

不同繁殖节律母牦牛冷暖季血浆褪黑激素 RP-HPLC 测定

文勇立*, 王永, 齐莎日娜, 王艳红, 马力

(西南民族大学生命科学与技术学院, 成都 610041)

摘要: 为研究不同季节、不同繁殖节律和繁殖活动期与静止期成年母牦牛血浆 MLT 分泌水平的差异, 应用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)检测成年母牦牛血浆 MLT 浓度。供试母牦牛 63 头, 分为 A、B、C 3 组, 每组 21 头。A 组: 1 年 1 胎, 繁殖活动期; B 组: 2 年 1 胎, 全奶, 繁殖静止期; C 组: 2 年 1 胎, 半奶, 繁殖活动期。在暖季的 7 月 21-23 日和冷季的 11 月 21-23 日, 自然光制: 12.00L : 12.00D 和 14.65L : 9.35D, 日落前 2 h 开始采血, 持续 50 min, 颈静脉采血每头 20 mL, 肝素抗凝, 离心取血浆。1 年 1 胎母牦牛血浆 MLT 浓度((68.90±5.82) pg/mL) 高于 2 年 1 胎全奶个体((44.38±2.61) pg/mL) ($P < 0.01$) 和 2 年 1 胎半奶个体((57.51±3.82) pg/mL) ($P < 0.05$); 母牦牛血浆 MLT 浓度暖季高于冷季($P < 0.05$), 表明其具有季节波动, 并提示除光照外牦牛 MLT 分泌还与气温等环境因子有关; 母牦牛血浆 MLT 浓度繁殖活动期高于繁殖静止期($P < 0.05$)。母牦牛 MLT 分泌存在季节波动, 母牦牛季节性繁殖和繁殖节律受到 MLT 水平的影响。

关键词: 牦牛; 褪黑激素; 反相高效液相色谱法; 季节性繁殖; 繁殖节律

中图分类号: S823.8⁺5; S814.1

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2008)03-0302-07

Determination of Plasma Melatonin of Female Yaks with Different Reproductive Rhythms by Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography in Warm and Cold Seasons

WEN Yong-li*, WANG Yong, QI Sharina, WANG Yan-hong, MA Li

(College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China)

Abstract: The differences were studied among seasons, reproductive rhythms, breeding active and resting terms. The plasma concentrations of melatonin of adult female yaks were determined by reversed-phase high-performance liquid chromatography. A total of 63 adult female yaks were selected as experimental animals and divided into three groups: A with calving every year and breeding active term, B with calving per two years and full milking and breeding resting term, C with calving per two years and semi-milking and breeding active term. Each group had 21 yaks. In the sampling period of July 21-23 in warm season and November 21-23 in cold season, the yaks were exposed to 12.00 L : 12.00 D and 14.65 L : 9.35 D, respectively. Blood samples were collected for 50 minutes starting at 2 h before sunset. A quantity of 20 mL jugular vein blood was drawn from every animal and anticoagulated with heparin sodium. Plasma obtained after centrifugation was estimated for melatonin. The content of plasma melatonin of group A ((68.90±5.82) pg/mL) was higher than that of group B ((44.38±2.61) pg/mL) ($P < 0.01$) and group C

收稿日期: 2007-09-02

基金项目: 四川省应用基础项目“牦牛繁殖节律的分子调控机制研究”(05JY029-037-1); “牦牛主要经济性状生物学基础及分子调控研究”(07JY029-046)

作者简介: 文勇立(1959-), 男, 四川小金人, 教授, 博士, 主要从事牦牛遗传育种与生态研究

* 通讯作者: 文勇立, E-mail: wansit99@163.com

((57.51±3.82) pg/mL) ($P<0.05$). The content of plasma melatonin in cold season was lower than that in warm season ($P<0.05$). The level of plasma melatonin of yak cows in reproductive active term was higher than that of it in fallow term ($P<0.05$). There was a seasonal rhythm in the secretion of plasma melatonin of yak cows. The concentration of plasma melatonin had an effect on the seasonal breeding and reproductive rhythms of female yaks.

