

萨福克羔羊卵泡诱导发育效果的研究

汪立芹¹ 何宗霖² 林嘉鹏¹ 吴阳升¹ 黄俊成^{1*}

(1. 新疆畜牧科学院 农业部草食家畜繁育生物技术重点开放实验室, 乌鲁木齐 830000;

2. 阿克苏地区动物疫病控制诊断中心, 新疆 阿克苏 843000)

摘要 为稳定并提高萨福克羔羊卵泡发育效率,通过肌肉注射FSH和PMSG的方法,对可能影响萨福克羔羊激素诱导效果如羔羊日龄、体重、健康状况和季节等因素进行研究。结果显示:1)5~6周龄萨福克羔羊经激素处理后的平均卵泡数(114.18 vs 22.17)、回收的卵母细胞数(82.54 vs 12.83)以及可用卵母细胞数(72.79 vs 10.83)极显著高于8~9周龄组($P < 0.01$);2)体重在8~18 kg之间的5~6周龄羔羊,不影响处理效果($P > 0.05$);3)有疾病史的羔羊处理效果显著低于健康羔羊组($P < 0.01$);4)春、秋季节对羔羊卵泡发育及回收的卵母细胞数没有影响($P > 0.05$),但春季羔羊卵母细胞体外受精卵裂率(54.31% vs 73.93%)和囊胚率(21.34% vs 35.73%)显著低于秋季($P < 0.05$);5)秋季羔羊胚胎移植受胎率(51.33% vs 26.07%)显著高于春季($P < 0.05$);6)移植早期胚胎或囊胚期胚胎对受胎率没有影响($P > 0.05$)。选择5~6周龄、体重在8~18 kg之间、无疾病史的萨福克羔羊,能显著提高卵泡发育效率;秋季羔羊卵母细胞发育能力显著高于春季;相同季节内,移植早期胚胎或囊胚期胚胎受胎率间没有差异。

关键词 外源激素;萨福克羔羊;卵母细胞;体外受精;胚胎移植

中图分类号 S 8

文章编号 1007-4333(2015)04-0141-06

文献标志码 A

Study on the induced development effect of Suffolk lamb follicular

WANG Li-qin¹, HE Zong-lin², LIN Jia-peng¹, WU Yang-sheng¹, HUANG Jun-cheng^{1*}

(1. Key Laboratory of Grass Livestock Reproduction & Breed Biotechnology Ministry of Agriculture,

Animal Science Academy of Xinjiang, Urumqi 830000, China;

2. Akesu Animal Disease Control Diagnosis Center, Akesu 843000, China)

Abstract In order to stabilize and improve the lamb oocytes in vitro production efficiency, the influence of lamb age, weight, health status, season and other factors on Suffolk lamb hormone was studied. The results showed that: 1) The average number of follicles of the 5-6 weeks aged Suffolk lambs was significantly higher than those of 8-9 weeks aged group ($P < 0.01$) after treated by hormone (114.18 vs 22.17), oocytes recovered (82.54 vs 12.83) and usable oocytes (72.79 vs 10.83); 2) There is no significant effect for those lambs weighed between 8-18 kg ($P > 0.05$); 3) The effects were significantly lower in those lambs with a history of disease than those healthy lambs ($P < 0.01$); 4) There is no significant season effect (Spring vs. autumn) on lamb follicular development and oocyte recovery ($P > 0.05$). However, the cleavage rate (54.31% vs 73.93%) and blastocyst rate (21.34% vs 35.73%) in the spring was significantly lower than in autumn ($P < 0.05$); 5) Autumn lamb embryo transfer pregnancy rate was significantly higher than that in spring (51.33% vs 26.07%, $P < 0.05$). 6) The transplantation of 2-8 cells or blastocyst had no effect on pregnancy rate ($P > 0.05$). Conclusion: The Suffolk lambs aged 5-6 weeks, weighed 8-18 kg, with no history disease, can significantly improve the efficiency of follicular development. Autumn lamb developmental capacity of oocytes was significantly higher than that in spring. In the same season, there was no difference between the transplanted embryonic or blastocyst stage embryo conception rate.

