

PROLİFİK SAKIZ KOYUNLARINDA ÖSTRUS SIKLUSUNDA PLAZMA FSH VE LH DÜZEYLERİ¹

Plasma FSH and LH Concentrations During the Estrus Cycle of Prolific Sakız Sheep

Bülent GÜVEN² Semin ÖZSAR² Erdal SABAN³ Muzaffer ÇELEBİ³
Kenan ÇOYAN⁴ Murat BUDANIR⁵ Heinrich H.D. MEYER⁶

ÖZET

Bu çalışmada, Sakız koyunlarında gonadotropin (FSH,LH) konsant-rasyonları ile çok yavru verimi arasındaki ilişkiyi araştırmak amaçlanmıştır.

Araştırmada, daha önceki kayıtlarda tek, ikiz, üçüz, dördüz doğum yaptığı tespit edilen 16 prolifik Sakız koyunu ve kontrol olarak 10 Akkaraman koyunu kullanıldı. Çiftleşme sezonu başında koyunlar progesteron ihtiva eden vaginal sünger ile 14 gün süreyle sinkronize edildi. Sünger çıkarımını takip eden ikinci siklus başında koyunların jugular venine seksüel siklusun 0.(Östrus), 9. ve 16. günlerinde katater takıldı ve 6 saat süre ile her 15 dakikada bir kan alındı. Plazma progesteron, LH ve FSH konsantrasyonları çift antikorlu enzim immuntest yöntemi ile analiz edildi.

Değerlendirmeler sonucu gruplar arasındaki LH ve FSH konsantras-yonları yönünden önemli bir fark bulunmadı ($p>0.5$).

Anahtar Sözcükler : Prolifik, Sakız Koyunu, FSH, LH.

SUMMARY

In this study, it was aimed to investigate a possible relationship between gonadotrophin (FSH, LH) concentrations and prolificacy in Sakız sheep.

Sixteen prolific Sakız sheep having litter size, according to previous records, of 1,2,3,4 and 10 Akkaraman sheep as control were used in the study. At the beginning of the breeding season, ewes were synchronized by insertion of progesterone impregnated vaginal sponges for 14 days. Following the first estrus cycle after sponge removal, the ewes were bled via the jugular cannulae at 15 minute intervals for the duration of 6 hr on days 0 (estrus), 9 and 16 of the second estrus cycle. Plasma progesterone, LH and FSH concentrations were determined using double antibody enzymeimmunoassay.

No significant differences ($p>0.5$) in gonadotrophin concentrations were found between groups.

Key Words: Prolific, Sakız Sheep, FSH, LH.

GİRİŞ

Koyun yetiştiriciliğinde üretimi artırmak ana hedeflerden birisidir ve ovulasyon sayısı koyunlarda bütün üreme potansiyelinin en önemli kısmıdır. Koyunlardaki yavru sayısı hem genetik hem de çevresel faktörlerle kontrol edilir (1).

Domestik koyun ırklarının çoğunun yavru-rulama başına bir veya iki yavrusu olurken, bazı nadir ırkların Booroola Merin, Cambridge, D'Man Romanov, Finnish ve Landrace'da üç veya daha fazladır. Yavru sayısını artırmak için aynı ırk içerisinde yapılan çalışmalar sonucu çok yavaş ilerlemeler kaydedilmiştir.

Çünkü yavru sayısının heritabilitesi düşüktür. Ovulasyon sayısı ve dolayısıyla yavru sayısını etkileyen major genlerin (veya mutasyonların) keşfi bilim adamları arasında çok büyük ilgi uyandırmıştır (2). Ovulasyon sayısını artırmak için kullanılan en klasik yöntem yüksek derecede prolifik ırklarla çapraz melezleme yapmaktır. Booroola ırkında keşfedilen tek bir gen (F geni, fekundite geni) bu tür yetiştiricilikte yeni ufuklar açmıştır(6). Booroola merinoslarında böyle bir genin varlığı ilk defa 1980 yılında ortaya atılmıştır(1). O zamandan beri, koyunlardaki üremeyi etkileyen diğer mu-

1- Bu çalışma NATO (CRG 920151), TÜBİTAK (VHAG-964) ve Türkiye Atom Enerjisi Kurumu (TAEK 2211) tarafından desteklenmiştir.

2- K.A.Ü. Veteriner Fakültesi Fizyoloji Bilim Dalı Kars/TÜRKİYE

3- TAEK, Lalahan Hay. Sağ. Nükleer Araştırma Enst.Fizyoloji Bölümü, Ankara/TÜRKİYE

4- S.Ü. Vet.Fak. Suni Tohumlama Bilim Dalı, Konya/TÜRKİYE

5- TİGEM, Kumkale Tarım İşletmesi Müdürlüğü, Çanakkale/TÜRKİYE

6- Münih Teknik Üniversitesi, Fizyoloji Enstitüsü, Weihenstephan, ALMANYA

tasyonların araştırılması yoğunluk kazanmıştır (3,4).