Key words: yak; melatonin; RP-HPLC; seasonal reproduction; reproductive rhythm

牦牛(*Bos Grunniens*)的生产性能取决于繁殖性能。放牧条件下,牦牛的繁殖率低,仅为 47.66%^[1],其原因一是母牦牛中存在 1 年产 1 胎、2 年产 1 胎及 3 年产 1 胎等多种不同繁殖节律的个体。据统计,2 年及 3 年产 1 胎个体占 71.16%^[2]。其次,受营养、气温、光照等环境条件周期性振荡的影响,牦牛的繁殖活动受到季节变化的限制,是典型的季节性繁殖动物。母牦牛集中在 7—9 月发情配种,翌年 4—6 月产犊^[3]。当年产犊的泌乳牦牛称为全奶牛;当年产犊,未发情配种,次年暖季继续泌乳,但乳量仅为全奶牛 50%左右的牦牛称半奶牛。2 年 1 胎牦牛的繁殖周期可分为繁殖活动期与静止期,从暖季第 1 个情期出现到次年产犊这段时间称为繁殖活动期,产犊后保持空怀且不发情,直到次年第 1 个情期出现前的这段时间,称为繁殖静止期。因此,2 年 1 胎全奶牦牛处于繁殖静止期,2 年 1 胎半奶牦牛处于繁殖活动期。有学者指出,仅靠外源生殖激素的方法难以有效改善牦牛的繁殖状况。重视环境、内分泌和遗传等因素的综合作用,深入研究牦牛的生殖生理机制,是解决繁殖水平低下的重要途径^[4-5]。研究显示,不同繁殖节律母牦牛血浆孕酮、17 β -雌二醇的波动以及卵巢原始卵泡数都存在差异^[6-7]。脊椎动物的褪黑激素(melatonin, MLT)主要由松果体分泌,属吲哚胺类活性最强的一种神经激素,具有多种生理功能,其中,对动物周期性繁殖的作用受到普遍关注。MLT 充当内分泌传感器,季节性光照周期的变化引起 MLT 分泌节律的改变,控制着季节性繁殖动物的生殖行为^[8-9]。MLT 昼夜波动相限、峰值持续时间、振幅、总量等对动物周期性繁殖均存在影响^[10-13]。MLT 影响牦牛繁殖节律的报道较少,张勇检测到母牦牛暖季血浆 MLT 分泌具有昼夜节律^[14]。Sarkar 等也证实牦牛在发情配种期和怀孕期血浆 MLT 分泌均存在昼夜波动,但未检测到两个时期之间是否有显著差异,Sarkar 等认为可能是 2 个采样时期自然光制(昼、夜时间比)较为接近所致^[15]。迄今为止,针对不同繁殖节律、繁殖

活动期与繁殖静止期母牦牛 MLT 分泌差异性的研究未见报道,有关牦牛 MLT 分泌的季节节律研究也未见更多报道。为此本试验在冷季和暖季选择自然光制相差较大的时期,对具有两种繁殖节律以及处于繁殖活动期与静止期的成年母牦牛血浆 MLT 水平进行反相高效液相色谱法(RP-HPLC)测定,以阐明繁殖节律、季节以及繁殖活动期与静止期 MLT 分泌的差异性,为深入研究牦牛 MLT 分泌的规律、MLT 调控牦牛繁殖节律和季节性繁殖的机制等提供依据。