Key words exogenous hormones; Suffolk lamb; oocytes; in vitro fertilization; embryo transfer

收稿日期: 2014-11-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(U1203381); 新疆自治区科技计划项目(201111113); 新疆自治区科技支疆项目(201291147); 国家转基因重大专项(2014ZX08008-003); 山西省生态站项目

第一作者: 汪立芹, 副研究员, 主要从事动物胚胎生物技术研究, E-mail: wlq6304@126.com

通讯作者: 黄俊成, 研究员, 博士生导师, 主要从事家畜繁殖与胚胎生物技术研究, E-mail: h_jc@sina.com

体外胚胎生产技术的效率,与卵母细胞来源和质量密切相关^[1-3],屠宰场采集的卵母细胞由于品种、健康状况等因素都不明确,无法用于体外胚胎生产。而成年羊的活体采卵技术,因对供体羊伤害大,效率低,也无法用于生产实践,但利用羔羊作为供体,可以避免以上的不足。因幼龄动物体外胚胎生产及移植技术(Juvenile *in vitro* embryo transfer, JIVET)能提供高于成年羊数以10倍的卵母细胞,极大地缩短了时代间隔,因而可应用于转基因、核移植等生物技术和动物新品种的培育^[4]。目前,已有诱导牛^[5-6]、山羊^[7-8]和绵羊^[9-13]等品种幼龄阶段卵泡发育的研究,而在绵羊的研究中,以Kelly等^[10-12]的研究最为详细,其研究了EGF、IGF-1等生长因子对羔羊卵母细胞体外发育的影响,在对美利奴羔羊的研究中,1只4~8周龄的羔羊最多获得了13.9只后代的效果。Gou等^[13]研究了季节对细毛羊羔羊诱导效果的影响,发现秋季效果好于春季和冬季。虽然细毛羊羔羊卵泡发育效果较好,但对萨福克羔羊的研究较少,而萨福克属于肉用绵羊,其激素诱导方案是否与细毛羊一致,还没有定论。本研究以此为切入点,研究可能影响萨福克羔羊卵泡诱导的因素,以期获得稳定的萨福克羔羊选择标准,以及季节对卵泡发育和卵母细胞发育的影响,旨在为萨福克羔羊体外胚胎规模化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 羔羊的选择及试验设计

本试验在阿克苏地区天山肉用种羊有限责任公司养殖基地进行。试验1:根据羔羊体况和精神状态,随机选择45只萨福克羔羊,根据出生日龄,将试验组设为5~6和8~9周龄组。试验2:将试验1中所用的5~6周龄共39只萨福克羔羊,根据体重将其分为8~10、11~12和13~18 kg 3组;试验3:随机选择采食、精神状态等正常,无病状表现的出生年龄、体重等较为接近的53只萨福克羔羊用作供体,将其中部分羊曾因病注射过抗生素的设为亚健康组,其余羔羊无疾病史,设为健康组。试验4:在春、秋季,随机选择5~9周龄、初生重相近、精神状态良好的萨福克羔羊83只进行激素诱导,将2个季节的羔羊卵泡发育效果进行统计,以分析季节对激素诱导效果和卵母细胞质量是否存在差异。试验5:分别将试验4中春、秋季获得的羔羊早期胚胎进行移植,以研究季节对羔羊胚胎移植效果是否有影响。

1.2 羔羊的处理

本试验使用的垂体促卵泡素(FSH)为加拿大BIONICHE公司生产的FOLLTROPIN-V,孕马血清(PMSG)为宁波三生激素有限公司生产。按照试验设计,随机选择羔羊,每只羔羊使用FSH剂量为160 IU以等剂量的方式每日早晚间隔12 h各注射1次,共注射4次,在第1次注射FSH的同时,注射500 IU PMSG,禁食禁饮,羔羊手术采卵前称量羔羊体重。

1.3 受体羊的选择及处理

选择健康、无明显繁殖疾病的经产本地母羊用作受体。受体羊进行同期发情处理:埋植海绵栓12 d,在打第4针时撤栓,同时注射333 IU/只的PMSG,撤栓后36~48 h各试情1次,发情的羊用作受体。

