

云南水牛同期发情、超数排卵和胚胎移植试验

和占星^{1,*}, 和协超², 罗在仁³, 朱芳贤¹, 铃木达行⁴, 创向辉⁵, 尹安强³, 黄晓松⁵

(1. 云南省肉牛和牧草研究中心, 云南昆明 650212; 2. 中国科学院昆明动物研究所, 云南昆明 650223;

3. 盈江县畜牧局, 云南盈江 679300; 4. 山口大学, 日本山口 753-8515; 5. 德宏州畜牧兽医站, 云南潞西 678400)

摘要: 为探讨水牛胚胎移植的效果, 于2002年对云南水牛进行了胚胎移植试验: ①用国产氯前列烯醇(PG) 0.6 mg/头·次处理供、受体水牛同期发情率和可用率分别为43.33% (13/30) 和16.67% (5/30); 同期发情率经产水牛高于青年水牛 ($P=0.086$), 杂交水牛高于德宏水牛 ($P=0.153$), 体重401~530 kg水牛显著高于体重300~400 kg水牛 ($P<0.05$); 发情明显水牛的可用率极显著高于发情不明显的水牛 ($P<0.01$)。②选用河流型摩拉水牛与沼泽型德宏水牛的杂交一代5头为供体, 分进口激素组 ($n=2$) 和国产激素组 ($n=3$) 进行超数排卵, 共有2头获9枚胚胎; 进口激素组供体的平均获胚数和可移植胚数分别为2.0枚和1.5枚, 比国产激素组分别多0.33枚 ($P=0.454$) 和1.17枚 ($P=0.288$)。③所获4枚可用鲜胚分别移植3头受体, 结果90 d的妊娠率为33.33%, 但最终无一头产犊。试验结果表明使用进口FSH 24mg + PG (Lutalyse[®]) 35 mg和国产FSH 11 mg + PG 0.8 mg对水牛超数排卵有效, 同时提示需要足够数量的受体, 从中选用发情表现明显、黄体发育良好的进行胚胎移植, 才能取得良好效果。

关键词: 水牛; 同期发情; 超数排卵; 胚胎移植

中图分类号: Q819; Q959.842; Q492 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254-5853 (2005) 01-0106-06

Experiments on Synchronous Estrus, Superovulation and Embryo Transfer in Buffaloes of Yunnan

HE Zhan-xing¹, HE Xie-chao², LUO Zai-ren³, ZHU Fang-xian¹, SUZUKI tatsuyuki⁴,
CHUANG Xiang-hui⁵, YIN An-qiang³, HUANG Xiao-song⁵

(1. Yunnan Provincial Beef Cattle and Pasture Research Center, Kunming 650212, China;

2. Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China;

3. Animal Husbandry Bureau of Yingjiang County, Yingjiang 679300, China;

4. Yamaguchi University, Yamaguchi 753-8515, Japan;

5. Animal Husbandry and Veterinary Medicine Station of Dehong State, Luxi 678400, China)

Abstract: To investigate the effect of embryo transfer in buffaloes, buffaloes of Yunnan were experimented in 2002. Results showed: ①Synchronous estrus and usable rates of donors and recipients administered with cloprostenol (PG) 0.6 mg/head, injection once, were 43.33% (13/30) and 16.67% (5/30). Especially, the synchronous estrus rate was higher in parity's than in heifer's ($P=0.086$), higher in crossbred's than in Dehong Buffalo's ($P=0.153$), and higher in weight from 401 to 530 kg of buffalo cows than from 300 to 400 kg ($P<0.05$); And the usable rate of buffaloes with evidence estrus behavior was also higher than that of buffaloes with lack of evidence estrus ($P<0.01$). ②Five donors crossbred F₁ (Murrah × Dehong buffalo) were picked out from buffaloes of synchronous estrus and divided into two groups, i.e. import hormone group ($n=2$) and native hormone group ($n=3$), which were dealt with superovulation. The results showed that 2 out of 5 buffaloes gave 9 embryos, and average no. of recovered embryos and no. of transferable embryos in the import hormone were 2.0 and 1.5, and higher than those in the native hormone, which were 1.67 ($P=0.454$) and 0.33 ($P=0.288$), respectively. ③Four fresh embryos were transferred into 3 receipts, thereinto the rate of 90-day conception was 33.33%, but finally none gave birth to a calf. The experiment results indicate that it is in effect for superovulation of buffaloes with administered 24 mg of import FSH and plus PG (Lutalyse[®]) 35 mg and the same as 11 mg of native