1 材料与方法

1.1 血样采集

血样采集于四川省红原县境内的四川省龙日种畜场,该场位于青藏高原东南缘的川西北草地,东经 102°48'30",北纬 32°32',海拔 3 534.2 m。于 2005 年暖季和冷季进行 2 次采样(见表 1),7 和 11 月气温分别为 11.14 °C 和 -2.67 °C,相对湿度为 76.8% 和 65.8%,采样日自然光制 12.00 L:12.00 D 和 14.65 L:9.35 D。7 月牧草丰茂,营养充足;11 月牧草枯死,粗纤维含量高。供试成年母牦牛全放牧,年龄 9.5~10.5 岁,体重 190~240 kg,营养状况良好,发育繁殖史正常,无临床可见疾病。试验动物被分为 A、B、C 3 组,每组 21 头,共 63 头(见表 2)。7 和 8 月采集相同牦牛的血,每次采样分 3 d 完成,21 头/d,每组 7 头。每日采血时间定在日落前 2 h 开始,持续 50 min。颈静脉血,肝素抗凝,4 000 r/min 离心 10 min 取血浆。日出日没时间取自“中国科学院国家授时中心日出日没时刻查询系统”(Website: <http://www.time.ac.cn/serve/sunriset>) (见表 1)。

1.2 仪器及试剂

美国 Waters 公司 2695 高效液相色谱仪,2475 荧光检测器,配自动进样器及 Empower 工作站。KL512 数显氮吹仪(北京康林科技有限公司),TDL80-2B 高速离心机(上海安亭科学仪器厂),501

表 1 采样日期与日照时数

Table 1 Sampling date and sunlight hours

采样日期 Sampling date	日出时间 Sunup time	日没时间 Sunset time	日照时数 Sunlight hours/h
暖季 7.21—7.23	6:15—6:17	20:14—20:13	12
冷季 11.21—11.23	7:44—7:46	18:05	9.35

表 2 试验动物基本情况

Table 2 The basic information of experimental animals

组别 Groups	年龄/岁 Age	繁殖节律 Reproductive rhythm	泌乳状况 Milking status	繁殖状况 Breeding status	头数 N
A	10.5	1 年 1 胎 Calving every year	全奶 Full milking	活动期 Active	21
B	9.5	2 年 1 胎 Calving per two years	全奶 Full milking	静止期 Resting	21
C	10.5	2 年 1 胎 Calving per two years	半奶 Semi-milking	活动期 Active	21

型超声波清洗器(上海实验仪器厂有限公司)。甲醇、乙腈、二氯甲烷等均为色谱纯,MLT 标准品购于 Sigma 公司。

1.3 样品处理

取血浆 2.0 mL,加二氯甲烷 5 mL,涡旋震荡 3 min,4 000 r/min 离心 10 min,分离水层,重复提取,合并 2 次的二氯甲烷层。室温下,氮吹仪吹干,加 0.5 mL 流动相溶解,待测。

1.4 色谱条件优化

在文献[16-18]基础上进行改进和条件优化,比较流动相甲醇-水、甲醇-水-醋酸、甲醇-醋酸盐、乙腈-水的分离效果,同时对激发波长、发射波长、柱温、流速和进样量等条件进行筛选。

1.5 线性关系测定

1.5.1 标准贮备液 定量称取 MLT 标准品,流动相定容,制成 300 pg/mL 的标准溶液备用。

1.5.2 对照血浆 据文献记载,随年龄增长,松果体 MLT 钙化程度增加,分泌量下降^[19];暖季牦牛血浆 MLT 浓度昼夜变化以 19:00 时左右最低^[14]。因此选择 15 岁以上母牦牛 3 头,于 19:00 采血,经检测,混合血浆 MLT 水平为 6.5 pg/mL,以此作为对照血浆。

1.5.3 标准曲线 取不同量的 MLT 标准溶液于 10 mL 试管,氮吹仪吹干,加入 2 mL 对照血浆,使 MLT 标准品浓度分别为 0、7.12、14.24、28.48、71.20、142.40、284.80 pg/mL。按 1.3 方法处理。以进样浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,制作标准曲线。

1.6 回收率与精密度测定

按 1.5.3 方法配成 MLT 标准品浓度分别为 7.12、71.20、284.80 pg/mL 的溶液,首先各取 6 份按 1.3 方法处理,进行回收率测定;然后各取 5 份按 1.3 方法处理,于当日不同时间分别检测 3 种浓度的溶液,计算日内变异;另在连续 3 d 内分别检测 3 种浓度的溶液,计算日间变异。