1.4 卵母细胞的回收及评定

将饥饿12 h的羔羊保定在手术架上,腹部刮毛,用清水擦洗后,碘酒棉球转圈消毒,用75%酒精脱碘,在腹中线左侧或右侧,避开血管,手术切开两指长的小口,将单侧卵巢暴露于体外,用经盐水湿润的灭菌纱布将卵巢包裹,用吸有抽卵液的带8号针头的10 mL注射器,从卵巢底部开始逐渐向上抽吸卵巢表面的卵泡,将回收的卵泡液入至60 mm培养皿,在体视显微镜下检出所有卵母细胞,集中在不含肝素钠的抽卵液洗盘内,选择可用卵母细胞用作体外培养。

抽卵液为:TCM199-Hepes(Sigma)+2%FBS(Sigma)+0.027 mg/mL肝素钠(Sigma)。

根据卵母细胞-卵丘细胞复合体中卵丘细胞的多少、包裹的紧密程度及卵母细胞胞质均匀度来选择卵母细胞。将包裹3层以上颗粒细胞、胞质均匀的卵母细胞定为可用卵母细胞。

1.5 卵母细胞体外成熟培养

提前2 h,在CO₂含量体积分数为5%、温度为38.6℃的二氧化碳培养箱内平衡成熟培养液。将可用卵母细胞用不含肝素钠的抽卵液洗涤2遍,成熟培养液洗涤3遍后,按40~60枚/孔的密度放入平衡好的四孔板内培养。

体外成熟培养液为:TCM199-HCO₃+10%FBS(GIBCO)+0.05 IU/mL FSH+0.05 IU/mL LH+1 μg/mL estradiol+24.2 μg/mL 丙酮酸钠+60 μg/mL 谷氨酰胺+0.1 mmol/L 半胱氨酸+10 ng/mL EGF+0.1 mg/mL 双抗(北京鼎国)。

1.6 卵母细胞体外受精

将体外成熟培养 22~24 h 的羔羊卵母细胞取出,在 0.1% 透明质酸酶内反复吹吸,脱去部分卵丘细胞,放入平衡好的装有体外受精液的四孔板内。采集新鲜精液,取 100~200 μL 鲜精置于上游液圆底试管底部,精子上游 30~40 min,取上清,以 1 500 r/min 的转速离心 4 min,弃去上清,再用受精液离心洗涤一次,将底部少许精子浓缩液轻轻混匀,按 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 的密度加入放有卵母细胞的四孔板内,精卵共孵育。受精液为 SOF + 20% SS (自制发情羊血清) + 0.027 mg/mL 肝素钠,其中 SOF 为 6.29 mg/mL NaCl + 0.534 mg/mL KCl + 0.162 mg/mL KH_2PO_4 + 0.6 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 乳酸钠 + 0.089 mg/mL MgSO_4 + 2.1 mg/mL NaHCO_3 + 0.035 7 mg/mL 丙酮酸钠 + 0.299 mg/mL $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 0.1 mg/mL 双抗。

1.7 体外培养

将受精 18~22 h 的胚胎取出,在体外培养液滴内反复吹吸,以去除粘附于透明带上的卵丘细胞和精子等,洗涤 3 遍,将胚胎放入装有平衡好的培养液的四孔板内,置于 5% O_2 、5% CO_2 和 90% N_2 的密封气袋内培养(气袋置于 5% 的 CO_2 、38.6 $^\circ\text{C}$ 的二氧化碳培养箱内),受精 48 h 时统计卵裂率,剔除单细胞胚胎,剩余胚胎继续放入气袋内培养,至 7 d 时,统

计囊胚率。培养液为 SOF + 3 mg/mL BSA + 0.1 mg/mL 双抗。

1.8 受体羊同期发情处理

选择体况正常、无繁殖疾病的经产本地地方品种绵羊用作受体。阴道理植海绵栓 12 d 后撤栓,同时肌肉注射 PMSG 300 IU/只和 PG 0.1 mg/只。撤栓后 24 h 开始试情,每隔 12 h 试情 1 次,发情羊用作移植受体。

1.9 统计分析

所有数据采用 SPSS 11.5 统计软件进行统计分析。试验 1、3、4 和 5 使用 t 检验,试验 2 采用 One-way ANOVA 中 Duncan 方差分析方法,结果以平均值 \pm 标准误表示。