收稿日期: 2004-09-06; 接受日期: 2004-12-13

基金项目: 云南省生殖生物学重点实验室开放基金; 国家外专局智力引进项目

* 通讯作者, E-mail: hezx81@public.km.yn.cn, Tel: 0871-7391355

FSH and plus PG 0.8 mg, meanwhile suggest that it is practicable if the receipt buffaloes are enough for synchronous estrus, then the cows with evidence estrus behavior and good CL checked can be selected for transferring embryos.

Key words: Buffalo; Estrus synchronization; Superovulation; Embryo transfer

水牛作为一种蛋白质产品的重要资源 (Visintin et al, 1997) 尚未得到充分开发利用, 目前正成为世界畜牧业研究和开发的一个热点, 水牛生产已逐渐从传统的役用型向乳肉兼用和乳用型发展。2002 年全世界水牛存栏 1.65 亿头。中国水牛品种资源丰富, 存栏 2 245 万头, 居全球第三位。云南是我国水牛主产区之一, 存栏 269.22 万头 (其中繁殖母牛 84.5 万头), 位居全国第二; 在全国 18 个水牛品种 (类群) 中, 云南有 3 个, 即德宏水牛、滇东南水牛和盐津水牛。近年来, 水牛杂交改良速度快, 发展水牛奶业的前景看好。

应用胚胎生物工程技术改良水牛, 提高其繁殖和生产效率是可行的。自美国的 Drost et al (1983) 通过非手术胚胎移植成功产下世界第一头水牛犊以来, 引起饲养水牛国家的极大兴趣。马来西亚 (see Misra, 1997)、保加利亚 (Vlahov et al, 1986)、泰国 (Chantaraprateep et al, 1988)、印度 (see Misra, 1997)、日本 (Ocampo et al, 1988)、巴基斯坦 (see Misra, 1977)、意大利 (Schallenberger et al, 1990)、菲律宾 (see Misra, 1977)、越南 (Uoc et al, 1992)、埃及 (Ismail et al, 1993) 和巴西 (Baruselli, 1994) 等国家相继作了相关研究报道。近几年, 水牛的超数排卵和胚胎移植技术有了较大的提高, 但水牛具有初情期晚、安静发情或微弱发情及产后发情间隔时间长等特点, 整体繁殖力低 (Madan et al, 1996); 所以, 其胚胎移植效果远不及奶牛 (Misra et al, 1999), 具体表现在: ①水牛的超排效果不稳定, 回收到的可移植胚胎数量或高 (Misra & Joshi, 1991; Kasiraj et al, 1993; Wang et al, 1994) 或低 (Madan et al, 1988), 甚至为零 (Ocampo et al, 1988); ②胚胎移植妊娠率普遍较低, 鲜胚移植的妊娠率一般也只有 10% ~ 30% (Drost, 1996; Zicarelli, 1997; Techakumphu et al, 2001a)。因此, 如何进一步提高超排效果和移植产率是水牛胚胎移植技术实用化的基础。加大人工授精技术推广力度, 开发应用胚胎移植技术, 是最大限度地提高优秀种公牛的利用率, 充分挖掘母牛的繁殖潜力, 实现增殖、高效的重要途径。为探讨水牛胚胎移植技术, 我们于 2002 年在