1.7 数据处理与分析

计算公式:

MLT 浓度 = (样品峰面积 × 标样进样体积 × 样品定容体积 × 标样浓度) / (标样峰面积 × 样品进样体积 × 取样体积)

采用 SPSS13.0 对数据进行线性分析与多重比较。模型为:

$$\chi_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha_i\beta_j + \epsilon_{ijk}$$

其中 χ_{ijk} 表示 MLT 浓度; μ 表示总体均值; α_i 、 β_j 分别表示第 i 种繁殖节律和 j 季节产生的效应; $\alpha_i\beta_j$ 为繁殖节律与季节之间的互作效应; ϵ_{ijk} 表示误差项。

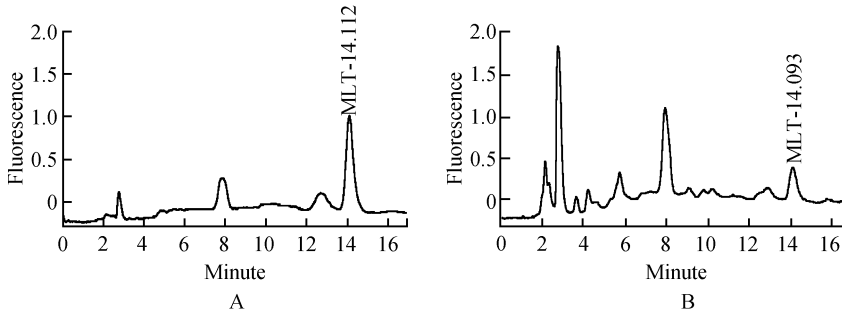
2 结果与分析

2.1 条件优化

优化结果为色谱柱: Waters 公司 Symmetry Shield™ RP18 色谱分析柱(5 μ m, 3.9 mm × 150 mm); 激发波长: 285 nm; 发射波长: 345 nm; 柱温: 25 °C; 流动相: 乙腈: 水 = 25/75 (V/V); 流速: 0.60 mL/min; 进样量: 5 μ L。在此优化条件下,标准品 MLT 的保留时间为 14.112 min,样品 MLT 的保留

时间为 14.093 min,二者基本一致。样品 MLT 峰与两侧的干扰峰之间完全可以区分,表明对牦牛血

浆 MLT 的检测有较好的专一性和分离效果(图 1)。



A. 标准品;B. 样品
A. Standard solution;B. Plasma sample

图 1 标准品与样品 MLT 的色谱图

Fig. 1 The chromatograms of MLT in (A) standard solution and (B) plasma sample

2.2 线性关系

在 7.12~284.80 pg/mL 之间,获得 1 条线性关系良好的直线(图 2),方程为: $y = -1894.21 + 537.98x$,相关系数 $r = 0.9998$ 。

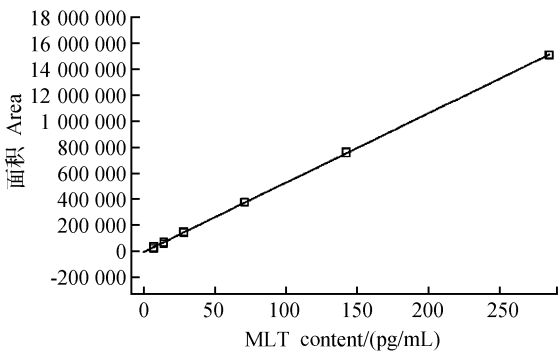


图 2 MLT 的标准曲线

Fig. 2 The standard curve of MLT

2.3 回收率与精密度

回收率测定结果见表 3。MLT 平均添加回收

率为 91.26%~94.52%,变异系数为 0.87%~1.97%,符合检测要求^[20]。

精密测定结果见表 4。从表 4 看出,日内变异相对标准差(RSD)为 2.37%~3.98%,日间变异相对标准差(RSD)为 6.55%~8.05%,符合检测要求^[20]。