2 结果与分析

2.1 萨福克羔羊周龄对激素处理的反应

激素处理后,羔羊卵泡发育及卵母细胞质量见表 1。5~6 周龄萨福克羔羊处理后的反应率为 89.74%,而 8~9 周龄的萨福克羔羊反应率只有 33.33%;5~6 周龄组羔羊的卵泡数、卵母细胞数和可用卵母细胞数皆极显著高于 8~9 周龄 ($P < 0.01$)。反应率指卵巢上有明显发育卵泡的羔羊数/羔羊总数。

表 1 日龄对外源激素处理效果的影响

Table 1 Effect of age on the treatment of exogenous hormone

周龄/周 Weeks	羔羊数 No. lambs	反应率/% Reaction rate	卵泡数 No. follicular	卵母细胞数/枚 No. oocytes	可用卵母细胞数/枚 No. available oocytes
5~6	39	89.74(35/39)	114.18 \pm 10.97 A	82.54 \pm 8.52 A	72.79 \pm 7.54 A
8~9	6	33.33(2/6)	22.17 \pm 10.38 B	12.83 \pm 6.97 B	10.83 \pm 6.31 B

注:同列不同大写字母为差异极显著 ($P < 0.01$)。

Note: Different capital letters in same column have extremely significant difference ($P < 0.01$).

2.2 春季外源激素对不同体重萨福克羔羊的作用

将 5~6 周龄萨福克羔羊体重分为 3 组,各组经激素处理后卵泡及卵母细胞数见表 2。5~6 周龄萨福克羔羊,体重在 8~18 kg 时对外源激素的反应没有统计学差异 ($P > 0.05$),每只羔羊平均获得可用卵母细胞数在 66.50~77.21。因此,对于 5~6 周龄萨福克羔羊而言,无论体重大小,都不会影响卵泡发育和卵母细胞的质量。

2.3 羔羊健康状况对诱导效果的影响

选择时健康,但曾有疾病史的羔羊经外源激素处理后,其卵泡数、可用卵母细胞数、体外受精后的可用胚胎数等指标极显著低于健康羔羊组 ($P < 0.01$)。

2.4 季节对羔羊激素诱导效果的影响

分别将春、秋季出生羔羊进行激素处理,处理后的卵泡发育效果见表 3。无论春季或秋季出生羔

羊,激素处理后平均每只供体的卵泡个数和获得的可用卵母细胞数没有差异($P>0.05$)。将获得的部分早期胚胎移植后,剩余的胚胎继续培养,受精后第

7天统计囊胚发育率,胚胎发育结果如表4所示,春、秋季羔羊卵母细胞体外受精后的卵裂率差异显著($P<0.01$),囊胚发育率显著($P<0.05$)。

表2 羔羊体重对卵泡发育效果的影响

Table 2 Influence of body weight on the effect of follicular development

体重/kg Weight	羔羊数 No. lambs	卵泡数 No. folliculars	卵母细胞数/枚 No. oocytes	可用卵母细胞数/枚 No. available oocytes
8~10	10	106.80±20.14	75.00±14.86	66.50±13.17
11~12	14	117.71±15.54	89.07±09.67	77.21±10.42
13~18	15	102.53±20.64	81.53±17.93	70.93±15.52

注:同列无字母,差异不显著($P>0.05$)。

Note: There were no different letters in same column have no difference($P>0.05$).

表3 羔羊健康状况对诱导效果的影响

Table 3 Effect of health status on the induction effects of lamb

分组 Groups	羔羊数 No. lambs	反应率/% Reaction rate	卵泡数 No. follicular	卵母细胞数/枚 No. oocytes	可用卵母 细胞数/枚 No. available oocytes	2~8 细胞胚胎/枚 No. 2-8 cell embryos
健康 Healthy	36	91.67(33/36)	121.31±67.40 a	91.92±50.87 A	82.08±45.42 A	56.94±38.65 A
亚健康 Sub-health	17	58.82(10/17)	70.59±64.78 b	43.06±43.93 B	38.47±38.46 B	27.47±28.67 B

注:同列不同大写字母差异极显著($P<0.01$),不同小写字母差异显著($P<0.05$),下同。

Note: Different capital letters in same column have extremely significant difference($P<0.01$). Different small letters in same column have significant difference($P<0.05$). Following the same.