云南开展了水牛胚胎移植试验, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 供、受体水牛

选择健康、空怀 (包括产后 180 d)、年龄 3 ~ 14 岁、体重 300 ~ 530 kg、繁殖正常的沼泽型 (swamp buffalo) 德宏水牛和摩·德杂水牛 [河流型 (riverine buffalo) 摩拉水牛 (Murrah) 与德宏水牛的杂交一代水牛] 作为供、受体。

1.2 试剂与器具

国产 PG [氯前列烯醇 (cloprostenol), 上海市计划生育科学研究所], 进口 PG (Lutalyse[®], Pharmacia & Upjohn Company, USA), 国产 FSH (中国科学院北京动物研究所), 进口 FSH (Denka 制药株式会社, Japan), PBS 液 (自配)。16 ~ 18 号冲胚管、胚胎集收杯和胚胎灌流仪 (富士平工业株式会社, Japan)。

1.3 供体的同期发情处理与超数排卵

备选 15 头摩·德杂水牛在性周期的任何一天 (作为处理的第 1 天) 不检查黄体, 一次肌注 PG 0.6 mg/头; 在第 2 ~ 5 天观察发情, 做好发情记录; 选择发情明显、发情第 7 天黄体检查合格的 5 头水牛供超数排卵, 并在发情的第 10 或 11 天用递减法早晚各一次注射 FSH, 连续注射 4 d, 其中第 3 天注射 PG 诱导发情。站立发情后用尼里-拉非水牛 (Nili-Ravi) 302 号种公牛细管冻精 (云南省大理州冷冻精液站生产) 第一次人工授精 (0.25 mL/次), 间隔 12 h 进行第二次人工授精。在第一次人工授精后第 6 天用非手术法回收胚胎。处理程序见图 1, 注射激素剂量见表 1。

1.4 受体的同期发情处理与胚胎移植

受体在性周期的任何一天不检查黄体, 一次肌注 PG 0.6 mg/头 (以下简称一次 PG); 对一次 PG 处理不发情或发情但黄体不合格的受体, 间隔 12 ~ 13 d 第二次肌注 PG 0.6 mg/头 (以下简称二次 PG), 在发情的第 6 ~ 7 天通过直肠检查, 选择黄体合格或基本合格的受体进行鲜胚移植。移植后观察、记录受体返情情况, 90 d 进行妊娠检查。

1.5 统计分析

时间 Time (d)	1	2~5	14~17	18~19	24
处理 Treatment	注射氯前列烯醇 Injecting cloprostenol	观察发情 Observing oestrus	超数排卵 Superovulation	人工授精 Artificial insemination	回收胚胎 Flushing embryo

图 1 供体水牛同期发情和超数排卵处理程序

Fig. 1 The procedure of synchronization estrus and superovulation in buffalo donors

表 1 供体水牛超数排卵处理与激素剂量

Tab. 1 The superovulation treatment and administer hormone dose in buffalo donors

试验组别 Experimental group	时间 Time	第 1 天 Day 1	第 2 天 Day 2	第 3 天 Day 3		第 4 天 Day 4	第 5 天 Day 5	第 6 天 Day 6
		FSH (mg)	FSH (mg)	FSH (mg)	PG (mg)	FSH (mg)		
进口激素组 Import hormone	早 am.	4.5	3.5	2.5	25	1.5	H	AI
	晚 pm.	4.5	3.5	2.5	10	1.5	AI	
国产激素组 Native hormone	早 am.	2.4	1.6	1.0	0.6	0.5	H	AI
	晚 pm.	2.4	1.6	1.0	0.2	0.5	AI	

H: 发情 (Heat); AI: 人工授精 (Artificial insemination)。

供、受体水牛同期发情率和可用率采用卡方 (χ^2) 检验, 供体超排后的平均黄体数、卵泡数、获胚数和可移植胚数采用 t 检验, 检测差异性是否显著。

2 结果与分析

2.1 同期发情效果

2.1.1 一次 PG 与二次 PG 处理的同期发情效果
如表 2 所示, 一次 PG 处理的发情率和可用率比二次 PG 处理分别高 33.81% ($P < 0.01$) 和 7.15% ($P = 0.466$)。