Davis et al.(3) Booroola'da ovulasyon sayısı açısından 3 farklı genotip tanımlamışlardır. Ovulasyon sayısı > 5 olanlar (FF), 3-4 olanlar (F+), 1-2 olanlar (++) . Bu sonuçlar, tekrarlanan en az 3 gözlem sonucu elde edilmiştir. Booroola da fekdite geni (FecB) taşıyıcı ve taşıyıcı olmayanlar arasında ovulasyon sayısı bakımından büyük farklılıklar olmasına karşılık, sorumlu fizyolojik olaylar aydınlığa kavuşturulamamıştır(5). Görünüşte her iki genotipin de eş görüldüğü bildirilmektedir. Çünkü östrus siklusu uzunlukları (16-18 gün), östrus aktivitesi süresi (yaklaşık 33 saat), östrusun gözükmeye ile ovulasyon öncesi ilk LH piki arasındaki süre (8-11 saat) ve ovulasyon öncesi LH pikinin süresi aynı olarak tespit edilmiş, yine dişilerde mevsimsel östrus aktivitesinin süresi olarak bir fark gözlenmemiştir. Bununla beraber, hipotalamik-pituitar-ovaryum ilişkisi ile ilgili yapılan yoğun çalışmalar sonucu FecB geni açısından farklılıklar tesbit edilmiştir(6-11). Bu farklılıklar hormon sentezi, muhafazası ve salınım düzeyinde ortaya çıkmıştır. Ayrıca gelişen ovulasyon folliküllerinin fonksiyonunda ve morfolojisinde de bu fark gözlenmiştir (10,12,13).

Koyunlarda >2mm çaplı folliküllerin büyümesi akut olarak gonadotropinlere bağlıdır (14-16). Bununla beraber, farklı ırklarda ovulasyon yapan ovaryum foliküllerine hangi miktarda gonadotropinlerin katkıda bulunduğu açıklık kazanmamıştır ve çeşitli sonuçlar bildirilmektedir. LH'nin ovulasyon sayısını kontrol etmede yer almadığına (17) dair genel bir fikir birliğine rağmen, prolifik ve prolifik olmayan koyunlarda FSH konsantrasyonlarında fark bildirilmektedir. Lokal kontrollerine göre prolifik D'Man (9) ve Booroola'da (6) folliküler fazda daha yüksek FSH konsantrasyonları bildirilmiştir. Tersine, diğer prolifik ırklarda FSH'nin böyle bir üstünlüğüne rastlanmamıştır. Prolifik Romanov ile non-prolifik Ile de France (18); prolifik Finn ile prolifik olmayan Suffolk ırkları arasında olduğu gibi (19).

Son çalışmalar koyunlardaki ovulasyon sayısının, erken folliküler fazda, FSH konsantrasyonlarının kısa süreli yükselmesiyle artırılabilirliğini göstermiştir (20). Booroola merinoslarındaki çalışmalarda, F geninin muhtemelen bu yolla fonksiyon gösterdiği ileri sürülmektedir.

Bu çalışmada ülkemizde yetiştirilen Sakız koyunlarında çoklu doğum özelliğinin hormon parametreleriyle olan ilişkisinin araştırılması amaçlandı. Bu bağlamda daha önceki yavru sayısı kayıtlarına göre sınıflandırılan Sakız koyunları ve Akkaramanlar arasında FSH ve LH yönünden bir fark olup olmadığı araştırıldı.

MATERYAL ve METOT

Saha Çalışması

TİGEM Kumkale Tarım İşletmesi Müdürlüğü'nde (Çanakkale) bulunan 1,2,3,4 yavru doğuran 3-5 yaşlarındaki Sakız koyunlarından 4'er tane seçilerek toplam 16 hayvanda çalışılmıştır. Hayvanlardan kan alımını kolaylaştırmak için Haziran ayında tüm koyunlara Medroxyprogesterone acetat (MPA) ihtiva eden vaginal sünger takıldı ve 14 gün sonra süngerler çıkarıldı. Sünger çıkarımını takip eden ikinci siklus başında koyunların jugular venine seksüel siklusun 1.,9. ve 16. günlerinde kateter takıldı ve 6 saat süre ile her 15 dakikada bir kan alındı. Ayrıca kan alımına günde bir kez olmak üzere iki siklus süresince devam edildi. Alınan kanlar hemen santrifüje edilerek plazmaları -20 OC'de saklandı. Kontrol grubu olarak 10 adet Akkaraman koyununda da Sakız koyunlarındaki kan alma işlemi uygulandı.

