตกออกหรือตกไข่จะเกิดการเปลี่ยนแปลงการพัฒนาของ luteal cells หรือที่เรียกว่า luteinization ได้โครงสร้างที่เรียกว่า CH และ CL ตามลำดับ โครงสร้างดังกล่าวมีหน้าที่ในการสังเคราะห์ P4 เพื่อคงสภาพการตั้งท้อง ในแกะ CL จะมีการเจริญเติบโตเต็มที่ (mature CL) ในวันที่ 8-10 ของวงรอบการเป็นสัด (วงรอบการเป็นสัดของแกะเฉลี่ย 16.5 วัน) หากสัตว์ไม่ได้รับการผสมพันธุ์หรือตั้งท้อง CL จะเสื่อมสลายไป (luteolysis) ระดับ P4 จะลดต่ำลง และเริ่มต้นวงรอบการเป็นสัดอีกครั้งหนึ่ง ดังนั้นการใช้โปรเจสเทอโรนสังเคราะห์จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อควบคุมหรือเหนี่ยวนำให้สัตว์แสดงอาการเป็นสัด ภายหลังการถอนฮอร์โมนออกจากร่างกายสัตว์

การใช้ฮอร์โมน flugestone acetate (Chronogest ®) ในรูปฟองน้ำ ซึ่งแต่ละอันบรรจุ flugestone acetate ขนาด 30-40 มิลลิกรัมสอดเข้าทางอวัยวะเพศ (intravaginal insertion) เป็นเวลา 14 วันเป็นวิธีการที่สะดวกและง่าย (Billings and Katz, 1999) เพราะไม่จำเป็นต้องทำการฝังฮอร์โมน (implant) และไม่ทำให้สัตว์เครียดจากความเจ็บปวด ซึ่งสอดคล้องกับหลักการของสวัสดิภาพสัตว์ (animal welfare) อย่างไรก็ตามก่อนการสอดผู้ใช้จำเป็นต้องจุ่มหรือเคลือบฟองน้ำด้วย

สารฆ่าเชื้อ (disinfectant) เพื่อป้องกันการติดเชื้อ และควรทำการสอดใส่อย่างนุ่มนวล เพื่อป้องกันการเกิดบาดแผลบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ (Nelis, 1997)

สรุป

การเหนี่ยวนำการพัฒนาการของฟอลลิเคิลและการตกไข่ในแกะเพศเมียลูกผสมโดยใช้ flugestone acetate ร่วมกับ FSH เป็นวิธีการหนึ่งที่มีประสิทธิภาพ โดยสามารถกำหนดหรือควบคุมเวลาในการตกไข่ของสัตว์ส่วนใหญ่ได้ (จากการทดลองนี้มากกว่า 50 % มีการตกไข่ภายใน 72 ชม.) จึงเหมาะกับการนำไปใช้ประโยชน์กับการผสมเทียม การเก็บรวบรวมเซลสืบพันธุ์เพศเมีย การผลิตและการย้ายฝากตัวอ่อน รวมทั้งการพัฒนาเทคโนโลยีการสืบพันธุ์ขั้นสูงของสัตว์เศรษฐกิจต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Billings, H.J. and L.S. Katz. 1999. Facilitation of sexual behavior in French-Alpine goats treated with intravaginal progesterone releasing devices and estradiol in both the breeding and nonbreeding seasons. J. Anim. Sci. 77: 2073-2078.

Bister, J.L., B. Noeal, B. Perrad, S.N. Mandiki, J. Mbayahaka, and R. Paquay. 1999. Control of ovarian follicles activity in the ewe. Dom. Anim. Endocrinol. 17:315-328.

Cognie, Y. 1999. State of the art in sheep-goat embryo transfer. Theriogenolgy. 51:105-116.

FAO. 2006. Livestock report. The animal production and health division of FAO.

Gordon, I. 1997. Controlled reproduction in sheep and goats. CAB International, New York.

Jarrell, V.L. and P.J. Dziuk. 1991. Effect of number of corpora lutea and fetuses on concentrations of progesterone in blood of goats. J. Anim. Sci. 69: 770-773.

Joyce, I.M., M. Khalid, and W. Haresign. 1998. Growth hormone priming as an adjunct treatment in superovulatory protocols in the ewe alters follicle development but has no effect on ovulation rate. Theriogenolgy. 50:873-874.

Munro, C. and G. Stabenfeldt. 1984. Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. J. Endocrinol. 101:41-49.

Nelis, P.C. 1997. Compendium of animal reproduction. 4th Edition. Intervet International B.V.

Redmer, D.A., J.M. Wallace, and L.P. Reynolds. 2004. Effect of nutrient intake on fetal and placental growth and vascular development. Dom. Anim. Endocrinol. 27: 199-217.

SAS. 2001. SAS Institute, Inc., SAS System (Release 8.2), Cary, NC. 2001.

Senger, P.L. 1997. Pathways to pregnancy and parturition. 1st Edition. Current Conceptions, Inc. Pullman, WA.

Stenbak, T.K., A.T. Grazul-Bilska, H.R. Berginski, J.J Bilski, J.D. Kirsch , K.C. Kraft, C.Navanukraw, M.J. Toutges, L.P. Reynolds, and D.A. Redmer. 2003. Ovulation rate in ewes synchronized with Syncro-Mate-B (SMB) and follicle stimulating hormone. Small Ruminant Research 48: 1-8.

Walker, S.K., Smith, D.H., and R.F. Seamark. 1986. Timing of multiple ovulations in the ewe after treatment with FSH or PMSG with and without GnRH. J. Reprod. Fertil. 77: 135-142.