2.4 成年母牦牛血浆 MLT 含量分析

2.4.1 线性模型分析 母牦牛血浆 MLT 含量的线性模型分析结果见表 5。模型、 α 、 β 的检验校能值为 0.97~1.00,表明样本量充足^[21];模型概率 $P < 0.01$,表明可以进行下一步分析; α 、 β 概率 $P < 0.01$,表明这 2 种因子效应极显著,也表明 2 个不同季节之间以及 3 种不同繁殖状况个体之间血浆 MLT 分泌差异极显著; $\alpha \times \beta$ 概率 $P > 0.05$,表明 2 因子的互作效应不显著;偏 Eta 平方值表示变异源占总变异的大小^[21],从表 5 看出, β 的偏 Eta 平方值略大于 α ,表明季节因子效应略占优势。

表 3 MLT 在血浆样品中的添加回收率(n=6)

Table 3 MLT recovery rate of plasma sample with MLT addition(n=6)

添加浓度/(pg/mL) Concentration of MLT addition	回收率 Recovery rate							平均回收率 Average recovery rate	变异系数 Coefficient of variability
7.12	89.50	91.32	90.11	90.25	93.55	92.85	91.26±1.63	1.78	
71.20	94.36	91.29	92.36	95.36	95.23	91.58	93.36±1.84	1.97	
284.80	95.21	93.25	94.56	94.21	95.58	94.32	94.52±0.82	0.87	

表 4 MLT 测定的精密度结果 (n=5)

Table 4 The result of precision of MLT measurement (n=5)

%

浓度/(pg/mL) Concentration	日内变异 RSD Variation in a day	日间变异 RSD Variation among 3 days
7.12	2.37	6.55
71.2	2.54	7.24
284.8	3.98	8.05

表 5 线性模型分析结果

Table 5 Results of general linear model analysis

变异来源 Source	概率 P	检验效能 Observed power	偏 Eta 平方 Partial Eta squared
模型 Model	0.00	1.00	0.24
截距 Intercept (μ)	0.00	1.00	0.83
繁殖节律 Reproductive rhythm (α)	0.00	0.98	0.12
季节 Season (β)	0.00	0.97	0.13
繁殖节律×季节 ($\alpha\times\beta$)	0.27	0.29	0.02

2.4.2 不同繁殖节律个体 MLT 水平 不同繁殖节律母牦牛血浆 MLT 含量见表 6,冷季和暖季各繁殖节律个体血浆 MLT 含量见表 7。从表 6 看出,A 组血浆 MLT 浓度分别高于 B 组($P<0.01$)和 C 组($P<0.05$)。从表 7 看出,暖季 A 组血浆 MLT 浓度分别高于同季的 B 组($P<0.01$)和 C 组($P<0.05$);冷季 A 组高于 B 组($P<0.01$),A 组也高于 C 组,但差异不显著($P>0.05$)。从繁殖生理条件看,1 年 1 胎全奶与 2 年 1 胎半奶个体都处于繁殖活动期,比较一致。虽然 2 者在冷季差异不显著,但暖季和两季平均值差异显著,表明 MLT 对母牦牛的繁殖节律具有影响。

表 6 不同繁殖节律母牦牛两季血浆 MLT 平均含量比较

Table 6 The comparison of yak cows' plasma MLT content of the two seasons among the different reproductive rhythm pg/mL

组别 Groups	MLT 平均含量 MLT content
A	68.90±5.82 ^{Ab}
B	44.38±2.61 ^{Bc}
C	57.51±3.82 ^b

数据肩标字母不同,表示差异显著($P<0.05$,小写字母)或差异极显著($P<0.01$,大写字母),下表同

Means with the different letter are significant different ($P<0.05$, small letter) or extremely significant different ($P<0.01$, capital letter), same as follow table