OVINE LH (oLH) HORMONUNUN EIA İLE TAYİNİ

oLH (NIADDK-oLH-1-2) ve oLH antiserumu (NIADDK-anti-oLH-1) National Hormone and Pituitary Program, National Institute of Diabetes and Digestive and Kindey Diseases USA'dan (NIDDK) sağlandı.

oLH Hormonunun Biotinle İşaretlenmesi

320 mikrogram oLH, 250 mikrolitre PBS pH 7.5 içinde çözüldü ve 90 mikrogram D-Biotinyl-aminocaproic asit N-hydroxy-succinimide ester (20 mikrolitre N, N-dimethylformamide içinde) ile reaksiyona sokuldu. Reaksiyona 4 h oda ısısında devam edildi ve reaksiyon 0.1 mg glycin ile durduruldu. Oda ısısında 4 h'lık bir inkübasyondan sonra karışıma 1.0 mg Bovine Serum Albumin (BSA) ilave edildi ve karışım 1 gün +40C'de dialize edildi. Dialize edilen biotinyl-oLH konjugatı alikotlara ayrılarak -70 OC'de depolandı.

Testin Yapılışı

Mikrotitrasyon plakları kuyu başına 1.2 mikrogram olacak şekilde anti-tavşan IgG-keçi IgG ile +4 0C'de bir gece inkübe edildi. Plak daha sonra % 0.1 albumin ihtiva eden fosfat tampon ile 60 dk. oda ısısında inkübe edildi. Anti tavşan IgG-keçi IgG ile kaplanan plaklara 20 mikrogram örnek veya standart (50-1.56 ng LH/ml), 100 mikrolitre oLH antiserumu (1:250.000 oranında fosfat tampon ile dilüe edildi) pipetlendi ve plak 2 gün + 4 0C'de inkübe edildi. Tekrar içeriği boşaltılan plağa 20 ng/100 mikrolitre streptavidin-peroxidase konjugatı konuldu ve plak + 4 0C'de 20 dk inkübe edildi. Bu inkübasyondan sonra plak 4 kere yıkandı ve plağa 150 mikrolitre/kuyu substrat (%1 H₂O₂, % 0.6 3,3', 5,5'- tetramethylbenzidine) konuldu ve reaksiyon 40 dk. sonra 4 N H₂SO₄ ile durdurularak oluşan renk 450 nm'de fotometrede okundu.

OVINE FSH (oFSH) HORMONUNUN EIA İLE TAYİNİ

oFSH (USDA-oFSH-19-SISFP-2), oFSH antiserumu (NIDDK-anti-oFSH-1) ve oFSH referansı (NIDDK-oFSH-RP-1) National Hormone and Pituitary Program, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases USA'dan (NIDDK) elde edildi. oFSH hormonu

oLH-EIA'daki aynı yöntemle işaretlendi ve saf-laştırıldı.

oFSH hormonunun EIA ile tayininde oLH-EIA'daki aynı yöntem uygulandı. Bu testte oFSH antiserumu 1:20.000 dilüsyonda ve biotinyl-oFSH 60 ng/kuyu olarak kullanıldı.

PROGESTERONUN EIA İLE TAYİNİ

Serumda progesteron düzeyleri mikrotitrasyon plak EIA yöntemi ile Prakash et al. (21)'in bildirdiği yöntemle göre analiz edildi.

BULGULAR

Sakız koyunlarının (tekli, ikiz, üçüz ve dördüz doğum yapan) ve Akkaraman koyunlarının östrus siklusunun 0,9 ve 16. günlerinde 6 saat süre ile her 15 dakikada bir toplanan 24 plazma örneğindeki FSH ve LH düzeyleri Şekil 1,2,3,4 ve 5'de gösterilmektedir. FSH ve LH yönünden gözle görünen bazı bireysel farklılıklar bulunmakla birlikte ortalama değerler arasında, Tablo 1'de görüldüğü gibi istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır.

FSH ve LH konsantrasyonlarının EIA ile tayinlerinde testlerin kontrolleri yapılmış, deneyiçi ve deneylerarası varyasyon katsayıları Tablo 2 ve 3'de, sensitivite değerleri Tablo 4'de gösterilmektedir.

