

VOORTPLANTINGSKARAKTERISTIEKEN EN MOGELIJKHEDEN VAN GEASSISTEERDE VOORTPLANTING BIJ DE WATERBUFFEL (*BUBALUS BUBALIS*)

J.M.J. Aerts¹, H.A.M. Hendriks², R.M. Züge³, P.E.J. Bols¹

¹Laboratorium voor de Fysiologie van de Huisdieren, Universiteit Antwerpen,
Departement Diergeneeskunde, Universiteitsplein 1, Gebouw U, B-2610, Wilrijk

²Dierenartsenpraktijk 'Ell', Meidoornstraat 15, 6011 RT Ell, Nederland

³Paraná Institute of Technology – TECPAR, Curitiba, Paraná, Brazil

SAMENVATTING

Het belang van de buffelhouderij op wereldschaal is de laatste jaren zeer sterk gegroeid, wat zich vertaalt in een toename van het wetenschappelijk onderzoek van dit onderwerp.

In meerdere landen van Oost-Europa en het Middellandse-Zeegebied maken buffels van oudsher een belangrijk deel uit van de veestapel. Recent werden rivierbuffels ook geïntroduceerd in het Verenigd Koninkrijk, Spanje en Nederland, waar een aantal melkveehouders is overgeschakeld op het houden van buffels. In Italië is de buffelsector sedert 1950 aan een ware heropleving begonnen.

Als voornaamste oorzaak van de Europese belangstelling voor deze soort kan de productie van mozzarella worden aangehaald, één van de weinige agrarische producten waarvoor er binnen de Europese Gemeenschap geen overproductie bestaat.

De belangrijkste rem op de productiviteit van de rivierbuffel situeert zich op het vlak van de voortplanting. In dit overzichtsartikel wordt dieper ingegaan op de reproductiekenmerken van de buffel, en wordt de bijdrage belicht die de geassisteerde voortplanting kan leveren aan het verbeteren van de buffelproductiviteit.

INLEIDING

Het belang van de buffelhouderij neemt sinds de laatste jaren zeer sterk toe, waardoor ook binnen het Europees wetenschappelijk onderzoek deze soort nu meer en meer aandacht krijgt. In 2002 werd het aantal buffels op wereldvlak geschat op zo'n 166 miljoen, waarvan 97% gelokaliseerd in Azië. Daartegenover stonden op hetzelfde moment ongeveer 1,36 miljard runderen (statistiek FAO). De buffelpopulatie groeit jaarlijks aan met gemiddeld 1,5%, de runderpopulatie met gemiddeld 0,8%. De buffel maakt een zeer belangrijk onderdeel uit van de veehouderij in het landbouwsysteem van vele ontwikkelingslanden, waar bij hij zorgt voor melk- en vleesproductie en trekkracht.

De buffel behoort tot de subfamilie van de *Bovidae*, genus *Bubalus*, waardoor hij verwant is aan, maar verschillend van, de bizon (genus *Bison*), de yak (genus *Peophagus*), de Afrikaanse buffel (genus *Syncerus*) en het rund (genus *Bos*). Hij stamt oorspronkelijk uit de Indo-Gangetische vlakte waar de domesticatie reeds begon vanaf 3000 vóór Christus. (Cock-

rill, 1974). De huidige gedomesticeerde buffel stamt af van de wilde Aziatische buffel (*Bubalus arnee*) en wordt onderverdeeld in twee species: de rivierbuffel of waterbuffel (*Bubalus bubalis*) en de moerasbuffel (*Bubalus carabensis*). Beide species verschillen aanzienlijk van elkaar wat betreft de morfologie, het voorkomen en het gebruik van de beide species. Zo beschikt de moerasbuffel over 48 en de rivierbuffel over 50 chromosomen. Kruisingen zijn mogelijk en geven fertiele nakomelingen (Xiao, 1988; Benjamin, 1996). De moerasbuffel komt voor in Zuid-Oost Azië en China, waar hij voornamelijk gebruikt wordt als last- en trekdier, voor de productie van brandstof op basis van mest, en in mindere mate voor de vleesproductie. De melkproductie is met 1 tot 1,5 liter per dag veelal ondermaats en daardoor van weinig betekenis. In tegenstelling tot de rivierbuffel is de moerasbuffel niet gediifferentieerd in verschillende rassen. Hij is meestal donkergrijs (soms zwart, zwart-wit of wit), en heeft lange, weinig gekrulde horens.

De rivierbuffel is de meest belangrijke van de twee en vertegenwoordigt ongeveer 70% van de wereldbuffelpopulatie. Hij komt voor op het Indische subcontinent, het Midden-Oosten, het Middellandse-Zeegebied, Zuid-Amerika en de Caraïben, waarbij hij voornamelijk wordt gehouden voor de melkproductie. In een traditioneel uitgebaat landbouwbedrijf worden gemiddelde producties van 6 tot 7 liter melk per dag gehaald. Daarnaast is zijn functie als last- en trekdier niet te verwaarlozen, en neemt zijn belang als vleesproducent voortdurend toe. De rivierbuffel is meestal zwart en heeft lange, sterk gekrulde horens (Figuur 1). Het kerngebied van de rivierbuffel is India en Pakistan waar een intensieve uitbating geleid heeft tot het ontstaan van verschillende rassen, waarvan Nilli-Ravi, Murrah, Surti, Jafarabadi, Kundi, Nagpuri, Bhadawari en Mehsana de belangrijkste zijn.

Het verbeteren van het genetisch potentieel voor de productie van melk en vlees is reeds tientallen jaren een grote bekommernis in de landen waar de buffelproductie een belangrijke plaats inneemt. De fragmentatie van de dieren over zeer kleine bestanden (2 tot 10 dieren), het lange generatie-interval en de algemeen lagere reproductieve werkzaamheid blijken de voornaamste struikelblokken te zijn voor een spectaculaire vooruitgang. Veel hoop wordt gesteld in de zeer snelle ontwikkeling van de geassisteerde voortplantingstechnieken bij het rund, die hogergenoemde problemen wellicht geheel of gedeeltelijk kunnen oplossen. In dit overzichtsartikel wordt het belang van de buffelhouderij in Europa kort geschetst en wordt dieper ingegaan op de belangrijkste reproductie-karakteristieken van deze species. Verder wordt het gebruik van technieken uit de geassisteerde voortplanting bij het rund voor de reproductie van de buffel toegelicht.

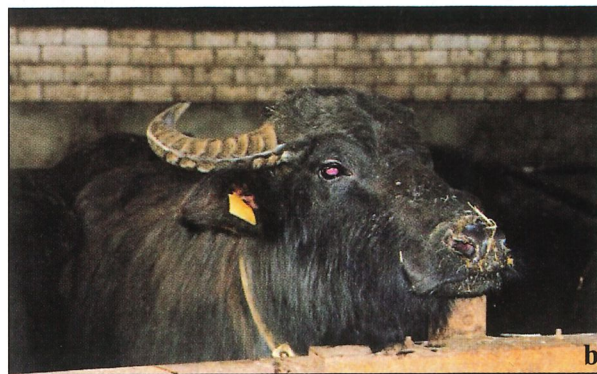
BUFFELHOUDERIJ IN EUROPA

In meerdere Europese landen maken rivierbuffels van oudsher deel uit van de veestapel, waarbij de herkomst van deze dieren meestal niet meer te achterhalen is. In een aantal Oost-Europese landen zijn deze buffelpopulaties, hetzij door de collectivisering van de landbouw, hetzij door de recente sociale en politieke evoluties, sterk in omvang verminderd. Zo werden in Bulgarije vele buffels geslacht bij het opdoeken van de coöperatieve landbouwbedrijven. In Griekenland, waar rond 1950 nog 75 000 buffels werden geteld, werd de populatie door mechanisering van de landbouw en introductie van hoogproductieve melkkoei-

en de voorbije decennia gedecimeerd (Moioli *et al.*, 2001), zodat er in 2002 nog slechts ongeveer 750 dieren aanwezig waren. Aanzienlijke buffelpopulaties bestaan nu nog in Turkije en Italië: respectievelijk 130 000 en 190 000 dieren in 2002 (statistiek FAO).