2.1.2 年龄、体重、胎次和品种对同期发情效果的影响
5~14 岁经产水牛的发情率和可用率与 3~4 岁的青年水牛差异不显著 (表 3)。体重 401~530 kg 水牛同期发情率显著高于 300~400 kg 的, 而可用率则极显著高于 300~400 kg 的 (表 4)。对 14 头摩·德杂水牛按胎次分为 0 胎 (青年牛) 和 2 胎 (经产牛) 两组进行比较, 结果 2 胎次水牛 (n

= 6) 的发情率 (83.00%) 和可用率 (50.00%) 比 0 胎次水牛 ($n = 8$) 分别高 45.5% ($P = 0.086$) 和 37.5% ($P = 0.124$)。摩·德杂水牛同期发情率和可用率比德宏水牛分别高 25.89% ($P = 0.153$) 和 22.25% ($P = 0.102$) (表 5)。

2.1.3 发情表现与可用率的关系
根据水牛的发情表现, 分为明显 (爬垮、接受爬垮、明显流粘液) 和不明显 (尿频、外阴水肿、流粘液) 两组, 分析有效可用率 (即黄体合格供、受体占发情数的百分比), 结果发情表现明显受体的可用率比不明显的高 73.21%, 差异极显著 (表 6)。

2.2 进口激素与国产激素组的超排效果

用国产和进口的 FSH 处理均有超数排卵效果。供体超排反应率 100% (5/5), 冲胚 5 头, 结果有 2 头获胚胎, 其中 1 头 4 枚、1 头 5 枚。如表 7 所示, 进口激素组的平均获胚数和可移植胚数比国产激素组分别多 0.33 枚 ($P = 0.454$) 和 1.17 枚 ($P = 0.288$), 可移植胚率极显著高于国产激素组 55.24%

表 2 一次 PG 与二次 PG 处理的水牛同期发情效果比较

Tab. 2 Comparison of effects of synchronization estrus between injection PG once and twice in buffaloes

处理 Treatment	处理头数 No. of buffaloes treated	年龄 Age (year)	体重 Weight (kg)	胎次 No. of parity	发情率 Estrus rate (%)	可用率 Usable rate* (%)
一次 PG PG once	30	7.08 ± 3.13	394.13 ± 65.91	1.97 ± 1.67	43.33 (13/30) ^A	16.67 (5/30)
二次 PG PG twice	21	6.74 ± 2.88	368.71 ± 45.83	1.90 ± 1.64	9.52 (2/21) ^B	9.52 (2/21)

*可用率 = 选作超数排卵的供体和黄体合格的受体占同期发情处理水牛总数的百分比 [Usable rate = No. of superovulation donors and up to grade CL recipients / Total No. of synchronous estrus buffaloes]。

同列 A、B 比较, 差异极显著 (卡方检验: $P < 0.01$), 以下表格同 [The capital A and B in the same column were showed significant difference (χ^2 test; $P < 0.01$), and the same in the below Tabs.]。

表 3 不同年龄水牛同期发情效果比较

Tab. 3 Comparison of effects of synchronization estrus among different ages of buffaloes

年龄 Age (year)	处理头数 No. of buffaloes treated	发情率 Estrus rate (%)	可用率 Usable rate (%)
3-4 (3.11 ± 0.22)	9	33.33 (3/9)	11.11 (1/9)
5-8 (7.41 ± 0.97)	11	45.45 (5/11)	18.18 (2/11)
9-14 (10.30 ± 1.77)	10	50.00 (5/10)	20.00 (2/10)

表 4 不同体重水牛同期发情效果比较

Tab. 4 Comparison of effects of synchronization estrus among different weights of buffaloes

体重 Weight (kg)	处理头数 No. of buffaloes treated	发情率 Estrus rate (%)	可用率 Usable rate (%)
300-400 (354.70 ± 29.88)	20	30.00 (6/20) ^b	0 (0/20) ^B
401-530 (473.00 ± 11.83)	10	70.00 (7/10) ^a	50.00 (5/10) ^A