Tablo 1: Akkaraman ve Sakız Koyunlarının Siklusun 0., 9. ve 16. günlerindeki FSH ve LH değerlerinin önem kontrolü

Siklus Günü	Hormon	t	Serbestlik Derecesi	P
0	oFSH	0.577	118	P>0.5
0	oLH	0.637	118	P>0.5
9	oFSH	0.337	118	P>0.5
9	oLH	0.442	118	P>0.5
16	oFSH	0.724	118	P>0.5
16	oLH	0.200	118	P>0.5

Tablo 2: Hormon testlerinin (EIA) deneyiçi varyasyon katsayıları

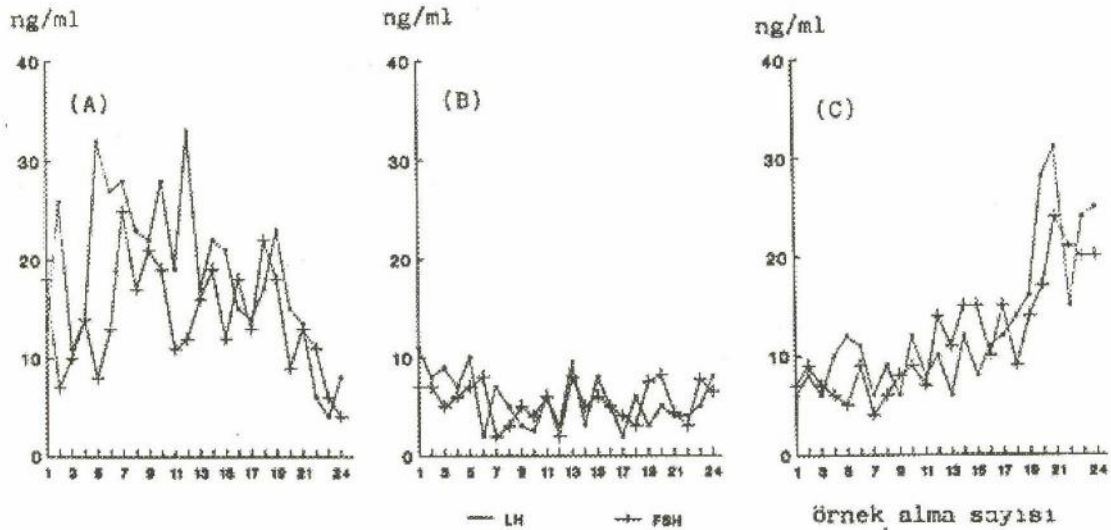
Hormon	n	X (ng/ml)	CV %
Progesteron	18	0.49	12.6
Progesteron	18	6.4	7.8
oLH	25	3.6	9.7
oLH	26	25.8	12.6

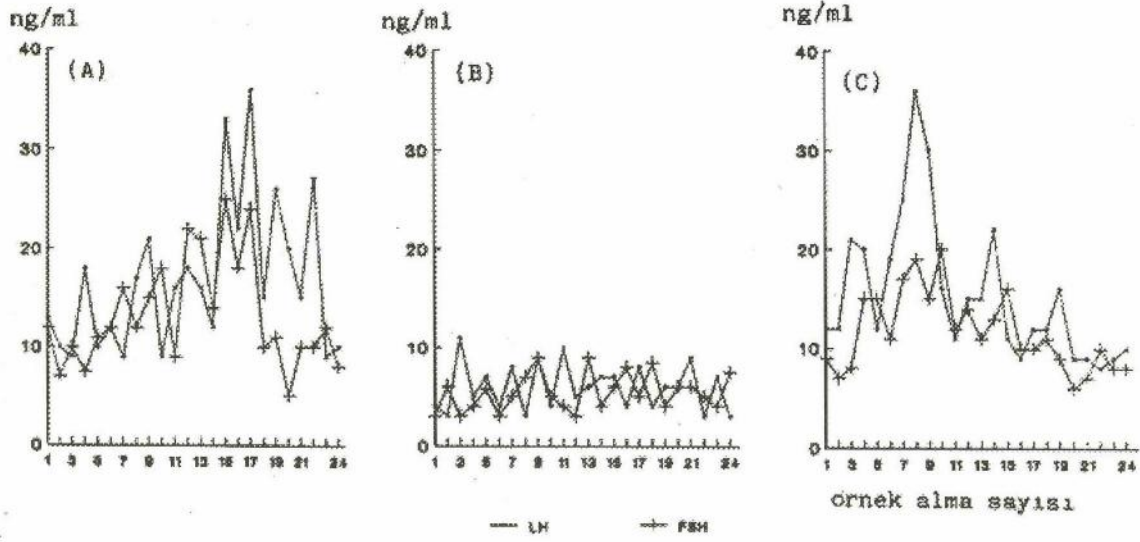
Tablo 3: Hormon testlerinin (EIA) deneylerarası varyasyon katsayıları

Hormon	n	X (ng/ml)	CV %
Progesteron	15	1.1	9.3
Progesteron	15	5.2	5.8
oLH	21	6.3	13.4
oLH	24	32.7	6.7
oFSH	22	9.8	13.8
oFSH	23	55.7	9.7
E ₂ 17-Beta	15	0.038	17.3
E ₂ 17-Beta	14	0.228	14.7