De buffelhouderij in Italië kende een dieptepunt in de 19^{de} en de eerste helft van de 20^{ste} eeuw - in 1950 telde de kudde nog maar 5000 dieren - maar is sedertdien aan een ware heropleving begonnen. De belangrijkste troef van de Italiaanse buffelhouderij is de productie van mozzarellakaas, één van de weinige agrarische producten waarvan er binnen de Europese Unie geen overproductie bestaat (Bartocci *et al.*, 2002). Buffelmelk heeft een vetgehalte van gemiddeld 8,6% en een eiwitgehalte van gemiddeld 4,5% (Rosati en Van Vleck, 2002), waardoor ze zeer geschikt is voor de productie van zachte kazen. De grote vraag naar mozzarella, in combinatie met het ontbreken van quota voor buffelmelk binnen de Europese Gemeenschap, hebben geleid tot de spectaculaire toename van het aantal buffels in Italië sedert 1950 (Bartocci *et al.*, 2002). Recent werden buffels ook geïntroduceerd in een aantal West-Europese landen, zoals het Verenigd Koninkrijk (VK), Spanje en Nederland. In 1991 werden voor het eerst 12 buffels vanuit Italië ingevoerd in het VK, waar er ondertussen minstens 14 verschillende kuddes zijn met in totaal ongeveer 850 dieren. Daarnaast werd een "Water Buffalo Co-operative" opgericht om de afzet, distributie en marketing van buffelmelk en -vlees te bevorderen. Ook in het Nederlandse Limburg zijn sinds 2000 een drietal veehouders overgeschakeld van melkvee naar het houden van buffels (Hendriks en Wiersema 2001; Hendriks, 2002). Inmiddels worden zo'n 250 dieren gemolken (Figuur 2).

De huidige belangstelling voor en het succes van de buffel kunnen verklaard worden vanuit de dynamiek van vraag en aanbod. Van consumentenzijde is er enerzijds een vraag naar gezonde, "groene" producten, waaraan buffelvlees en -melk met hun laag cholesterolgehalte en het BSE-vrije imago, perfect beantwoorden. Anderzijds is er de grote vraag naar mozzarella en, vanuit de Aziatische gemeenschap, naar andere van buffelmelk afgeleide producten, zoals ghee en makhan. Langs de aanbodzijde is er de overproductie van koemelk binnen de Europese Gemeenschap, die geleid heeft tot de invoer van melkquota. Voor buffelmelk bestaan dergelijke productiebegrensende maatregelen (nog) niet. Met de uitbreiding van de Europese Unie naar het oosten kan het belang van de buffelhouderij in de toekomst in Europa toenemen.



Figuur 1. De water- of rivierbuffel zoals hij a) in het noorden van Brazilië (Pará), maar recent ook in b) Nederland (Ell, Zuid-Limburg) wordt gehouden.



Figuur 2. De buffelhouderij in Nederland. Een aantal melkveehouders zijn overgeschakeld op het houden van buffels waarbij de dieren gehuisvest worden in een standaard loopstal voor rundvee.

De productie van buffels in West-Europese landen situeert zich vrijwel uitsluitend op het vlak van vlees en melk. Wat de melkproductie per lactatie betreft is de buffel duidelijk ondergeschikt aan onze hoogproductieve melkkoeien (Rosati en Van Vleck, 2002). Daar staat tegenover dat buffelmelk aanzienlijk meer vet en eiwit bevat (zie hoger). Bovendien bevat buffelmelk minder cholesterol, wat een belangrijk argument kan zijn bij de vermarkting. De dieren zijn, in tegenstelling tot wat dikwijls gedacht wordt, zeer handelbaar, vrij rustig en erg geïnteresseerd in hun onmiddellijke omgeving. Daardoor kunnen ze gehouden worden in de normale rundveelooptallen (Figuur 2) en kan het melken gebeuren in gewone melkstallen, waarbij wordt aangeraden te melken met een iets hoger vacuum (48 kPa) (Hendriks, 2002). Er wordt een standaard lactatieduur van 270 dagen gehanteerd. De gemiddelde melkproductie kan gesitueerd worden tussen 7 en 9 kg per dag. In Italië, waar de hoogste melkproducties bij buffels worden genoteerd, produceert een buffel gemiddeld 2 145 kg per 270 dagen (International Committee for Animal Recording - ICAR, 2000). Naarmate de dracht vordert, daalt de melkproductie merkbaar, waardoor de buffelkoeien als het ware zichzelf droog zetten. Het gebruik van droogzetters blijft vooralsnog overbodig. De lengte van de droogstand kan zodoende 3 tot 4

maanden bedragen. In het algemeen wordt aangenomen dat de buffel nog vrij resistent is tegen de klassieke rundveepathologieën. Mastitis komt bij buffels zelden voor. Hetzelfde geldt voor melkziekte, retentio secundinarum of lebmaagverplaatsingen. De buffel heeft dan ook een langere levensduur dan de hoogproductieve melkkoe. In Italië zijn dieren met 15 lactaties geen uitzondering (Hendriks, 2002), en in het voormalige Joegoslavië werden vele buffelkoeien 20 jaar en ouder (Bunevski, 2000).

Buffelvlees bevat gemiddeld 40% minder cholesterol dan rundvlees (Vale, 2002), wat een meerwaarde zou kunnen betekenen bij het vermarkten als "gezond" vlees. Dit vereist echter een apart distributien marketingcircuit. In Nederland is het aanbod buffelvlees nog te beperkt, en wordt het vlees aangeboden in het reguliere vleescircuit. Buffelstiertjes worden er op een leeftijd van 10 à 11 maanden geslacht als rosé-kalveren (Hendriks, 2002).

BELANGRIJKE REPRODUCTIEKARAKTERISTIEKEN

De buffel bereikt zijn seksuele rijpheid vrij laat: op een leeftijd van 16 tot 18 maanden mag men een regelmatige oestrus verwachten (El-Ashry, 1988). De cyclus duurt gemiddeld ongeveer 21 dagen, hoewel er

aanzienlijke verschillen bestaan in cyclusduur bij de diverse buffelsoorten, afhankelijk van verschillende rurale condities (Madan, 1988). De gemiddelde duur van de oestrus, die in grote mate wordt bepaald door het seizoen, is iets langer bij de rivierbuffel dan bij de moerasbuffel, met respectievelijk 23,8 en 19,9 uur (Singh *et al.*, 2000). 'Stille' tekenen van bronst bij de rivierbuffel zijn onder andere een daling van de melkgift, zwelling van de vulva, bronstgeroep, en een mucuze vulva-uitvloeit (Danell *et al.*, 1984). Het interval tussen het einde van de oestrus en de ovulatie wordt gemiddeld geschat op 12 tot 24 uur.