从表 6 还可看出,B 组 MLT 水平低于 C 组($P<0.01$);从表 7 看出,无论暖季或冷季,B 组 MLT 水平均低于 C 组,但差异都不显著($P>0.05$)。表明在单个季节内二者之间 MLT 水平虽然差异不显著,但从两季平均值看,差异显著,前者高于后者(表 6)。由于 B 组处于繁殖静止期,C 组处于繁殖活动期,表明繁殖活动期与静止期个体间血浆 MLT 水平存在差异,且繁殖活动期高于繁殖静止期。

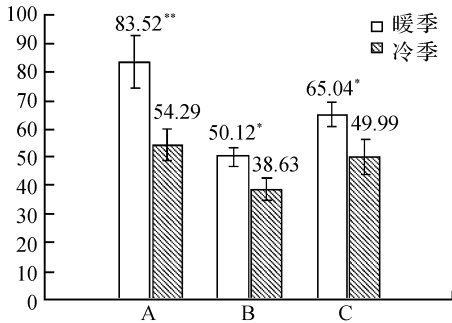
表 7 不同繁殖节律不同季节母牦牛血浆 MLT 含量比较

Table 7 The comparison of the female yak plasma MLT content between different reproductive

rhythm and seasons		pg/mL
季节 Seasons	组别 Goups	MLT 含量 MLT content
暖季 Warm	A	83.52±9.27 ^{Ab}
	B	50.12±3.14 ^B
	C	65.04±4.45 ^b
小计 Total		66.23±3.93
冷季 Cold	A	54.29±5.63 ^a
	B	38.63±3.85 ^b
	C	49.99±5.87
小计 Total		47.6±43.07

2.4.3 不同季节间 MLT 水平比较 母牦牛冷暖季血浆 MLT 水平见图 3:A 组血浆 MLT 水平暖季高于冷季($P<0.01$),B 和 C 组暖季分别高于冷季($P<0.05$)。由于 A 和 C 组均处于繁殖活动期,即

7 月采样时两组正值发情配种期,11 月采样时都处在妊娠期,而目前尚不清楚处在这两种生理阶段的母牦牛其 MLT 水平是否有差异,因此不能将 A 和 B 组间 MLT 水平差异完全解释为季节差异。但是对于 B 组来说,由于暖季和冷季都处于繁殖静止期,生理条件较为一致,因此该组 MLT 水平表现出的季节差异,表明母牦牛 MLT 分泌存在季节波动。



A. 1 年 1 胎; B. 2 年 1 胎全奶; C. 2 年 1 胎半奶。
* . $P < 0.05$; * . $P < 0.01$

A. Calving every year and full milking; B. Calving per two years and full milking; C. Calving per two years and semi-milking. * . $P < 0.01$; * . $P < 0.05$

图 3 冷暖季母牦牛血浆 MLT 分泌水平比较

Fig. 3 The comparison of plasma MLT secretion of yak cows between warm and cold seasons

3 讨论

本研究在人、鼠血浆 MLT RP-HPLC 检测方法基础上进行改进和条件优化,为牦牛血浆 MLT 检测建立了一种灵敏、快速、准确的 RP-HPLC 方法。文献[16]记载人血浆 MLT RP-HPLC 测定的流动相乙腈:水 = 40/60(V/V),本试验结果以乙腈:水 = 25/75(V/V)为最佳。柱温 25℃同文献[16],低于文献[17-18]报道的 40℃。流速 0.60 mL/min 高于文献[16]报道的 0.50 mL/min。MLT 保留时间 14.10 min 较文献[16]报道的 5.40 min 长,但稍短于文献[17-18]报道的 15 min。

哺乳动物和人血浆 MLT 浓度变化速度夜间高于白昼,午夜达到顶峰,日出时降到一个较低水平。白天 MLT 水平较低,变化较小,以日落前最低[22-23]。张勇报道,牦牛血浆 MLT 变化的昼夜节律相似于其他哺乳动物,8 月份检出牦牛血浆 MLT 浓度白天最低值为 64.56 pg/mL,夜间最高值为 268.53 pg/mL[14]。Sarkar 等也作了类似报道[15]。