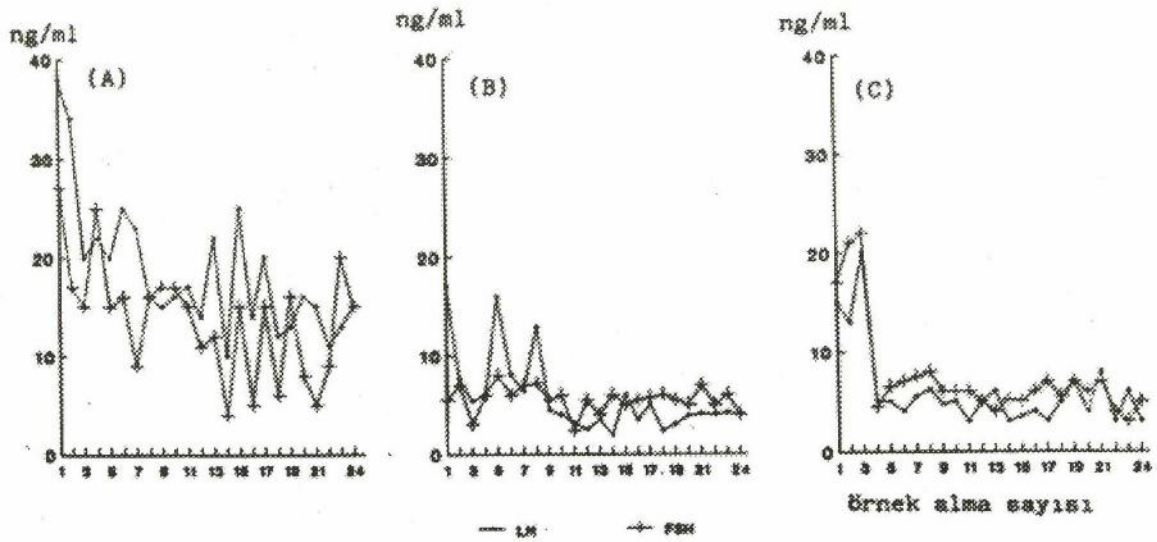
Tablo 2: Hormon testlerinin (EIA) deneyiçi varyasyon katsayıları

Hormon	Hassasiyeti
Progesteron	0.25 pg/kuyu
E ₂ 17-Beta	0.20 pg/kuyu
oFSH	31.0 pg/kuyu
oLH	31.0 pg/kuyu

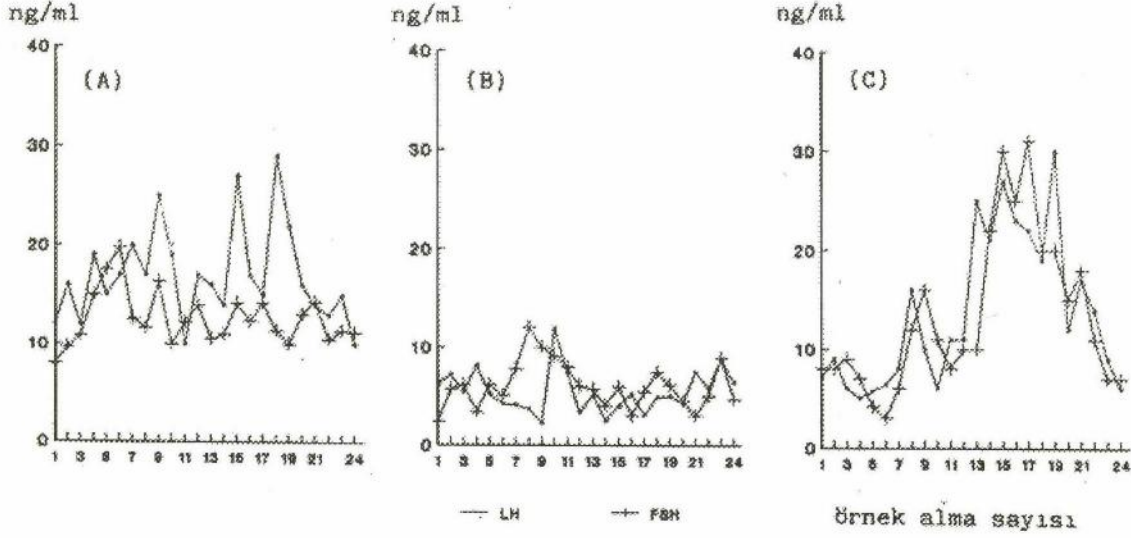
**Şekil 1.** Akkaraman koyunun seksüel siklusun 0. gün (A), 9. gün (B) ve 16. gün (C)'lerinde 6 saat süre ile her 15 dakikada bir toplanan 24 adet plazma örneğindeki FSH ve LH düzeyleri