De leeftijd bij de eerste kalving bedraagt gemiddeld 41,8 maanden in Italië, 39,6 maanden in Bulgarije en 34 maanden in het VK (ICAR, 2000). De dracht bij een buffel duurt ca. 311 dagen, ongeveer een maand langer dan bij het rund. Zowel in het VK als in Nederland heeft men een verhoogde incidentie van vaginaprolaps en prolaps uteri vastgesteld, waarvan de oorzaak op dit moment wordt gezocht in een suboptimaal voederrantsoen (Wiersema, persoonlijke communicatie). De kalving zelf verloopt vrijwel steeds probleemloos. Een buffelkalf weegt bij de geboorte zo'n 35 à 40 kg. Het gewicht van een volwassen buffel bedraagt 500 à 600 kg. Om maximaal te kunnen renderen, zou een buffelkoe binnen de 80 à 90 dagen na de partus opnieuw moeten gedekt worden, zodat iedere 13 tot 13,5 maanden een nieuwe lactatie kan starten (Abdalla, 2002). Tussenkalftijden (TKT) van meer dan 400 dagen zijn helaas geen uitzondering. De gemiddelde TKT in Bulgarije bedraagt 475,3 dagen, terwijl men in het VK beter doet met een TKT van 397 dagen (ICAR, 2000). In West-Europa is de buffel een 'korte dag kweker' waardoor de herfst het optimale seizoen is voor de voortplanting. Buffelkoeien die niet drachtig worden in het najaar, zouden in anoestrus kunnen gaan tot in september van het daaropvolgende jaar.

Algemeen wordt de reproductie van de buffel beschouwd als de belangrijkste rem op productiviteit omdat er zich een aantal specifieke problemen stellen (Madan, 1988; Singh *et al.*, 2000; Nandi *et al.*, 2002). Zo bereiken jonge dieren op relatief late leeftijd hun seksuele maturiteit (zie hoger), vertonen de dieren een seizoengebonden anoestrus en komt de tochtigheid dikwijls slecht tot expressie. Vaak ziet men tevens een lange postpartum anoestrus, wat resulteert in lange TKT's. Nochtans zijn er ook onderzoekers die ervan uitgaan dat onder de juiste managementcondities, de voortplanting niet noodzakelijk een belemmering hoeft te zijn voor de productiviteit. Zo zou bij continue aanwezigheid van de stier en gebruikma-

kend van natuurlijke dekking, een TKT van minder dan 400 dagen goed te realiseren zijn (Zicarelli, 1994). Mogelijk kan de toepassing van technieken uit de geassisteerde voortplanting bepaalde problemen (gedeeltelijk) oplossen (zie verder).

FOLLICULAIRE DYNAMIEK EN ENDOCRIENE PROFIELEN

De ovaria van de buffelkoe zijn over het algemeen langwerpiger en beduidend kleiner dan de ovaria van de koe. Bij de buffel ligt een functioneel corpus luteum (CL) dikwijls diep ingebed in het ovariële stroma en het is tegelijk ook kleiner dan het CL bij het rund. Onderzoek van slachthuisovaria van buffels (Danell, 1987) toonde aan dat ovulaties in gelijke mate optreden op het linker en het rechter ovarium. Beide ovaria blijken te beschikken over ongeveer hetzelfde aantal primordiale follikels, met een totaal aantal dat geschat wordt op 10 000 tot 12 000, terwijl bij het rund 60 000 tot 100 000 primordiale follikels worden geteld (Danell, 1987). In een onderzoek van Erickson (1966) werd de reserve aan primordiale follikels van het rund bij de geboorte geschat op 130 000, een aantal dat verder afneemt tot 3000 op een leeftijd van 20 jaar. Bovendien bevatten buffelovaria slechts 20% van het aantal antrale follikels dat wordt teruggevonden bij de koe (Ty *et al.*, 1989). De folliculaire activiteit treedt op in golven, zoals ook bij het rund het geval is (Taneja *et al.*, 1996). Daarbij vertoont twee derde van de buffels tijdens het voortplantingsseizoen twee golven en één derde, drie golven van folliculaire activiteit per cyclus (Baruselli *et al.*, 1997).

In het algemeen sluiten de endocriene profielen die worden opgetekend bij de buffels nauw aan bij deze van het rund. Tijdens de oestrus is de progesteronconcentratie minimaal en blijft 3 tot 4 dagen stabiel rond 1 ng/ml (Arora en Panday, 1982). De eerste belangrijke stijging van de progesteronconcentratie treedt 7 dagen na het einde van de oestrus op (Ahmed *et al.*, 1977), terwijl de maximale waarden van 4 tot 5,1 ng/ml worden gemeten 15 dagen na de oestrus (Arora en Panday, 1982; Takkar *et al.*, 1983). Piekconcentraties oestradiol (30 tot 35 pg/ml) worden gemeten tijdens de oestrus of een dag ervoor (Batra en Pandey, 1982), waarna een daling optreedt tot op het niveau van 5-10 pg/ml binnen twee dagen. De concentratie van luteïniserend hormoon (LH) piekt bij het begin van de oestrus, gevolgd door een zeer scherpe daling binnen de 24 uur. De LH-concentratie blijft laag tij-

dens de luteale fase. De duur van de LH-piek wordt geschat op 7 tot 12 uur (Kanai en Shimizu, 1986).

SEIZOENGEBONDEN VRUCHTBAARHEID

Een zeer typisch verschijnsel, zeker wanneer de buffel wordt vergeleken met de koe, is het voorkomen van een seizoengebonden vruchtbaarheid en voortplanting. Buffels zijn met andere woorden 'seizoenkwekers' met een zeer duidelijk seizoenpatroon in het voortplantingsgedrag, meer specifiek met betrekking tot de oestrusexpressie, de bevruchtingspercentages en het aantal kalvingen (Tailor *et al.* 1990). Uit experimenteel werk van Shah in Pakistan (1988) blijkt dat de paringsfrequentie bij buffels het hoogst is gedurende de winter, afneemt in de herfst en de lente en zeer laag is tijdens de zomer. Bij zebukoeien, die in exact dezelfde omstandigheden werden aangehouden, kon een tegenovergesteld patroon waargenomen worden met de hoogste deactiviteit gedurende de zomer. Ook het interval tussen partus en eerste postpartum oestrus wordt sterk beïnvloed door het seizoen van afkalven. Zo bleek bij buffels die kalfden van februari tot mei de ovariële activiteit slechts opnieuw op gang te komen na een periode van 116 tot 148 dagen. Buffels die afkalfden tijdens de rest van het jaar, bleken daarvoor slechts 38 tot 64 dagen nodig te hebben (Singh en Nanda *et al.*, 1993). Daarbij bleken de bevruchtingspercentages lager tussen februari en augustus en het aantal nodige dekkingen per drachtig dier hoger bij dieren die afkalfden in de zomer. Onderzoek van Singh *et al.* (1989) toonde aan dat onder rurale omstandigheden in Punjab (India, extreme temperaturen tussen 0 en 46 °C, daglengte 10 tot 14 uur) 58% van de buffels drachtig was gedurende de hete zomermaanden, waarbij drie kwart van de niet-drachtige dieren gedurende deze periode in anoestrus verkeerden. De onderdrukking van de reproductieve activiteit gedurende de zomer uit zich verder in suboestrus (stille oestrus) met een kortere oestrusduur, een verlenging van het interval oestrus/ovulatie en een globale daling van het aantal ovulatoire cyclussen gedurende de zomer. Echte anoestrus, die gedefiniëerd werd als de afwezigheid van grote follikels en corpora lutea op de ovaria, kwam bij 78% van de dieren voor in de maand juli, maar slechts bij 14% in november (Singh *et al.*, 1985). Daar dient aan toegevoegd dat gedurende de hete zomermaanden het gebrek aan libido en een achteruitgang van de spermakwaliteit (zie verder) ook een negatieve invloed hebben op de fertiliteit.