表4 季节对羔羊卵泡发育的影响

Table 4 Seasonal effect on lamb follicular development

季节 Season	羔羊数 No. lambs	卵泡数 No. follicular	卵母细胞数/枚 No. oocytes	可用卵母细胞数/枚 No. available oocytes
秋季 Autumn	19	132.04±17.60	99.68±14.27	85.47±12.99
春季 Spring	64	119.75±9.17	79.33±7.23	63.48±5.48

2.5 季节对胚胎移植受胎率的影响

将获得的早期胚胎,随机选择,按每只受体4~5枚的胚胎进行移植,剩余胚胎继续培养,至7d时,统计囊胚率,将囊胚移植至受体体内。移植后35d B超检测早期怀孕率(阳性/受体数)。产羔后,统计最

终怀孕率(产羔母羊数/受体数)和产羔率(出生羔羊/受体数)。试验结果表明(表5、表6),春季或秋季,移植早期胚胎和囊胚期胚胎的怀孕率和产羔率相差都不大,但秋季移植早期胚胎和囊胚期胚胎的受胎率高于春季。

表5 季节对羔羊卵母细胞体外发育能力的影响

Table 5 Seasonal effect on the development competence of lamb oocytes

季节 Season	卵母细胞数/枚 No. oocytes	卵裂率/% Cleavage rate	囊胚率/% Blastocyst rate
秋季 Autumn	379	73.93±3.38 A	35.73±6.88 a
春季 Spring	1 226	54.31±3.65 B	21.34±2.54 b

表6 2~8 细胞期胚胎和囊胚对受孕率的影响

Table 6 Effect of transfer early embryo and blastocyst on pregnancy rate

%

季节 Season	胚胎期 Embryo stage	受体数 No. receptors	B超 B ultrasonic	怀孕率 Pregnancy rates	产羔率 Lambing rate
春季 Spring	2~8 细胞期 2-8 Cell	211	29.86(63/211)	26.07(55/211)	32.23(68/211)
	囊胚 Blastocyst	69	24.67(17/69)	21.74(15/69)	21.74(15/69)
秋季 Autumn	2~8 细胞期 2-8Cell	113	60.17 (68/113)	51.33(58/113)	57.52(65/113)
	囊胚 Blastocyst	17	64.71 (11/17)	41.18(7/17)	52.94(9/17)

3 讨 论

1979年, Worthington等^[14]即开始对羔羊卵泡发育进行研究,发现经hCG处理的羔羊卵巢有明显的卵泡。我国对幼龄动物卵泡发育的研究最早是由张锁链等^[15]在山羊上进行,但当时由于体外培养等技术不够成熟,未能得到理想的效果。JIVET技术体系最早是由澳大利亚南澳政府生殖与发育研究所提出并应用于生产^[16],但我国大部分地区对该技术仍处于研究阶段,达到可推广阶段的不多,可能与JIVET技术包括的环节较多,众多因素都可能影响试验结果,从而导致生产效率不稳定有关。

1) 供体羊的选择是JIVET技术成功与否的首要因素。经Kelly等^[10]对美利奴细毛羊的研究得出,其激素处理的最佳阶段为4~8周龄。而郑旭等^[17]发现,辽宁绒山羊的最适年龄为5~6周龄,郭洪等^[18]对湖羊、哈萨克羔羊的研究发现,哈萨克羔羊的最佳处理年龄是4~8周,但不是湖羊羔羊的最佳时期。本试验通过对萨福克羔羊的研究发现,其最佳处理年龄为5~6周龄,8周龄以上的羔羊不适合JIVET技术体系,与美利奴细毛羊和哈萨克羔羊的4~8周龄相比,范围较窄。分析原因,可能与各品种羔羊卵巢出现卵泡闭锁的时间不同有关。早期Kennedy等^[19]在研究美利奴细毛羊胎儿期至出生后33周龄卵巢和卵泡发育情况时发现,在羔羊出生早期,卵巢重量和卵泡数量随着日龄的增长而逐渐增加,4~8周龄时达到高峰,随后部分卵泡开始闭锁,数量逐渐降低,33周龄后保持稳定。因此,根据本研究结果,可以推论,萨福克羔羊卵巢和卵泡发育的高峰期为5~6周龄,8周龄时卵泡开始出现闭锁现象,但该推论尚需进一步研究。