本试验分别在冷暖两季的连续 3 d 内,选择在日没前 2 h 持续 50 min 采样,目的是使所测得的 MLT 浓度值在季节间具有可比性。本试验 7 月采样测得的 MLT 含量为 66.23 pg/mL(表 6),与张勇的报道基本吻合[14]。

本试验 1 年 1 胎个体血浆 MLT 浓度高于 2 年 1 胎全奶和半奶个体,表明母牦牛的繁殖节律受到 MLT 分泌水平的影响;2 年 1 胎半奶个体血浆 MLT 水平高于 2 年 1 胎全奶个体,显示繁殖活动期血浆 MLT 水平高于繁殖静止期;母牦牛血浆 MLT 浓度暖季高于冷季,存在季节波动,表明牦牛的季节性繁殖受到 MLT 分泌的影响。对羊的研究有类似报道,季节性繁殖的成年公羊血液 MLT 含量在不同季节之间差异显著,6 和 9 月血液中 MLT 含量比 3 和 12 月高[24]。有学者研究了几个不同绵羊品种血浆 MLT 的季节性变化,其中滩羊血浆 MLT 的季节性变化最显著[25]。Sarkar 等未检测到牦牛血浆 MLT 在发情、配种与妊娠期的差异,其原因之一,可能是由于两次采样时的昼夜持续时间相似(12.5L : 11.5D 与 11.5L : 12.5D),白昼时间相差仅 1 h 所致[15]。本试验 2 次采样白昼持续时间相差达 2.65 h(见表 1),因而获得与 Sarkar 不同的结果。其次,Sarkar 的试验动物都处于繁殖活动期,首次检测时间是在发情配种期,第 2 次检测时间是在妊娠 90 d 左右,由于目前尚不清楚牦牛妊娠生理变化与 MLT 分泌之间的关系,因而较难对两个时期血浆 MLT 水平的影响因素进行进一步分析。也有研究者认为,除光照外,MLT 分泌还与其它环境因子的季节性变化有关,如气温、气湿、营养等因子周期性变化对季节性繁殖动物的 MLT 分泌有较大影响[10]。因此牦牛 MLT 的分泌暖季高于冷季,提示此结果可能与气温、营养等环境因子周期变化有关,有待于进一步研究。

4 结论

母牦牛血浆 MLT 分泌暖季高于冷季($P < 0.05$),表明具有季节波动。1 年 1 胎母牦牛血浆 MLT 浓度高于 2 年 1 胎个体($P < 0.01$),繁殖活动期母牦牛血浆 MLT 水平高于繁殖静止期($P < 0.05$)。母牦牛的繁殖节律和季节性繁殖均受到 MLT 分泌水平的影响。

参考文献:

[1] 张君,冶成君,德科加,等.高原型牦牛繁育状况

- 调查[J]. 青海畜牧兽医杂志, 2005, 35(2): 176-178.
- [2] 中国牦牛学编写委员会. 中国牦牛学[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1989; 2 000.
- [3] GERALD W, HAN J L, LONG R J. The Yak (second edition) [M]. Bangkok, Thailand: the Regional Office for Asia and the Pacific Food and Agriculture Organization of the United Nation, 2003; 87-112.
- [4] 阎 萍, 潘和平. 环境因素对牦牛繁殖性能的影响[J]. 畜牧与兽医, 2004, 36(5): 15-16.
- [5] 张 君, 余四九. 高原型牦牛繁育状况及繁殖母牛体况调查[J]. 畜牧与兽医, 2005, 37(8): 21-22.
- [6] 张 寿, 常 兰, 王应安, 等. 不同繁殖类型牦牛发情前后血浆孕酮、17 β -雌二醇的测定[J]. 中国畜牧杂志, 2003, 39(5): 23-24.
- [7] 张 寿, 王应安, 常 兰, 等. 不同繁殖类型牦牛卵巢原始卵泡的观测[J]. 中国畜牧杂志, 2003, 39(4): 16-17.
- [8] HAFEZ E. Studies on the breeding season and reproduction of the ewe[J]. J Agric Sci Cambridge, 1952, 42: 189-191.
- [9] ORTAVANT R, PELLETIER J, RAVAUULT J P, et al. Photoperiod main proximal and distal factor of the circannual cycle of reproduction in farm animals[J]. Oxford Rev Reprod Biol, 1985, 7: 305-318.
- [10] DE REVIERS M M, TILLET Y, PELLETIER J. Melatonin binding sites in the brain of sheep exposed to light or pinealectomized[J]. Neurosci Lett, 1991, 121: 17-20.
- [11] CELIAJ I W, BENOIT M. Synchronization of the circannual reproductive rhythm of the ewe by discrete photoperiodic signals[J]. Biology of Reproduction, 1991, 45: 110-121.
- [12] SHEIKHELDIN M A, HOWLAND B E, PALMER W M. Seasonal profiles of melatonin in adult rams [J]. Journal of Pineal Research, 1992, 12(2): 58-67.
- [13] MALPAUX B, THIERY J C, CHEMINEAU P. Melatonin and the seasonal control of reproduction [J]. Reprod Nutr Dev, 1999, 39: 355-364.
- [14] 张 勇. 双峰驼和牦牛繁殖季节褪黑素与促性腺激素之间的关系[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2000.
- [15] SARKAR M, PRAKASH B S. Circadian variations in plasma concentrations of melatonin and prolactin during breeding and non-breeding seasons in yak[J]. Animal Reproduction Science, 2005, 90: 149-162.
- [16] 胡世莲, 徐维平, 王卫东, 等. 高效液相色谱法测定人血清中褪黑素的浓度[J]. 中国临床保健杂志, 2005, 8(3): 1.
- [17] IINUMA F, HAMASE K, MATSUBAYASHI S, et al. Sensitive determination of melatonin by precolumn derivatization and reversed-phase high-performance liquid chromatography[J]. Journal of Chromatogr A, 1999, 835(1-2): 67-72.
- [18] HAMASE K, TOMITA T, KIYOMIZU A, et al. Determination of pineal melatonin by precolumn derivatization reversed-phase high-performance liquid chromatography and its application to the study of circadian rhythm in rats and mice[J]. Analytical Biochemistry, 2000, 279(1): 106-110.
- [19] SCHMID H A, REQUINTINA P J, OXENKRUG C F, et al. Calcium, calcification and melatonin biosynthesis in human pineal gland[J]. Journal of Pineal Research, 1994, 16(2): 178.
- [20] 张玉奎, 王 杰, 张维冰, 译. 实用高效液相色谱法的建立[M]. 第2版. 北京: 华文出版社, 2001: 679, 692.
- [21] 张 彤. SPSS 统计分析教程(高级篇)[M]. 北京: 北京希望电子出版社, 2002: 2-14.
- [22] VAUGHAN G M, PELHAM R W, F PANG S, et al. Nocturnal elevation of plasma melatonin and urinary 5-hydroxyindoleacetic acid in young men: attempts at modification by brief changes in environmental lighting and sleep and by autonomic drugs[J]. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1976, 42: 752-764.
- [23] KENNAWAY D J, SANFORD L M, GODFREY B. Patterns of progesterone melatonin and prolactin secretion in ewes maintained in four different photoperiods[J]. J Endocrinology, 1983, 97: 229-242.
- [24] KARSCH F J, BITTMAN E L, ROBINSON J E. Melatonin and photorefractoriness, loss of response to the melatonin signal leads to seasonal reproductive transitions in the ewe[J]. Biology of Reproduction, 1986, 34: 265-278.
- [25] 陈玉林, 张小辉. 不同绵羊品种褪黑激素的季节性及昼夜变化规律研究[J]. 家畜生态学报, 2005, 26(1): 35-38.