同列 a、b 比较差异显著 ($P < 0.05$), 同列 A、B 比较差异极显著 ($P < 0.01$) [Small letters a and b ($P < 0.05$), and larger ones ($P < 0.01$) in the same column were showed significant difference]。

表 5 德宏水牛和摩·德杂水牛同期发情效果比较

Tab. 5 Comparison of effects of synchronization estrus between Dehong buffalo and Hybird buffalo (Murrah × Dehong)

	处理头数 No. of buffaloes treated	年龄 Age (year)	体重 Weight (kg)	发情率 Estrus rate (%)	可用率 Usable rate (%)
摩·德杂水牛 Crossbred buffalo (Murrah × Dehong)	14	5.04 ± 2.52	381.57 ± 68.11	57.14 (8/14)	28.5 (4/14)
德宏水牛 Dehong Buffalo	16	8.88 ± 2.30	405.13 ± 62.98	31.25 (5/16)	6.25 (1/16)

表 6 水牛同期发情表现对可用率 (黄体合格率) 的影响
Tab. 6 Effects of different estrus behavior of synchronization estrus on usable rate (rate of up to grade CL) of buffaloes

发情表现 Estrus behavior	发情头数 No. of estrus	可用头数 No. of usable	可用率 Usable rate (%)
明显 Evidence	7	6	85.71 ^A
不明显 Unevidence	8	1	12.50 ^B

($P < 0.01$)。

2.3 胚胎移植结果

综合发情表现和直肠检查结果, 选择发情第 6~7 天、黄体基本合格的 3 头受体移植 4 枚鲜胚, 其中 2 头各移植 1 枚 A 级胚, 1 头在有黄体一侧移植 1 枚 B 级胚和 1 枚 16 细胞胚。结果 1 头在移植后 1 个月内返情, 1 头在 2 个月内返情, 1 头在 3 个月内不返情, 90 d 的妊娠率 33.33%, 但最终无

表 7 水牛不同激素组处理的超排效果比较

Tab. 7 Comparison of effects of superovulation between import and native of hormone in buffaloes

组别 Group	供体数 No. of donors	黄体数 No. of CL	卵泡数 No. of ova	胚胎回收数 No. of embryos flushed	可移植胚数 No. of transferable embryos	可移植胚率 Transferable embryo rate (%)
进口激素组 Import hormone	2	4.00 ± 0.0	0	2.00 ± 2.83	1.50 ± 2.12	75.00 ^A
国产激素组 Native hormone	3	5.00 ± 2.0	0.67 ± 0.58	1.67 ± 2.89	0.33 ± 0.58	19.76 ^B

一头产犊。

3 讨论

3.1 同期发情效果

Suryavanshi et al (2001) 对产后短发情、直肠检查卵巢上有黄体存在的 25 头水牛肌注 25 mg

PGF_{2α}, 对不发情的水牛间隔 11 d 第二次注射 25 mg PGF_{2α}, 共有 18 头对 PGF_{2α} 有反应, 表现发情的间隔时间为 99.67 ± 8.31 h, 其中 10 头自然交配 (可用率 40.00%)。Techakumphu et al (2001a) 用 PGF_{2α} 处理受体水牛同期发情率达 90%, 选择率为 50%。本试验中单独用氯前列烯醇 (PG) 处理

后水牛表现发情时间集中在 72 h 内, 一次 PG 的同期发情率极显著高于二次 PG; 因此, 在试验中采用二次 PG 处理意义不大。这可能是即使在发情季节, 多数水牛的卵巢仍处于静止状态所致。此外, 同期发情效果还受品种、胎次、膘情(体重)的影响。虽然安静发情和明显发情水牛的雌激素浓度无差异(Zicarelli et al, 1993), 但本试验表明, 发情表现明显水牛的可用(或黄体合格)率极显著高于发情表现不明显的。Jiang et al (2003) 用 CIDR + PG_C 处理广西水牛的发情率(85.13%)极显著高于单独使用 PG_C 处理(64.18%), 说明用孕酮栓 + PG 处理水牛的同期发情效果比单独使用 PG 更好。