2) 体重是衡量个体生长发育的重要指标。多胎、初生重过低、健康状况不良、生长速度较慢等因

素都可能导致体重过低^[20],因此在选择羔羊时体重应成为考量因素之一。本研究中选择的羔羊初生重相近,生长至5~6周龄时,体重在8~18 kg,范围较大,经外源激素处理后,虽然10~12 kg组的效果稍高于8~10和12~18 kg组,但各组间差异不显著。由此可以得出,体重较低或较重的羔羊,并不影响其卵泡发育和卵母细胞的回收。该研究结果也进一步证明,在体况正常情况下,影响卵巢及卵泡发育最大的可能因素为日龄而非体重。

3) 在选择供体羊时,通常根据羔羊的采食、精神状态等表现现象进行选择,有明显疾病的羔羊不会被选作供体,但不会查看生长过程中可能出现的意外情况。但曾经生病、试验时已痊愈的羔羊对试验效果是否有影响,目前未见报道。本研究随机选择的羔羊,分属同一养殖场的2个养殖户,体况相近,饮食、精神状态良好,但试验结果却表明两养殖户之间差异较大,分析后发现,其中一养殖户对羔羊极为关注,羔羊稍有不适,即使用大量的青霉素、头孢等抗生素,试验数据表明,有疾病史的羔羊,激素诱导效果较差,平均每只获得可用卵母细胞数仅为38.47枚,显著低于正常羔羊的82.08枚,体外受精后获得的早期胚胎仅为27.47枚,为正常羊的1/2。因此,选择供体羔羊时,其曾经健康状况不容忽视。

4) 萨福克羊是季节性发情动物,对于成年母羊,秋冬是发情季节,春夏为乏情季节,常规的配种或胚胎移植一般选择秋季进行。幼龄期羔羊,由于体内各种激素调控功能尚不健全,内分泌激素水平受环境影响不明显,不应有季节性差异。经研究发现,季节对羔羊卵泡发育没有影响,但对获得卵母细胞质量有显著影响,秋季出生羔羊卵母细胞体外受精后的卵裂率、囊胚率显著高于春季出生的效果。据Gou等^[13]分析,卵母细胞体外发育效率出现季节性差异,可能与使用的精子质量有关,秋季公羊精子活

力好于春夏季,而精子质量对卵母细胞的后期发育影响很大;但若使用秋季做的冻精,受精效率仍然较低的话,则说明春季的羔羊卵母细胞质量较差。

5)秋季移植2~8细胞期或囊胚期胚胎,怀孕率和产羔率高于春季。分析原因,可能与受体羊有关。使用的受体绵羊为本地地方品种,春季是乏情季节,虽然通过同期发情处理使其发情,但受体羊的生殖系统包括输卵管、子宫等内环境以及激素分泌水平与正常发情季节仍可能存在差异,从而导致胚胎着床率较低。在相同季节,移植2~8细胞期或囊胚期胚胎,受胎率没有差异,进一步验证了该种可能。

4 结 论

萨福克羔羊体外胚胎生产及移植技术,选择5~6周龄、体重在8~18 kg、无疾病史的羔羊作供体,能极大地提高生产效率。每只受体移植4~5枚2~8细胞期胚胎和移植单枚囊胚受胎率没有差异。秋季羔羊体外胚胎发育能力及移植效果好于春季。

