

Kualitas Oosit Kerbau dari Status Reproduksi Ovarium yang Berlainan

The Quality of Buffalo Oocytes from Various Ovaries Reproduction Cycles

Sri Gustina¹, Hasbi Hasbi², Ni Wayan Kurniani Karja³, Mohamad Agus Setiadi³,
 Iman Supriatna³

¹Jurusan Peternakan, Fakultas Peternakan dan Perikanan, Universitas Sulawesi Barat,
 Jl. Prof. Dr. Baharuddin Lopa, Tande Timur, Majene, 91412

²Jurusan Produksi Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Hasanuddin,
 Jl. Perintis Kemerdekaan Km. 10, Makassar, 90245

³Divisi Reproduksi dan Kebidanan, Departemen Klinik, Reproduksi, dan Patologi,
 Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Jl. Agatis, Kampus IPB Darmaga, Bogor, 16680
 Email: karjanwk13@gmail.com

Abstract

In vitro embryo production relies on the quality of oocytes, however the quality is subjected to ovaries reproduction cycle. This study was conducted to observe the potency of buffalo ovaries from various reproductive cycle in producing quality oocytes. Collected pairs of ovaries from slaughter house were weighed and grouped of 5 according to the cycle. Oocytes were collected by slicing techniques, then selected based on quality. The results showed the average weight of buffalo ovaries of (+CL, +FD); (+CL, -FD); (-CL, +FD); (-CL, -FD) are 7.2 g; 5.5 g; 4.1 g; and 4.5 g respectively. No significant quality difference of produced oocytes between ovaries cycles ($P>0.5$). Good quality of collected oocytes were only 40-55%. Approximately 2-5 oocytes of grade A and 1-5 oocytes of grade B can be collected per pair of ovaries.

Key words: reproduction cycle, buffalo ovaries, oocytes quality

Abstrak

Kualitas oosit merupakan faktor penting dalam keberhasilan produksi embrio *in vitro*, sementara kualitas oosit sangat erat kaitannya dengan status reproduksi ovarium. Penelitian ini bertujuan untuk melihat potensi ovarium kerbau dengan status reproduksi yang berbeda dalam menghasilkan oosit yang berkualitas. Tiap pasang ovarium dari rumah potong hewan dikelompokkan berdasarkan status reproduksinya dan kemudian ditimbang. Sekitar 5 pasang ovarium yang digunakan untuk masing-masing kelompok. Oosit dari ovarium dikoleksi dengan teknik pencacahan, kemudian diseleksi berdasarkan kualitasnya. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kerbau memiliki berat ovarium rata-rata 7.2 g dengan status (+CL, +FD); 5.5 g dengan status (+CL, -FD); 4.1 g dengan status (-CL, +FD); serta 4.5 g dengan status (-CL, -FD). Kualitas oosit yang dihasilkan dari empat status ovarium tidak terdapat perbedaan yang signifikan ($P>0.05$). Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa berat rata-rata ovarium kerbau berkisar antara 4.1-7.2 g dimana status reproduksi ovarium tidak berpengaruh terhadap kualitas oosit yang dihasilkan. Hanya sekitar 40-55% oosit kualitas baik yang bisa dikoleksi dari ovarium kerbau, dengan grade A sekitar 2-5 oosit dan B sekitar 1-5 oosit per pasang ovarium.

Kata kunci: status reproduksi, ovarium kerbau, kualitas oosit

Pendahuluan

Kerbau merupakan salah satu komoditas ternak di Indonesia yang berpotensi sebagai sumber protein hewani berkualitas tinggi, baik dari susu

maupun daging. Kerbau mampu menjaga produktivitas di padang rumput yang terbatas. Efisiensi konversi pakan yang baik pada kerbau dan mekanisme perawatan yang relatif rendah merupakan

alasan mengapa kerbau termasuk ternak dengan sistem produksi dengan biaya yang rendah (Paul *et al.* 2002). Produktivitas kerbau dengan kondisi pemeliharaan ekstensif dilaporkan lebih baik dibandingkan sapi. Hal ini disebabkan oleh kemampuan daya adaptasi dan pencernaan serat kasar yang tinggi pada kerbau (Diwyanto dan Handiwirawan, 2006). Jika dibandingkan dengan sapi, kerbau dikenal sebagai ternak dengan performa reproduksi yang rendah. Permasalahan efisiensi reproduksi yang sering terjadi seperti masa pubertas yang lambat, umur *calving* pertama yang tinggi, *postpartum anoestrus* yang panjang, tanda-tanda berahi yang kurang jelas, angka kebuntingan yang rendah, serta *calving intervals* yang panjang (Perera, 2011). Secara umum, ukuran ovarium kerbau lebih kecil dibandingkan dengan sapi (Vittoria, 1997), dengan jumlah folikel yang sedikit pada setiap gelombang (Gimenes *et al.* 2009), respon superovulasi yang rendah dan juga tingginya angka folikel atresi (Haldar dan Prakash, 2007; Hufana-Duran *et al.* 2007).