Het is niet geheel duidelijk in welke mate het seizoengebonden voortplantingsgedrag genetisch bepaald is en in welke mate het beïnvloed wordt door omgevingsfactoren. Er zijn in de literatuur aanwijzingen voor een sterke invloed van meteorologische factoren op het endocriene systeem bij de buffel. Bovendien kan het seizoenpatroon ook gedeeltelijk veroorzaakt worden door een tekort aan groenvoeder gedurende de hete zomermaanden. Het is tevens duidelijk dat de terugloop in de seksuele activiteit gekoppeld is aan een stijging van de gemiddelde temperatuur en een toename van de daglengte. Duidelijk meer buffels vertonen oestrus gedurende de periode met korte daglengte dan gedurende de periode waarin de dagen langer zijn (respectievelijk 74% versus 26%, Tailor *et al.*, 1990), wat pleit voor de buffel als 'kortedag kweker'.

GEASSISTEERDE VOORTPLANTING

Sperma

Het afnemen en het bewaren van buffelsperma verlopen grotendeels zoals bij het rund. Zo kan men de buffelstier ook laten dekken terwijl men het sperma opvangt in een kunstvagina waarin een temperatuur heerst van 39-41 °C. Eén collectie bestaat gewoonlijk uit twee ejaculaten die worden afgenomen met een tussentijd van ongeveer een half uur. De voornaamste karakteristieken van buffelsperma zijn samengevat in Tabel 1.

De kleur en de viscositeit van het buffelsperma variëren naargelang de concentratie aan spermatozoïden. Het volume van het ejaculaat is mede afhankelijk van de leeftijd van de stier, waarbij oudere stieren gewoonlijk een volumineuzer ejaculaat produceren. Sterke individuele verschillen worden gerapporteerd tussen verschillende stieren, met een variatie in het

Tabel 1. Karakteristieken van buffelsperma na afname met een kunstvagina (Vale, 1994).

Kleur	Melkwit, lichtblauwe schijn
Volume	3 (2 tot 8) ml
Motiliteit	> 70%
Concentratie (spermatozoa/ml)	600,10 ⁶ - 1200,10 ⁶
% Levende spermatozoïden	> 70%
pH	6,7 - 7,5
% Abnormale spermatozoïden	< 70%

percentage beweeglijke spermatozoa van 40 tot 80%. Een ejaculaat waarin meer dan 30% initieel dode spermatozoa voorkomen, wordt beschouwd als ongeschikt voor bewaring of invriezen. Afwijkingen van de spermatozoa worden, net zoals bij het rund, onderverdeeld in kop-, middenstuk- of staartaafwijkingen en komen respectievelijk gemiddeld aan een frequentie van 6%, <1% en 3-6% voor. Ondanks het feit dat acrosoomafwijkingen en storingsen in de membraanintegriteit voorkomen, bleek meer dan 90% van de geobserveerde spermatozoa over een intact acrosoom te beschikken (Aguilar *et al.*, 1994; Kumar *et al.*, 1993). Meerdere auteurs beweren dat ook bij de buffelstier het seizoen een belangrijke rol kan spelen met betrekking tot de kwaliteit en de invriesbaarheid van het sperma. Zo blijkt de spermakwaliteit in meer gematigde, mediterrane gebieden beter tijdens de winter en de lente dan tijdens de zomer en de herfst (Galli *et al.*, 1993). In het warme en vochtige tropische Amazonegebied bleek de beste spermakwaliteit aanwezig tussen januari en juni (Vale, 1994). Tegen alle verwachtingen in zijn buffels wel degelijk gevoelig voor hittestress, waardoor er een terugloop in de kwaliteit van het sperma optreedt gedurende de heetste perioden van het jaar. Verder blijken ook het algemene management, de voeding en de leeftijd van de buffelstier een grote invloed op de spermakwaliteit te hebben. Het morfologisch beste sperma wordt gewonnen van stieren tussen de 3 en 5 jaar oud (Kumar *et al.*, 1993) en net zoals bij het rund, blijken ook bij de buffel grote individuele verschillen te bestaan in spermakwaliteit tussen de verschillende stieren (Galli *et al.*, 1993; Kumar *et al.*, 1993). Buffelsperma kan voor een periode van ongeveer 72 uur worden opgeslagen bij 5 °C zonder een significante daling van de motiliteit en mits toevoeging van een geschikte spermaverdunner (Dhami en Sahni, 1994), zoals de veelgebruikte ontvette koemelk, Tris-verdunner (hydroxymethylaminomethaan) of eidooier gemengd met citraat of lactose (Sansone *et al.*, 2000). Er blijken in de literatuur echter weinig betrouwbare publicaties voorhanden omtrent de vruchtbaarheid van vloeibaar gestockeerd sperma. Een meer routinematig toegepaste methode van bewaring is het diepvriezen van sperma en het bewaren in vloeibare stikstof, na toevoeging van verdunners en cryoprotectantia. Als verdunners worden ook hier combinaties gebruikt van Tris-fructose-eidooier, citraat-eidooier en lactose-eidooier, die alle een min of meer gelijkwaardige bescherming van het sperma garanderen (Dhami en Sahni, 1994). Het gebruik van de Tris-verdunner resulteerde in een iets hogere motiliteit van

de spermatozoa na het ontdooien. Galli *et al.* (1993) suggereerden dat verschillen in de effecten van de verschillende verdunners, die bij gebruik bij de stier veel minder duidelijk zijn, een aanwijzing zijn voor het feit dat buffelspermatozoa veel gevoeliger zijn voor invriesstress en beschadigingen, wat ook wordt bevestigd door Raizada *et al.* (1990). De lagere invriesbaarheid zou haar oorsprong vinden in een lagere concentratie van membraanfosfolipiden. Zowel eidooier als glycerol wordt gebruikt als cryoprotectant, aan een respectievelijke concentratie van 20% en 6 tot 7%. Voor meer specifieke informatie, zoals invriesprotocollen en biochemische samenstelling van het semen na het invriezen, kan men terecht in het recente overzichtsartikel van Sansone *et al.* (2000).

Kunstmatige inseminatie

KI wordt, net zoals bij het rund, al geruime tijd bij buffels toegepast. Het eerste buffelkalf na KI werd in 1943 geboren (Ranjhan en Pathak, 1993). Merkwaaardig genoeg liggen de grootste problemen bij het gebruik van KI met diepgevroren sperma bij buffels niet bij de invriestechniek zelf maar bij de implementatie van de KI op het terrein. De meest voorkomende problemen zijn het gebrek aan hygiënische omstandigheden, de oestrusdetectie, de inseminatiemethode zelf en het moment van insemineren (Vale, 1997). De oestrusdetectie is dikwijls problematisch omwille van de slechte oestrusexpressie (Ohashi, 1994) en het feit dat buffelkoeien zeer dikwijls volledig met modder zijn besmeurd, wat de waarneming van uitwendige tekenen van oestrus belemmert. De meest betrouwbare symptomen van de tochtigheid, zwelling van de vulva en vaginale uitvloeï, zijn bovendien niet steeds aanwezig (Danell, 1987). Zicarelli en zijn medewerkers (1997) toonden aan dat buffelkoeien die gehouden worden in aanwezigheid van een gevasectomiseerde zoekstier, duidelijk verhoogde drachtigheidspercentages vertoonden na KI, volgend op een natuurlijke (42,5 versus 18,9%) én een geïnduceerde bronst (51,1 versus 33,3%). In Australië bereikt men onder optimale condities van sperma-afname en -bewaring een drachtigheidspercentage van 33% na één enkele inseminatie bij het moerastype buffel (Tatham, 2000), wat beduidend lager ligt dan bij het rund (60-70%). De grote invloed van de omgevingsfactoren in dit verband werd ook geïllustreerd door Villa en Fabbri (1993) die een KI-studie opzetten op buffelhouderijen in drie verschillende Italiaanse provincies. Zij pasten daartoe KI toe volgens een gestandaardiseerde techniek met hetzelfde sperma maar verkregen desal-

niettemin drachtigheidspercentages die variëerden van 30,5 tot 57,1%. Volgens Vale (1997) kan een drachtigheidspercentage van meer dan 50% na KI met ontdooid diepvriessperma beschouwd worden als een goed resultaat.