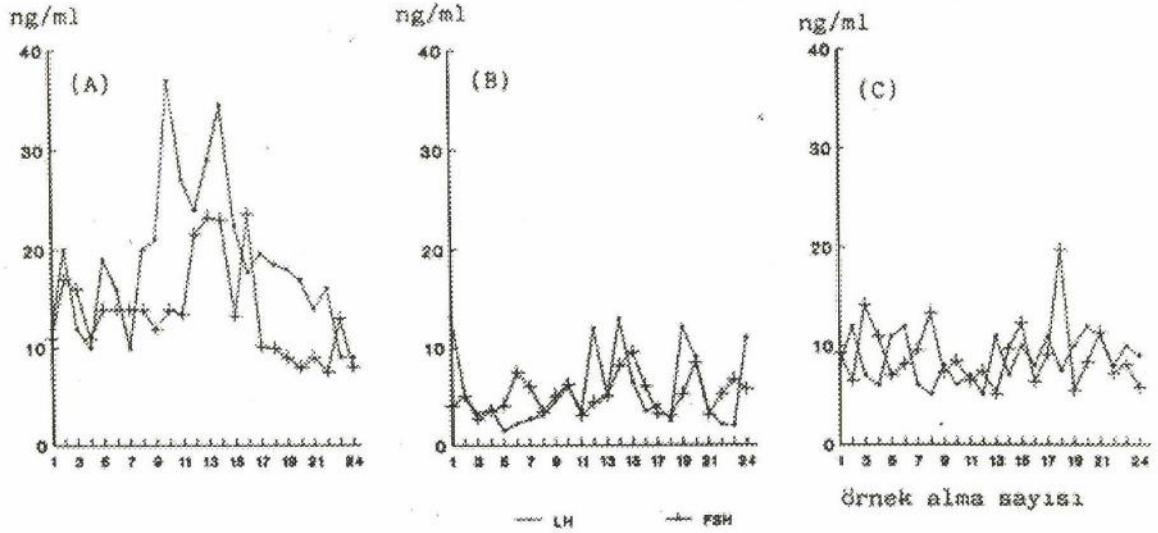
Şekil 2. Tek yavru doğuran Sakız koyunun seksüel siklusun 0. gün (A), 9. gün (B) ve 16. gün (C)'lerinde 6 saat süre ile her 15 dakikada bir toplanan 24 adet plazma örneğindeki FSH ve LH düzeyleri



Şekil 3. İkiz doğum yapan Sakız koyunun seksüel siklusun 0. gün (A), 9. gün (B) ve 16. gün (C)'lerinde 6 saat süre ile her 15 dakikada bir toplanan 24 adet plazma örneğindeki FSH ve LH düzeyleri



Şekil 4. Üçüz doğum yapan Sakız koyunun seksüel siklusun 0. gün (A), 9. gün (B) ve 16. gün (C)'lerinde 6 saat süre ile her 15 dakikada bir toplanan 24 adet plazma örneğindeki FSH ve LH düzeyleri



Şekil 5. Dördüz doğum yapan Sakız koyunun seksüel siklusun 0. gün (A), 9. gün (B) ve 16. gün (C)'lerinde 6 saat süre ile her 15 dakikada bir toplanan 24 adet plazma örneğindeki FSH ve LH düzeyleri

TARTIŞMA ve SONUÇ

Ovulasyon sayısının gonadotropin konsantrasyonlarıyla kontrol edildiği ve gonadotropinlere karşı ovaryum sensitivitesi bildirilmektedir (8,18). Bazı profolik koyun ırklarında yüksek gonadotropin konsantrasyonları gösterilmiştir (6,9,10). Çalışmamızda çoklu doğum yapan Sakız koyunlarında, Akkaraman'a göre daha yüksek gonadotropin konsantrasyonları gösterilememiştir. Bu yönlü farklılıklar çeşitli bildiriler arasında da çelişkili sonuçlar ortaya çıkarmıştır. McNatty ve ark. (10) çalışmalarında ortalama FSH ve LH düzeylerini Booroola F geni taşıyanlarda (FF) taşımayanlara (++) göre daha yüksek bulmuştur. Bu ortalama değerlerdeki gene - özgü farklılıklar anöstrusta, luteal fazda ve kloprostenol ile indüklenen foliküler fazda dikkate değer olarak bildirilmiştir. Plazma FSH ve LH'daki bu farklılıklar sık aralıklarla kan alınma durumunda ve bunların ortalamaları alındığında elde edilmiştir. Fakat hayvanlar bireysel olarak ele alındığında her hayvanda aynı sonuç gözlenmemiştir. Robertson ve ark. (7) östrusun 3. gününde pituitör FSH miktarını Booroola merinoslarda, kontrol merinoslara göre önemli derecede yüksek bulmuştur. Driancourt ve ark. (8), profolik Romanov ile profolik olmayan Ile de France ırkında ovulasyon yapan foliküllerin farklılaşması ve ovulasyon sayısı açısından çalışmalarda bulunmuşlar ve sonuçta gonadotropin konsantrasyonları ile ovulasyon için büyük foliküllerin gelişmesi arasında lineer bir ilişki olmadığını bildirmişlerdir.