参 考 文 献

- [1] Bertoldo M J, Nadal-Desbarats L, Gérard N, et al. Differences in the metabolomic signatures of porcine follicular fluid collected from environments associated with good and poor oocyte quality[J]. *Reprod*, 2013, 146(3): 221-31
- [2] Lunn M O, Wright S J. Distinct subtypes of zona pellucida morphology reflect canine oocyte viability and cumulus-oocyte complex quality[J]. *Theriogenology*, 2013, 80(5): 498-506
- [3] Mirshams M, Razzaghi M, Noormohammadpour P, et al. Incidence of incomplete excision in surgically treated cutaneous squamous cell carcinoma and identification of the related risk factors[J]. *Acta Med Iran*, 2011, 49(12): 806-815
- [4] Armstrong D T, Kotaras P J, Earl C R. Advances in production of embryos *in vitro* from juvenile and prepubertal oocytes from the calf and lamb[J]. *Reprod Fertil Dev*, 1997, 9(3): 333-339
- [5] Presicce G A, Jiang S, Simkin M, et al. Age and Hormonal dependence of acquisition of oocyte competence for embryo genesis in prepubertal Calves[J]. *Biol Reprod*, 1997, 56(2): 386-392
- [6] Majerus V, Lequarre A S, Ferguson E M, et al. Characterization of embryos derived From calf oocytes: Kinetics of cleavage, cell allocation to inner cell mass, and trophectoderm and lipid metabolism[J]. *Mol Reprod Dev*, 2001, 57(4): 346-352
- [7] Romaguera R, Casanovas A, Morató R, et al. Effect of follicle diameter on oocyte apoptosis, embryo development and chromosomal ploidy in prepubertal goats[J]. *Theriogenology*, 2010, 74(3): 364-373
- [8] Anguita B, Jimenez-Macedo A R, Izquierdo D, et al. Effect of oocyte diameter on meiotic competence, embryo development p34 (cdc2) expression and MPF activity in prepubertal goat oocytes[J]. *Theriogenology*, 2007, 67(3): 526-536
- [9] Valasi I, Leontides L, Leontides L, et al. Age, FSH dose and follicular aspiration frequency affect oocyte yield from juvenile donor lambs[J]. *Reprod Domest Anim*, 2007, 42(3): 230-237
- [10] Kelly J M, Kleeman D O, Walker S K. Enhanced efficiency in the production of offspring from 4- to 8-week old lambs[J]. *Theriogenology*, 2005, 63(7): 1876-1890
- [11] Kelly J M, Kleeman D O, Maxwell W M C, et al. Effect of GnRH treatment on the maturation and *in vitro* development of oocytes collected from 4- to 6-week-old Merino lambs[J]. *Reprod Fertil Dev*, 2007, 19(8): 947-953
- [12] Kelly J M, Kleeman D O, Maxwell W M C, et al. Effects of insulin-like growth factor-I, epidermal growth factor and cysteamine on the *in vitro* maturation and development of oocytes collected from 6- to 8-week-old Merino lambs[J]. *Reprod Fertil Dev*, 2008, 20(5): 570-578
- [13] Gou K M, Guan H, An X R, et al. Field evaluation of juvenile *in vitro* embryo transfer (JIVET) in sheep[J]. *Anim Reprod Sci*, 2009, 112(3/4): 316-324
- [14] Worthington C A, Kennedy J P. Ovarian response to exogenous hormones in six week old lambs [J]. *Aust J Biol Sci*, 1979, 32(1): 91-96
- [15] 张锁链, 刘东军, 旭日干, 等. 羔山羊卵泡的发育及卵母细胞体外成熟的研究[J]. *内蒙古大学学报*, 1996, 27(2): 256-26
- [16] 李运生, 曹鸿国, 刘亚, 等. 羔羊超数排卵与胚胎体外生产技术研究进展[J]. *动物医学进展*, 2011, 32(11): 99-104
- [17] 郑旭, 郭丹, 张兴会, 等. 影响幼龄辽宁绒山羊超数排卵效果因素的研究[J]. *现代畜牧兽医*, 2011(6): 67-69
- [18] 郭洪, 万鹏程, 石文艳, 等. 不同品种绵羊超数排卵及胚胎体外生产技术研究[J]. *畜牧与兽医*, 2012, 44(10): 20-24
- [19] Kennedy J P, Worthington C A, Cole E R. The post-natal development of the ovary and uterus of the Merino lamb[J]. *J Reprod Fertil*, 1974, 36(2): 275-282
- [20] 王睿, 王冰源, 苗凯, 等. 羔羊体重与激素重复诱导对羔羊卵泡发育的影响[J]. *云南农业大学学报*, 2011, 26(6): 766-770

责任编辑: 苏燕