Oestrussynchronisatie

Suboestrus of stille oestrus, met een onderdrukking van de bronstverschijnselen, heeft een sterk negatief effect op de reproductieve efficiëntie bij de buffel. Los van de seizoengebonden factoren die hoger werden besproken, is het grootste probleem de bronstdetectie zelf. Gezien hun belangrijke rol als trek- en lastdier en als gevolg van de kleinschalige landbouwprojecten in Azië, is het overgrote deel van de buffels ondergebracht in zeer kleine 'kuddes' die slechts uit 2 tot 10 dieren bestaan (Moioli *et al.*, 2001). Daarbij beschikken deze kleine veehouders zelden over een buffelstier, zodat de interactie tussen de verschillende dieren rond het hele bronstgebeuren nagenoeg onbestaande is. Onderzoek van Barkawi *et al.* (1998) wees uit dat slechts via een zeer intens oestrusdetectiesysteem met meerdere observatieperioden per dag, een significante reductie kon bekomen worden van de intervallen van zowat alle reproductieparameters. Een betere opvolging van de oestriscyclus is daarom een eerste voorwaarde om de efficiëntie van de voortplanting bij de buffel te verhogen. Zo kunnen, net zoals bij het rund, intravaginale spiralen of implants met progesteron, samen met PMSG, oestradiol en/of PGF_{2α} bij de buffelkoe gebruikt worden om cycli te synchroniseren en een beter tijdstip van inseminatie of dekking toe te laten (Rao *et al.*, 1985; Saini *et al.*, 1986; Chohan *et al.*, 1995). Uit een studie van Sahasrabudhe en Pandit (1997) blijkt het toedienen van PGF_{2α} dezelfde effectiviteit te hebben als bij het rund, waarbij de behandeling het meest efficiënt bleek tijdens de hete zomermaanden, met 88% van de behandelde dieren

dat een staande oestrus vertoonde na injectie. Barile *et al.* (2001) toonden aan dat het gebruik van de PRID-spiraal (1,55 g progesteron en 10 mg oestradiolbenzoaat) in combinatie met PMSG zeer effectief was bij buffelvaarzen, gehouden in mediterrane omstandigheden, om de oestrus te induceren en te synchroniseren gedurende de inactieve voortplantingsperiode.

Embryotransfer (ET)

ET na superovulatie met gonadotrofinen kan bij de buffel op dezelfde manier worden toegepast als bij het rund. Na het initiële succes van ET bij de rivierbuffel (Drost *et al.*, 1983) werden kort daarna ook kalveren geboren na ET in Bulgarije en India. De doelmatigheid van deze techniek is de voorbije jaren echter weinig verbeterd. De voornaamste reden daarvoor is een merkelijk lagere respons van de buffelkoeien op de superovulatie, die minder dan 1/3 van de respons bij koeien bedraagt (Singh *et al.*, 2000). Slechts 50% tot 55% van de buffelkoeien reageert met een toename van het aantal follikels en bij de gesuperovuleerde dieren worden slechts 2 tot 4 ovulaties geïnduceerd. Protocols op basis van 'follikel stimulerend hormoon' (FSH) zouden daarbij betere resultaten geven dan het Pregnant Mare Serum Gonadotrofin (PMSG) (Madan *et al.*, 1996). Verder zou ook een groter aantal ovulaties worden bekomen als de gonadotrofinebehandeling wordt gestart tijdens de mid-luteale fase (dag 12 van de cyclus) in plaats van in de vroeg of laat luteale fase (Karaivanov *et al.*, 1990). Een overzicht van de mogelijkheden van de klassieke ET-programma's wordt gegeven in het werk van Misra *et al.* (1994) dat is samengevat in Tabel 2. Hieruit blijkt dat, mits een superovulatie met FSH, maximum een tweetal levensvatbare embryo's per spoeling kunnen worden bekomen. Bij het rund kunnen gemiddeld 5 tot 6 kwalitatief goede embryo's verwacht worden.

Tabel 2. Ovariële respons van waterbuffels na stimulatie met FSH of PMSG (Misra *et al.*, 1994).

Hormoon	Aantal dieren behandeld	Totaal aantal CL	Totaal aantal embryo's	Totaal aantal levensvatbare embryo's	Aantal embryo's/spoeling	Aantal levensvatbare embryo's/spoeling
FSH	97	680	398	203	4,1	2,09
PMSG	25	94	40	14	1,6	0,56

Net zoals bij het rund wordt ook bij de buffel een betere ovariële respons bekomen indien de gonadotrofinebehandeling wordt aangevat in afwezigheid van een dominante follikel op één van beide ovaria (Taneja *et al.*, 1995). Diverse factoren worden naar voor geschoven als mogelijke onderliggende oorzaak van de beperkte superovulatoire respons. Zo werd vastgesteld dat het aantal primordiale follikels bij buffels aanzienlijk kleiner is dan bij runderen (zie hoger). Ook het seizoengebonden voortplantingspatroon van buffels kan de superovulatie nadelig beïnvloeden. Tijdens de zomermaanden zijn buffels seksueel inactief en is de concentratie circulerend prolactine verhoogd, wat de rijping van follikels en de luteale functie remt (Madan *et al.*, 1996).

Uit een retrospectieve studie, waarbij 91 receptoren betrokken waren, bleek dat een drachtigheidspercentage van 26,4 % werd bekomen, wat nog steeds een stuk lager is dan bij het rund. Verder bleek dat het drachtigheidspercentage niet verschillend was na transfer tijdens de herfst of winter, en niet werd beïnvloed door de uterushoorn waarin het embryo werd teruggeplaatst. Ook maakte het voor het drachtig worden niets uit of het embryo overgeplant werd in receptoren die natuurlijk of na inductie bronstig werden. De drachtigheidsresultaten waren wel hoger (tot 40%) wanneer de donor en de receptoren zeer goed gesynchroniseerd waren, met een opmerkelijke daling van het aantal drachten (naar 15 tot 18%) wanneer de donor en receptor meer dan 12 uur voor- of achterliepen op elkaars seksuele cyclus. Het was de kwaliteit van het overgeplante embryo die het grootste effect had op het drachtigheidspercentage, met 6 op 10 ontvangsters drachtig wanneer de 'beste kwaliteit embryo's' werden overgeplant (Misra *et al.* 1999).

Concluderend kan gesteld worden dat door de beperkte superovulatoire respons bij buffels de efficiëntie van in vivo embryo productietechnieken eerder gelimiteerd is: gemiddeld 1 tot 2 (Karaivanov *et al.*, 1990) en volgens een recentere studie 2,4 embryo's per donor (Boni *et al.*, 1996). Aangezien de superovulatie om de 8 weken kan herhaald worden, zou een buffelkoe per jaar via deze weg 7 tot 15 kalveren kunnen produceren.