Montgomery ve ark. (1), F geni taşıyıcı Booroola'da taşımayanlara göre FSH ve LH konsantrasyonlarının daha yüksek olma eğilimi olmasına rağmen, bu farklılıkların her zaman istatistiksel olarak önemli olmadığını ileri sürmüşlerdir. Ovulasyon öncesi FSH konsantrasyonları Booroola merinoslarda karşılaştırılmıştır (20). 2-3 yaşlılarda bir fark gözlenmezken 8 yaşlılarda kontrollere göre daha yüksek FSH konsantrasyonları elde edilmiştir. Buna karşılık, ortalama ovulasyon sayısı 1.7 olan Galway, 3.6 olan finnish Landrace ve 4.9 olan Finnish Landrace ırklarında foliküler faz FSH konsantrasyonları da ölçülmüş ve ovulasyon sayısı açısından bir fark bulunmamıştır. Scaramuzzi ve Radford (22), Booroola ve kontrol merinoslarda östrus siklusunun 2,9 ve 16. günlerinde ortalama LH kon-

santrasyonları ve puls aralıkları açısından bir fark bulamamışlardır. Bindon ve ark. (6), ovulasyon sayısının, ovulasyon öncesi periyotta, LH'nın salgılanma modelinden bağımsız olduğunu ileri sürmüşlerdir. Booroola ve kontrol merinoslarda normal siklusun 15. gününden başlayarak takip eden siklusun 3. gününe kadar toplanan 3 saatlik plazma örneklerinde (2,3 ve 8 yaşlı hayvanlarda) ovulasyon öncesi FSH ve LH salınımlarının yüksekliği bütün genotiplerde, kontrollerde ve farklı yaş gruplarında benzer bulunmuştur.

Sonuç olarak diyebiliriz ki : Gonadotropin konsantrasyonlarındaki kantitatif farklılıklar profolik ırklarda, profolik olmayanlara göre yüksek ovulasyon sayısına katkıda bulunmazlar. Bazı profolik ve profolik olmayan ırklarda gonadotropin konsantrasyonları arasındaki farklılıklar, yüksek ovulasyon sayısına neden olmaktan ziyade, farklı sayıda ovulasyon yapan foliküllerin etkisinden dolayı olabilir. Bununla beraber koyunlarda ovulasyon sayısını kontrol eden mekanizma koyun foliküler sıvısında bazı ovaryum fonksiyon düzenleyicilerinin (inhibin gibi) keşfine rağmen, halan tam bir açıklık kazanmamıştır. Bu konuyla ilgili olarak, dörtten fazla yavruleyen sakız koyunlarında kapsayacak şekilde daha çok sayıda hayvan üzerinde çalışma yapılması önerilebilir.

KAYNAKLAR

1. Montgomery, G.M., McNatty, K.P. and Davis, G.H. Physiology and molecular genetics of mutations that increase ovulation rate in sheep. *Endocrine Reviews*, 13(2): 309-328, (1992).
2. Piper, L.R., Bindon, B.M. and Davis, G.H. The single gene inheritance of the high litter size of the Booroola Merino. In "Genetic and Reproduction in Sheep", eds. R.B. Land and Robinson D.W. Butterworths London, Chapter 13, pp, 115-125, (1985).
3. Davis, G.H., Montgomery, G.W., Al-lison, A.J., Kelly, R.W. and Bray, A.R. Segregation of a major gene influencing fecundity in progeny of Booroola sheep. *J.Agric. Res.*, 25, 525 (1982).
4. Davis, G.H., McEwan, J.C., Fennesy P.F., Dods, K.G. and Farquhar P.A. Evidence for the presence of a major gene influencing ovulation rate on the X chromosome of shepp. *Bi-ol.Reprod.* 44, 620-624 (1991).