3.2 超数排卵效果

用 Folltropin 和 FSH-P 处理水牛的超数排卵效果比 PMSG 好(Misra et al, 1999; Sajjan et al, 2001)。本试验用 FSH 处理的超排反应率为 100% (5/5), 其中有 2 头共获 9 枚胚胎。按 5 头供体计

算的头均获胚数和可移植胚数分别为 1.8 ± 2.49 枚和 0.8 ± 1.3 枚, 与国外最初开展的研究比较, 效果属中上水平(表 8)。进口激素组的头均获胚数和可移植胚数比国产激素组分别多 0.33 枚和 1.17 枚, 与 Drost (1996) 对 838 头水牛冲胚得到的头均获胚数 2.38 枚, 可移植胚 1.35 枚的结果基本一致。在传统超排方法的基础上使用 GnRH 和 LH 能获得较高的排卵率和胚胎回收率(Carvalho et al, 2002)。Techakumphu et al (2001b) 把 28 头水牛分为单用 FSH (对照)、在超排后站立发情时用 GnRH 和站立发情 8~12 h 用 GnRH 三组, 在第一次人工授精的第 6~7 天屠宰后比较三组的超排反应, 结果表明 FSH + GnRH 处理可减少未排卵泡数, 增加胚胎回收数和可移植数。本试验冲胚时, 2 头供体卵巢上有大卵泡存在, 未获胚胎, 建议在水牛超数排卵中结合使用 GnRH 或 LH, 以便提高整体超排效果。

表 8 本试验与国外部分学者最初开展的超数排卵研究结果比较

Tab. 8 Comparison of superovulation results between this experiment and the initial trials from overseas

国家 Country	资料来源 Data resource	品种 Breed	激素 Hormone	供体头数 No. of donors	头均获胚数 Average embryos	头均可移植胚数 Average transferable embryos
美国 America	Drost et al (1983)	河流型 Riverine	FSH	1	1.0	1.0
马来西亚 Malaysia	see Misra, 1997	沼泽型 Swamp	FSH	17	0.06	
保加利亚 Bulgaria	Vlahov et al (1986)	河流型 Riverine	FSH PMSG	73	0.5	
泰国 Thailand	Chantaraprateep et al (1988)	沼泽型 Swamp	FSH	7	1.4	
日本 Japan	Ocampo et al (1988)	河流型 Riverine	PMSG	4	0.5	0.0
印度 India	see Misra, 1997	河流型 Riverine	FSH	1	1.0	1.0
巴基斯坦 Pakistan	see Misra, 1997	河流型 Riverine	FSH	12	0.5	
菲律宾 Philippines	see Misra, 1997	河流型 Riverine	FSH PMSG	7 4	2.0 0.0	0.6 0.0
中国 China	本研究 This study	沼泽型与河流型杂交 Crossbred (Swamp × Riverine)	FSH	5	1.8	0.8

超数排卵水牛的胚胎发育速度比其他种类的牛快 24~36 h (Chantaraprateep et al, 1989), 用非手术回收水牛胚胎的最佳时间为超数排卵后发情的第 5.5~6 天 (Misra, 1997)。本试验对超数排卵的供体在第一次人工授精后的第 6 天回收胚胎, 囊胚率 22.22% (2/9)、桑椹胚率 11.11% (1/9)、8~16 细胞胚率 22.22% (2/9)、2~8 细胞胚率 22.22% (2/9)、不受精率 22.22% (2/9)。第 6 天的桑椹胚 + 囊胚率已达 33.33% (3/9), 说明水牛胚胎发育较快, 但由于可能存在排卵不集中, 会导致胚胎发育速度不一致; 因此, 我们认为水牛胚胎回收时间