In vitro embryo productie

Het is precies de lagere efficiëntie van klassieke ET-programma's bij buffels die de laatste jaren heeft gezorgd voor een enorme toename van de interesse voor in vitro embryo productie bij buffels. Uit een recent overzicht van de stand van zaken (Gasparrini,

2002) blijkt dat, ondanks de grote vooruitgang die de voorbije jaren werd geboekt, het kweken van buffelembryo's in de proefbuis vooralsnog een moeilijke opdracht is. De auteur benadrukt de mogelijk positieve impact van het combineren van de Ovum Pick-Up techniek (zie verder) met de in vitro kweek van embryo's, zoals dit gebeurt bij het rund (Bols *et al.*, 1994; Bols *et al.*, 1996). Meerdere onderzoeksgroepen rapporteerden reeds dracht en geboorte van levende buffelkalveren na IVF (Madan *et al.*, 1991, Madan *et al.*, 1994; Chauhan *et al.*, 1997). Desalniettemin blijft de doelmatigheid van de techniek nog zeer laag, met een opbrengst van overplantbare blastocysten in de grootteorde van 7-10%, berekend op het initieel aantal in cultuur geplaatste eicellen.

Ovum Pick-Up techniek (OPU)

Om waardevolle genetische kenmerken van een donor vlugger in een populatie te kunnen verspreiden, dient de in vitro productie van embryo's vooral gebruik te maken van eicellen die via de Ovum Pick-Up techniek bij levende donoren werden geaspireerd. De hoge herhaalbaarheid van de techniek maakt dat zij een alternatief kan zijn voor de klassieke ET. Bovendien kan OPU worden toegepast zonder voorafgaande hormonale stimulatie, zodat de slechte respons bij de buffel hier geen belemmering vormt. OPU werd reeds verschillende malen bij buffels toegepast (Boni *et al.*, 1996), maar de efficiëntie in termen van het aantal geproduceerde IVF-embryo's ligt nog gevoelig lager dan bij het rund. Slechts ongeveer 30% van de geaspireerde eicellen blijkt bruikbaar voor IVF. Buffelkoeien werden gedurende vier maanden tweemaal per week onderworpen aan OPU, waarna gemiddeld 7,8 embryo's per behandeld dier in vitro werden gekweekt. Omgerekend betekent dit dat per jaar een opbrengst van 23,4 embryo's per koe zou kunnen gerealiseerd worden. Wanneer toch een FSH-behandeling werd ingesteld, voorafgaand aan eicelcollectie, bleek niet alleen het aantal geaspireerde eicellen te stijgen (3,00 versus 1,33) maar ook hun kwaliteit. Na stimulatie bleek immers 55,6% van de eicellen geschikt voor IVF. De opbrengst van blastocysten lag daarbij in de buurt van 17%. De gevolgen van de OPU-ingreep bleken vrij gering aangezien alle buffelkoeien drachtig werden via de natuurlijke weg binnen de 75 dagen na de laatste OPU-sessie. Het was evenwel pas in 1998 dat Galli *et al.* over het eerste buffelkalf rapporteerden dat geboren werd na in vitro bevruchting van een eicel die via de OPU-techniek was geaspireerd. Belangrijk hierbij is de vaststelling dat de eicellen tij-

dens dit experiment weliswaar werden gerijpt en bevrucht in vitro, maar dat de embryo's verder in cultuur werden gebracht in de afgebonden eileiders van een ooi. Op dag 7 werden de embryo's opnieuw gecollec-teerd en ingevroren. Later werden negen embryo's overgeplant waaruit 3 drachten werden bekomen die alle resulteerden in een levend buffelkalf.

Een overzicht van wat men kan verwachten door het toepassen van verschillende technieken uit de ge-assisteerde voortplanting bij buffels wordt weergegeven in Tabel 3 aan de hand van cijfers van Zicarelli *et al.* (1997), waarbij ook een vergelijking wordt ge-maakt met de toestand bij het rund.

Cryopreservatie van embryo's

Cryopreservatie van embryo's is in eerste instantie een handig instrument om het hoofd te bieden aan een aantal nadelen van de klassieke ET, met name de on-voldoende beschikbaarheid van receptoren. Dit is

ook specifiek een probleem bij buffels omwille van de minder goede reactie op hormonale behandeling, met een slechtere oestrussynchronisatie tot gevolg (zie hoger). Het voordeel te kunnen beschikken over diep-gevroren embryo's die op het meest gunstige moment kunnen worden overgeplant, wordt nog versterkt door de uitgesproken seizoengebondenheid van de buffelvoortplanting. De timing van klassieke ET-programma's moet daarom zeer nauwkeurig worden gepland in het seksueel actieve seizoen van de buffels. Het grote probleem tot op heden is de lage invriesbaar-hed van buffelembryo's, waarschijnlijk mede veroor-zaakt door hun hoog vetgehalte (Gasparini, 2002). Het overbrengen van delende in vitro embryo's naar de oviduct van een ooi voor in vivo kweek heeft wel een gunstige invloed op het overlevingspercentage na in-vriezen (zie hoger). Het gebruik van een 'tussen-gastheer' maakt echter de hele procedure nog meer gecompliceerd.

Tabel 3. Efficiëntie van de embryoproductie in vivo (ET), na in vitro maturatie (IVM)/IVF uitgaande van eicellen van ge-slachte dieren (IVM/IVF) en na de combinatie van eicelaspriatie bij levende donoren met IVM en IVF (OPU/IVM/IVF) bij het rund en de buffel (Zicarelli, 1997).

	ET		IVM/IVF		OPU/IVM/IVF	
	Rund	Buffel	Rund	Buffel	Rund	Buffel
% Respons na superovulatie	88	55	-	-	-	-
Aantal embryo's per flushing of per OPU-sessie	7,4	1,8	1,5 - 5	0,4 - 0,8	1 - 1,5	0,17 - 0,37
Aantal overplantbare embryo's per spoeling of per sessie	4,4	1,7	0,8 - 0,3	0,3 - 0,6	0,6 - 0,9	0,15 - 0,33
Herhaalbaarheid van de ingreep (na x dagen)	75	100	-	-	3 - 4	3 - 4
Aantal embryo's over een periode van 75 of 100 dagen	14,8	3,6	1,5 - 5	0,4 - 0,8	21 - 32	5,1 - 11,1
Aantal overplantbare embryo's over een periode van 75 of 100 dagen	8,8	3,4	0,8 - 3	0,3 - 0,6	13 - 19	4,5 - 9,9

CONCLUSIES

De buffel en de buffelhouderij nemen op wereldschaal een belangrijke plaats in binnen de dierlijke productie. Een typisch gegeven daarbij is het grote aantal buffels dat voorkomt in extreem kleine eenheden, wat niet alleen een grote rem is voor de productie, maar ook voor de inventarisering en het onderzoek naar parameters die de (re)productie beïnvloeden. Het houden van buffels in kuddes van 2 tot 10 dieren heeft een nefaste invloed op de bronstwaarneming, die op zich dikwijls al veel minder duidelijk tot uiting komt dan bij het rund. Vanwege de uitgesproken seizoengebonden voortplanting van de buffel, kunnen reproductieve parameters van het rund niet zonder meer geëxtrapoleerd worden naar de buffel, en zijn vergelijkingen tussen buffel en rund niet steeds verantwoord.

Daar waar buffelmelk en -vles op wereldschaal van zeer groot belang zijn, is het meest in het oog springende product in Europa zonder twijfel de mozzarella. Het is een typisch 'niche product' waarnaar een duidelijke vraag aanwezig is. Om de toekomstmogelijkheden van de buffel met betrekking tot de melk- en eventuele vleesproductie in gematigde streken te kunnen beoordelen, zou eerst aan een aantal voorwaarden moeten worden voldaan. Zo dient in eerste instantie de (reproductieve) fysiologie van de buffel, gehouden in gematigde streken, meer uitgebreid te worden bestudeerd. Vooral de seizoengebondenheid van de voortplanting dient in extenso onderzocht te worden, waarbij uitgemaakt moet worden of deze eerder genetisch, klimatologisch, dan wel door voederfactoren wordt bedongen. Verder dienen de dieren, om een realistische productie te kunnen nastreven, gehouden te worden op een schaalgrootte die vergelijkbaar is met deze van Europese melkkoeien. Het houden van dieren in grotere groepen kan op zich al wijzigingen in gedrag (bronstexpressie) met zich meebrengen. De recente omschakeling van een aantal Nederlandse melkveehouders naar het houden van buffels toont aan dat de dieren wel degelijk onder grotendeels dezelfde omstandigheden als onze koeien kunnen worden gehouden. Het intensifiëren van de productie betekent echter ook dat veel onderzoek zal dienen te gebeuren naar het op punt stellen van het voederrantsoen en het metabolisme in het algemeen. Verder zal nauwlettend moeten toegezien worden op het ontstaan van productiegerelateerde pathologieën.