5. Montgomery, G.W., Kelly, R.W., Davis, G.H., Allison, A.J. Ovulation rate and oestrus in Booroola genotypes. In "Genetic and Reproduction in Sheep; eds: R.B. Land and D.W. Robinson, Butterworths, London, pp 237-250, (1985).
6. Bindon, B.M., Piper, L.R., Cummins, L.J., O'shea, T., Hillard, G., Gindlay, J.K. and Robertson, D.M. Reproductive endocrinology of prolific Sheep : Studies of the Booroola Merino. In "Genetic and Reproduction in sheep ", eds. R.B. Land and D.W. Robinson. Butter London, Chapter 23, pp 217- 234 (1985).
7. Robertson, D.M., Ellis, S., Foulds, L.M., Frindaly, J.K. and Bindon, B.M. Pituitary gonadotropins in Booroola and control Merino sheep. *J. Reprod. Fert.*, 71, 189-197, (1984).
8. Driancourt, M.A., Gauld, I.K., Tergui, M. and Webb, R. Variations in patterns of follicle development in prolific breeds of sheep. *J. Reprod. Fert.*, 78, 565-575 (1986).
9. Lahlou-Kassi, A., Schams, D. and Glatzel, P. Plasma gonadotropin concentration during the oestrus cycle and after ovariectomy in two breeds of sheep with low and high fecundity. *J. Reprod. Fert.* 70, 165-173, (1984).
10. McNatty, K.P., Hudson, N., Henderson, K.M., Gibb, M., Morrison, L., Ball, K. and Smith, P. Differences in gonadotropin concentrations and pituitary responsiveness to GnRH between Booroola ewes which were homozygous (FF), heterozygous (F+) and non-carriers (++) of a major gene influencing their ovulation rate. *J. Reprod. Fert.*, 80, 577-588, (1987).
11. McNatty, K.P. and Henderson, K.M. Gonadotropins, fecundity genes and ovarian follicular function. *J. Steroid Biochem.* 27 (1-3), 365-373, (1987).
12. Castonguay F., Minvielle, F. and Dufour, J.J. Reproductive performance of Booroola X Finnish Landrace and Booroola X Suffolk ewe lambs, heterozygous for the F gene and growth traits of their three - way cross lambs. *Can. J. Anim. Sci.*, 70, 55-65, (1990).
13. Castonguay, F., Dufour, J.J., Minvielle, F. and Estrada, R. Follicular dynamics and dominance in Booroola X Finnish Landrace and Booroola X Suffolk ewes heterozygous for the F gene. *J. Reprod. Fert.*, 89, 193-203 (1990).
14. Driancourt, M.A., Philipon, P., Locatelli, A., Jacques, E. and Webb, R. Are differences in FSH concentrations involved in the control of ovulation rate in Ramonov and Ile-de France ewes? *J. Reprod. Fert.*, 83, 509-516 (1988).
15. McNatty, K.P., Kieboom, L.E., McDiarmid, J., Heath, D.A. and Lun, S. cAMP and steroid production by small ovarian follicles from Booroola ewes with and without a fecundity gene. *J. Reprod. Fert.*, 76, 471-480, (1986).
16. Dufour, J.J., Challi, L.P. and Mauleon, P. Short and long term effects of hypophysectomy and unilateral ovarian follicular populations in sheep. *J. Reprod. Fert.*, 57, 301-309 (1979).
17. McNatty, K.P., Gibb, M., Dobson, C. and Thurley, D.C. Evidence that changes in LH secretion regulate the growth of the pre-ovulatory follicle in the ewe. *J. Endocr.* 90, 375-389, (1981).
18. Cahill, L.P., Saumande, J., Ravault, J.P., Blanc, M., Thimonier, J., Mariona, J.C. and Mauleon, P. Hormonal and follicular relationships in ewes of high and low ovulation rates. *J. Reprod. Fert.*, 62, 141-150 (1981).
19. Webb, R. and England, B.G. Identification of the ovulatory follicle in the ewe: Associated changes in follicle size, thecal and granulosa cell LH receptors, antral fluid steroids and circulating hormones during the pre-ovulatory period. *Endocrinology*, 110, 873-881, (1992).
20. Bindon, B.M., Piper, L. R., Hillard, M.A., O'shea, T. and Findlay, J.K. Endocrine basis of prolificacy in the Booroola Merino. In "isotope Aided Studies on Goat and Sheep Production in The Tropics", FAO/IAEA Proceeding series, p. 1-13, (1991).
21. Prakash, B.S., Meyer, H.H.D., Schallenberger, E. and Van de Wiel, D.F.M. Development of a sensitive enzyme immunoassay (EIA) for progesterone determination in unextracted bovine plasma using the second antibody technique. *J. Steroid Biochem.*, 28 (6), 623-627, 1987.
22. Scaramuzzi, R.J. and Radford, H.M. Factors regulating ovulation rate in the ewe: Associated changes in follicle size, thecal and granulosa cell LH receptors, antral fluid steroids and circulating hormones during the pre-ovulatory period. *Endocrinology*, 110, 873-881, (1982).