以 6~6.5 d 较为合适。此外, 在冲胚时出现冲胚管气囊漏气等原因, 也会直接影响获胚数, 提示应尽量确保各环节操作无误。

3.3 移植效果

水牛胚胎移植的妊娠率普遍偏低 (Drost, 1996; Zicarelli, 1997; Techakumphu et al, 2001a)。Techakumphu et al (2001a) 用优秀泰国沼泽型水牛共移植鲜胚 14 枚, 3 个月的妊娠率为 28.6%, 产犊的妊娠率为 14.30%; 移植冻胚 28 枚, 3 个月的妊娠率为 5.9% (1/17), 最后产犊的妊娠率为 3.60%。Drost (1996) 在印度共移植 730 头, 妊娠

率为15.07%,产犊率9.73%。本试验将4枚鲜胚移植给3头受体,3个月的妊娠率为33.33%(1/3),但最终无一头产犊。其主要原因在于:①可供严格选择的受体数量不足,发情效果差、黄体发育不理想。②受体发情时间比供体早12~24 h,受体与供体的发情同步性较差。Misra et al (1999)的研究表明,移植时受体与供体发情同步,妊娠率可高达40.70%(11/27),而受体发情时间与供体相差±12 h,妊娠率仅为14.3%~18.5%。说明水牛供、

受体的发情同步(即子宫内环境一致)比其他种类的牛更为重要。③移植后的饲养管理因素。因此,准备足够数量可供选择的受体,保证供、受体的发情同步化以及加强饲养管理是十分必要的。

致谢:感谢中国科学院昆明动物研究所所长季维智研究员对本工作的支持,以及唐向辉老师对本文提出的修改建议;同时感谢云南省肉牛和牧草研究中心原主任文际坤研究员对本工作的支持。

参考文献:

- Baruselli PS. 1994. Basic requirements for artificial insemination and embryo transfer in buffaloes [J]. *Buffalo J.*, (suppl.) 2: 53-60.
- Carvalho NA, Baruselli PS, Zicarelli L, Madureira EH, Visintin JA, D'occhio MJ. 2002. Control of ovulation with a GnRH agonist after superstimulation of follicular growth in buffalo: Fertilization and embryo recovery [J]. *Theriogenology*, 58 (9): 1641-1650.
- Chantaraprateep P, Lohachit C, Kobayashi G, Techkumphu M, Virakul P, Kunavongkrit A, Prateep P. 1988. Ovarian responses to gonadotrophin stimulation in swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) [J]. *Buffalo Bulletin*, 7 (4): 82-86.
- Chantaraprateep P, Lohachit C, Techkumphu M, Kobayashi G, Virakul P, Kunavongkrit A, Prateep P, Limskul A. 1989. Early embryonic development in Thai swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) [J]. *Theriogenology*, 31: 1131-1139.
- Drost M. 1996. Reproduction technology in buffaloes (*Bubalus bubalis*) [J]. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 2 (1): 93-102.
- Drost M, Wricht JM, Cripe WS, Richter AR. 1983. Embryo transfer in water buffalo (*Bubalus bubalis*) [J]. *Theriogenology*, 20: 579-584.
- Ismail ST, Abboud MY, Tawfik MS, Essawt S, Mohamed KM. 1993. Embryo production in buffalo cows superovulated with PMSG [J]. *Buffalo Journal*, 2: 129-134.
- Jiang RM, Wei YM, Ling ZJ. 2003. The Estrous and conception rates in swamp buffaloes after synchronization by PGc, CIDR alone or combined with other hormones [J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 39 (6): 17-18. [蒋如明, 韦英明, 凌泽继. 2003. 氯前列烯醇、孕酮阴道栓单独或结合其它激素处理本地母水牛后的发情和受胎情况. 中国畜牧杂志, 39 (6): 17-18.]
- Kasiraj R, Misra AK, Rao MM, Jaiswal RS, Rangareddi NS. 1993. Successful culmination of pregnancy and live birth following the transfer of frozen-thawed buffalo embryos [J]. *Theriogenology*, 39 (5): 1187-1192.
- Madan ML, Singla SK, Singh C, Prakash BS, Jaikhani S. 1988. Embryo transfer technology in buffaloes: Endocrine responses and limitation [A]. Proceedings II World Buffalo Congress [C]. New Delhi. 195-211.
- Madan ML, Das SK, Palta P. 1996. Application of reproductive technology to buffaloes [J]. *Animal Reproduction Science*, 42: 299-306.
- Misra AK. 1997. Application of biotechnologies to buffalo breeding in India [J]. *Buffalo Bulletin*, 4 (suppl.): 141-164.
- Misra AK, Joshi BV. 1991. Relationship between the synchrony of donor-recipient oestrus in successful pregnancies of embryo transfer in buffalo [J]. *Buffalo Journal*, 7: 71-75.
- Misra AK, Rao MM, Kasiraj R, Reddy NS, Pant HC. 1999. Factors affecting pregnancy rate following nonsurgical embryo transfer in buffalo (*Bubalus bubalis*): A retrospective study [J]. *Theriogenology*, 52 (1): 1-10.
- Ocampo BM, Uenishi SR, Valdez AC, Pastor J, Cruz L, Kanagawa H. 1988. Non-surgical embryo recovery in the water buffalo [J]. *Jpn. J. Vet. Res.*, 36: 257-263.
- Sajjan S, Pawan S, Sharma RK, Hodda OK. 2001. Response of Murrah buffalo to different superovulatory drugs [J]. *Indian Journal of Animal Reproduction*, 22 (1): 17-18.
- Schallenberger E, Wagner HC, Papa R, Hartl P, Tenhumberg H. 1990. Endocrinological evaluation of the induction of superovulation with PMSG in water buffalo (*Bubalus bubalis*) [J]. *Theriogenology*, 34: 379-392.
- Suryavanshi ST, Dhoble RL, Sawale AG, Dherange NP. 2001. Effect of dinoprost tromethamine on fertility in postpartum suboestrus buffaloes [J]. *Indian Journal of Animal Sciences*, 71: 777-779.
- Techakumphu M, Sukavong Y, Yienvisavakul V, Buntaracha B, Pharee S, Intaramongkol S, Apimeteeumring M, Intaranongkol J. 2001a. The transfer of fresh and frozen embryos in an elite swamp buffalo herd [J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 63 (8): 849-852.
- Techakumphu M, Sukavong Y, Intaramongkol S, Intaranongkol J. 2001b. The effect of gonadotropin releasing hormone on superovulation in elite swamp buffalo cows (*Bubalus bubalis*) [J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 63 (8): 853-857.
- Uoc NT, Ty LV, Nguyen BX, Long DD, CHUPIN. D, Becker JF, Renard JP. 1992. Effect of estradiol supplementation on superovulation in swamp buffalo [J]. *Theriogenology*, 38 (3): 471-478.
- Visintin JA, Assumpçã MEOA, Baruselli PS, Mello MRB, Tavares LMT. 1997. Use of biotechnologies in buffalo bred in Brazil [J]. *Bubalus Bubalis*, 4 (suppl.): 189-204.
- Vlahov K, Karaivanov KH, Petrov M, Kacheva D. 1986. Superovulation and the production of embryo transfer in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Bulgaria [J]. *Vet. Med. Nauki*, 23 (3): 84-88.
- Wang ZK, Wu TG, Yu DQ, Wang Z, Wang KH, Lei C, Lui ZH. 1994. Effect of LH on superovulation of swamp buffalo in China [J]. *Theriogenology*, 41: 331 (abstr.).
- Zicarelli L. 1997. Superovulatory response in buffalo bred Italy [J]. *Bubalus Bubalis*, 4 (suppl.): 169-188.
- Zicarelli L, Campanile G, Seren E, Borchese A, Parmeggiani A, Barile V. 1993. Perioestrus endocrine changes in Italian buffaloes with silent oestrus or ovarian disorders [A]. Proceedings of the International Symposium: Prospects of Buffalo Production in the Mediterranean and the Middle East [C]. Cairo, Egypt. 397-400.