De toepassing van technieken uit de geassisteerde voortplanting zal enerzijds maar mogelijk worden als de hoger aangehaalde specifieke aspecten van de buf-

felreproductie beter bestudeerd en uitgeklaard zijn. Zo blijft het aantal kalveren dat totnogtoe met behulp van OPU en IVF werd geproduceerd, eerder beperkt. Anderzijds kan geassisteerde voortplanting uiteraard aangewend worden als instrument in deze studie. Ook kan het gebruik van OPU in combinatie met IVF een waardevolle techniek zijn om de snelheid van de genetische selectie op te drijven en het generatie-interval te verkorten, wat van groot belang is voor kweekprogramma's en het testen van de productiviteit van nakomelingen. Bij de buffel kan de combinatie OPU-IVF zelfs een alternatief betekenen voor de klassieke ET vanwege een grotere embryo-opbrengst. Veel aandacht dient ook te gaan naar de studie van de folliculaire recruterings, de ontwikkeling en atresie (Singh *et al.*, 2000), met het oog op de optimalisatie van protocols voor oestrussynchronisatie en superovulatie.

DANKBETUIGING

De auteurs danken A. Houvenaghel en E. Wechsung voor het kritisch lezen van het manuscript.

LITERATUUR

- Abdalla E.B. (2002). Improving the reproductive performance of Egyptian buffalo cows by changing the management system. *Animal Reproduction Science* 549, 1-8.
- Aguiar P.H.P., Andrade V.J., Abreu J.J., Gomez N.B.N. (1994). Physical and morphological semen characteristics of buffaloes aged from four to eight years old. *Proceedings 4th International Buffalo Congress*, Sao Paulo, Brazil, vol 3 :486-488.
- Ahmed A., Agarwal S.P., Agarwal V.K., Rahman S.A., Laumas K.R. (1977). Steroid hormones: Part II. Serum progesterone concentration in buffaloes. *Indian Journal of Experimental Biology* 15, 591-593.
- Arora R.C. en Panday R.S. (1982). Changes in peripheral plasma concentrations of progesterone, estradiol-17 β , and luteinizing hormone during pregnancy and around parturition in the buffalo (*Bubalus bubalis*). *General and Comparative Endocrinology* 48, 403-410.
- Barile V.L., Galasso A., Marchiori E., Pacelli C., Montemurro N., Borghese A. (2001). Effect of PRID treatment on conception rate in mediterranean buffalo heifers. *Livestock Production Science* 68, 283-287.
- Barkawi A.H., Khattab R.M., El-Wardani M.A. (1998). Reproductive efficiency of Egyptian buffaloes in relation to oestrus detection systems. *Animal Reproduction Science* 51, 225-231.
- Bartocci S., Tripaldi C., Terramoccia S. (2002). Characteristics of foodstuffs and diets, and the quantitative parameters of Mediterranean buffaloes bred in Italy using the intensive system: an estimate of the nutritional requirements of buffalo herds lactating and dry. *Livestock Production Science* 77, 45-58.

- Baruselli P.S., Mucciolo R.G., Visintin J.A., Viana W.G., Arruda R.P., Madureira E.H., Oliveira C.A., Moleiro-Filho J.R. (1997) Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 47, 1531-1547.
- Batra S.K. en Pandey R.S. (1982) Luteinizing hormone and oestradiol-17 β in blood plasma and milk during the oestrus cycle and early pregnancy in Murrah buffaloes. *Animal Reproduction Science* 5, 247-257.
- Benjamin B.R. (1996). Crossbreeding among buffaloes, an unexploited natural resource. *Buffalo Newsletter*, September 1996.
- Bols P.E.J., Van Soom A., de Kruif A. (1994) Ovum Pick-up (OPU) bij het rund. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 63, 101-108.
- Bols P.E.J., Van Soom A., de Kruif A. (1996) Gebruik van de transvaginale ovum pick-up (OPU) techniek: geboorte van de eerste OPU-kalveren in België. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 65, 86-91.
- Boni R., Roviello S., Zicarelli L. (1996). Repeated ovum pick-up in Italian mediterranean buffalo cows. *Theriogenology* 46, 899-909.
- Bunevski G. (2000). Buffalo breeding in the former Yugoslav Republic of Macedonia. In: Moiola B., Mäki-Hokkonen J., Galal S., Zjalic M. (editors). *Workshop on animal recording for improved breeding and management strategies for buffaloes*, ICAR Technical Series 4, p. 78.
- Chauhan M.S., Katiyar P.K., Singla S.K., Manik R.S., Madan M.L. (1997) Production of buffalo calves through in vitro fertilization. *Indian Journal of Animal Science* 67, 306-308.
- Chohan K.R., Iqbal J., Choudhary R.A., Khan A.H. (1995) Oestrous response and fertility in true anoestrus buffaloes following hormonal treatment during summer. *Pakistan Veterinary Journal* 15, 6-8.
- Cockrill W.R. (1974). The Husbandry and Health of Domestic Buffalo. FAO, Rome.
- Danell B., Gopakumar N., Nair M.C.S., Rajgopalan K. (1984) Heat detection symptoms in Surti buffalo breeds. *Indian Journal of Animal Reproduction* 5, 1-7.
- Danell B. (1987). Oestrous behaviour, ovarian morphology and cyclical variation in follicular system and endocrine pattern in water buffalo heifers. PhD Thesis, University of Uppsala, Sweden.
- Dhami A.J., Sahni K.L. (1994). Effects of various cooling (from 30°C to 5°C), equilibration and diluent treatments on freezability, post-thaw thermoresistance, enzyme leakage and fertility of bubaline spermatozoa. *Buffalo Journal* 2, 147-159.
- Drost M., Wright J.M., Cripe W.S., Richter A.R. (1983). Embryo transfer in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 20, 579.
- Erickson B.H. (1966) Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *Journal of Animal Science* 25, 800-805.
- El-Ashry M.A. (1988). Impact of feeding and management on maturity in buffalo. *Proceedings of II World Buffalo Congress*, New Delhi, India, 1988. Vol II, Part II, 548-555.
- Galli A., Bornaghi V., Balduzzi D., Buttazonni L., Alean-dri R. (1993). Sexual behaviour and semen quality relating to Italian buffalo. *Proceedings 3rd World Buffalo Congress*, Varna, Bulgaria, vol 1: 562-570.
- Galli C., Duchi R., Crotti G., Lazarri G. (1998) Embryo-production by Ovum Pick-Up in water buffalo. *Theriogenology* 49, 400.
- Gasparrini B. (2002). In vitro embryo production in buffalo species: state of the art. *Theriogenology* 57, 237-256.
- Hendriks R., Wiersema K. (2001). The buffalo breeding in the Netherlands. *Bubalus bubalis* 1, 7-16.
- Hendriks H.A.M. (2002). Waterbuffels in Limburg. *Veehouder en Dierenarts* 3, 12-14.
- International Committee for Animal Recording - ICAR (2000). Yearly enquiry on buffalo milk, Table 3: Milk production of recorded buffaloes & Table 5: Reproduction parameters.
- Kanai Y. en Shimizu H. (1986). Changes in plasma concentration of luteinizing hormone, progesterone and oestradiol-17 β during the peri-ovulatory period in cyclic swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Animal Reproduction Science* 11, 17-24.
- Karaivanov, C., Kacheva, D., Petrov, M., Vlahov, K. and Sapundjiev, E. (1990). Superovulatory response of river buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 33, 453-64.
- Kumar S., Sahni K.L., Bistha G.S. (1993). Cytomorphological characteristics of motile and static semen of buffalo bulls. *Buffalo Journal* 2, 117-127.
- Madan M.L. (1988). Status of reproduction in female buffalo. In: *Buffalo Production and Health: a compendium of latest research information based on Indian studies*. ICAR Publication, New Delhi, India: 89-100.
- Madan M.L., Singla S.K., Jaiikhani S., Ambrose J.D. (1991). In vitro fertilisation in buffalo and birth of first ever IVF buffalo calf. *Proceedings of the 3rd World Buffalo Congress*, Varna, Bulgaria Vol 7, 11-17.
- Madan M.L., Chauhan M.S., Singla S.K., Manik R.S. (1994). Pregnancies established from water buffalo (*Bubalus bubalis*) blastocysts derived from in vitro matured, in vitro fertilized oocytes and co-cultured with cumulus and oviductal cells. *Theriogenology* 42, 591-600.
- Madan M.L., Das S.K., Palta P. (1996). Application of reproductive technology to buffaloes. *Animal Reproduction Science* 42, 299-306.
- Misra A.K., Kasiraj R., Mutha Rao M., Ranga Reddy N.S., Joshi B.V. (1994). Embryotransfer in buffalo in India: progress in the last five years. *Proceedings of the IVth World Buffalo Congress* 3:501-504.
- Misra A.K., Mutha Rao M., Kasiraj R., Ranga Reddy N.S., Pant H.C. (1999). Factors affecting pregnancy rate following nonsurgical embryo transfer in buffalo (*Bubalus bubalis*): a retrospective study. *Theriogenology* 52, 1-10.
- Moioli B., Georgoudis A., Napolitano F., Catillo G., Giubilei E., Ligda Ch., Hassanane M. (2001). Genetic diversity between Italian, Greek and Egyptian buffalo populations. *Livestock Production Science* 70, 203-211.
- Nandi S., Raghu H.M., Ravindranatha B.M., Chauhan M.S. (2002). Production of buffalo (*Bubalus bubalis*)

- embryos in vitro: premises and promises. *Reproduction in Domestic Animals* 37, 65-74.
- Ohashi O.M. (1994). Oestrus detection in buffalo cows. *Buffalo Journal* 2, 61-64.
- Raizada B.C., Sattar A., Pandey M.D. (1990). A comparative study of freezing buffalo semen in two diluters. In: Acharya R.M., Lokeshwar R.R., Kumar S. (Eds.), Recent Advances in Buffalo Research vol 3, 66-74.
- Ranjhan S.K., Pathak N.N. (1993). *Textbook on Buffalo Production*. 3rd Edition, Vikas Publishing House PVT Ltd., New Delhi.
- Rao A.V.N., Sreemannarayana O., Rao K.P. (1985). Oestrus response and fertility in post-partum anoestrous buffaloes treated with progestagen, pregnant mares' serum gonadotrophin and prostaglandin during the low breeding season. *Animal Reproduction Science* 8, 129-135.
- Rosati A., Van Vleck L.D. (2002). Estimation of genetic parameters for milk, fat, protein and mozzarella cheese production for the Italian river buffalo *Bubalus bubalis* population. *Livestock Production Science* 74, 185-190.
- Sahasrabudhe S.A., Pandit R.K. (1997). PGF₂ α induced oestrus in suboestrus Murrah buffaloes during summer. *Indian Journal of Animal Science* 67, 513-514.
- Saini M.S., Galhotra M.M., Kakar M.L., Razdan M.N. (1986). Induction of estrus and ovulation in non-cyclic buffalo (*Bubalus bubalis*) heifers with progesterone releasing intravaginal device and pregnant mare serum gonadotrophin and their gonadotrophin profile. *Theriogenology* 26, 749-755.
- Sansone G., Nastri M.J.F., Fabbrocini A. (2000). Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Animal Reproduction Science* 62, 55-76.
- Shah S.N.H. (1988). Comparative studies of seasonal influence on breeding behaviour and conception rate of dairy buffalo and Zebu cattle. In: *Proceedings of the 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination* vol 3, 538.
- Singh G., Singh G.B., Bains G.S. (1985). Studies on incidence of anoestrus in village buffaloes. *Indian Journal of Animal Research* 19, 57-60.
- Singh G., Singh G.B., Dhaliwal G.S. (1989). Studies on reproductive status of rural buffaloes in summer. *Indian Journal of Animal Reproduction* 10, 151-153.
- Singh R., Nanda A.S. (1993). Environmental variables governing seasonality in buffalo breeding. *Journal of Animal Science* 71, 119.
- Singh J., Nanda A.S., Adams G.P. (2000). The reproductive pattern and efficiency of female buffaloes. *Animal Reproduction Science* 60-61, 593-604.
- Taylor S.P., Jain L.S., Gupta H.K., Bhatia J.S. (1990). Oestrus and conception rates in buffaloes under village conditions. *Indian Journal of Animal Science* 60, 1020-1021.
- Takkar O.P., Singh M., Verman P.M. (1983). Progesterone levels vis a vis anoestrus in buffaloes concurrent with profile during stages of oestrus cycle. *Indian Journal of Dairy Science* 36, 125-128.
- Taneja M., Totey S.M., Ali A. (1995). Seasonal variation in follicular dynamics of superovulated Indian water buffalo. *Theriogenology* 43, 451-464.
- Taneja M., Ali A., Singh G. (1996). Ovarian follicular dynamics in water buffalo. *Theriogenology* 46, 121-130.
- Tatham B. (2000). Increasing buffalo production using reproduction techniques. RIRDC Publication No 00/165.
- Ty L.V., Chupin D., Driancourt M.A. (1989). Ovarian follicular populations in buffaloes and cows. *Animal Reproduction Science* 19, 171-178.
- Vale W.G. (1994). Reproductive management of water buffalo under amazon conditions. *Buffalo Journal* 10, 85.
- Vale W.G. (1997). News on reproductive biotechnology in males. *Proceedings 5th World Buffalo Congress*, Caserta, Italy, vol 1:103-123.
- Vale W.G. (2002). Water buffalo – a world uptake. XXII World Buiatrics Congress, Hannover, Germany, 2002.
- Villa E., Fabbri G. (1993). Results of A.I. in Italy for improvement schemes in buffalo. *Proceedings International Symposium on Prospect of Buffalo Production in Mediterranean and the Middle East*, Cairo, Egypt, 1993.
- Xiao Y.Z. (1988). Buffalo as dairy animal in China. *Asian Livestock* 13, 25-27.
- Zicarelli L. (1994). Management under different environmental condition. *Buffalo Journal*, Supplement 2, 17-38.
- Zicarelli L. (1997). News on buffalo cow reproduction. *Proceedings of the 5th World Buffalo Congress*, Caserta, Italy, 1997.
- Zicarelli L., Esposito L., Campanile G., Di Palo R., Armstrong D.T. (1997). Effects of using vasectomised bulls in artificial insemination practice on the reproductive efficiency of Italian buffalo cows. *Animal Reproduction Science* 47, 171-180.