Salah satu upaya untuk meningkatkan kesuburan pada ternak kerbau dapat melalui teknologi reproduksi berbantuan seperti produksi embrio *in vitro* (PEIV). Oosit dengan kualitas yang baik diperlukan untuk menghasilkan embrio secara *in vitro*, namun oosit dengan jumlah dan kualitas yang baik sangat dipengaruhi oleh berbagai faktor diantaranya adalah status reproduksi dari ovarium (Abdoon, 2001). Boediono dan Setiadi (2006) menyebutkan bahwa kehadiran *corpus luteum* (CL) pada pasangan ovarium berkorelasi positif terhadap jumlah folikel. Folikel-folikel subordinat akan tetap tumbuh walaupun dengan keberadaan CL. *Corpus luteum* menghasilkan progesteron yang akan menghambat pertumbuhan folikel dominan (FD), menghilangkan pengaruh inhibin sehingga folikel lain bisa berkembang (Kor, 2014).

Fisiologi ovarium kerbau dan sapi berbeda secara fundamental. Hal ini terlihat dari rendahnya

respon kerbau terhadap perlakuan superstimulasi folikel, perolehan embrio dan oosit, serta jumlah embrio layak transfer (Misra dan Tyagi, 2007). Kualitas oosit merupakan parameter penting dalam menentukan tingkat keberhasilan embrio. Sementara itu, kualitas oosit juga sangat dipengaruhi oleh status reproduksi ovarium. Oleh karena itu penelitian ini dilakukan untuk melihat potensi ovarium kerbau dengan status reproduksi yang berbeda sebagai penghasil oosit dengan kualitas yang baik.

Materi dan Metode

Ovarium kerbau diperoleh dari rumah potong hewan dan dibawa ke laboratorium dalam larutan NaCl fisiologis dengan tambahan antibiotik. Ovarium dicuci dua kali dengan larutan NaCl kemudian dikelompokkan berdasarkan status reproduksinya, dimana pembagian dilakukan berdasarkan: (1) ada CL, ada FD +CL + FD; (2) ada CL, tanpa FD +CL -FD; (3) tanpa CL, dan FD -CL + FD; dan (4) tanpa CL, tanpa FD -CL -FD. Setiap pasang ovarium kemudian ditimbang (Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland). Oosit dikeluarkan dari ovarium dengan menggunakan teknik pencacahan (*slicing*) dan selanjutnya dikoleksi pada medium *phosphate buffered saline* (PBS) yang ditambah 0.2% *bovine serum albumin* (BSA) (Sigma, USA).

Oosit dari setiap pasang ovarium diseleksi di bawah mikroskop stereo (Olympus, Tokyo, Japan). Klasifikasi oosit berdasarkan karakteristik morfologinya terbagi atas 4 yaitu oosit dengan sitoplasma yang homogen dan memiliki banyak lapis sel kumulus yang kompak (grade A), oosit dengan sitoplasma homogen yang dikelilingi dua hingga tiga lapis sel kumulus (grade B), oosit dengan sitoplasma heterogen yang dikelilingi satu hingga dua lapis sel kumulus yang tidak kompak (grade C), dan oosit yang gundul (grade D) (Abdoon *et al.* 2014).

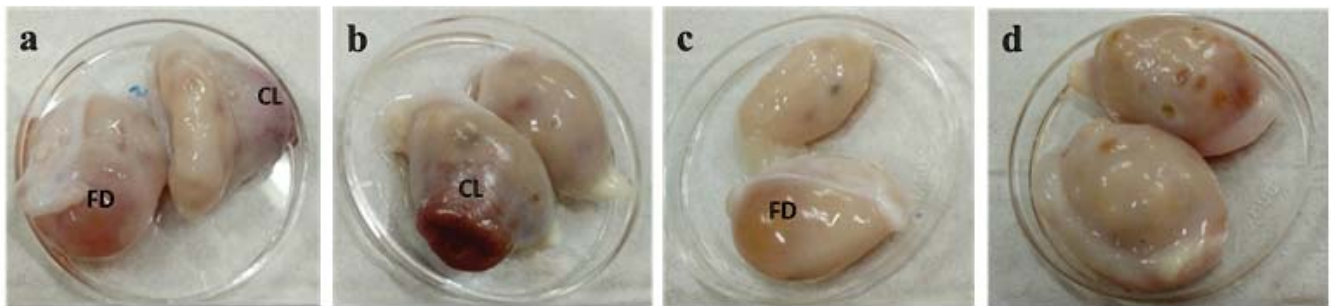
Analisis Data

Data dianalisis dengan analisis sidik ragam (ANOVA) dalam bentuk rancangan acak lengkap empat perlakuan dengan ulangan berbeda. Apabila terdapat perbedaan diantara perlakuan dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil. Data diolah menggunakan program SPSS versi 21 *for windows* dan *MS Office Excel 2010*.

Hasil dan Pembahasan

Hasil penelitian menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang nyata ($P > 0.05$) antara berat ovarium kerbau dengan status reproduksi yang berbeda (Gambar 1). Ovarium dengan status (+CL, +FD)

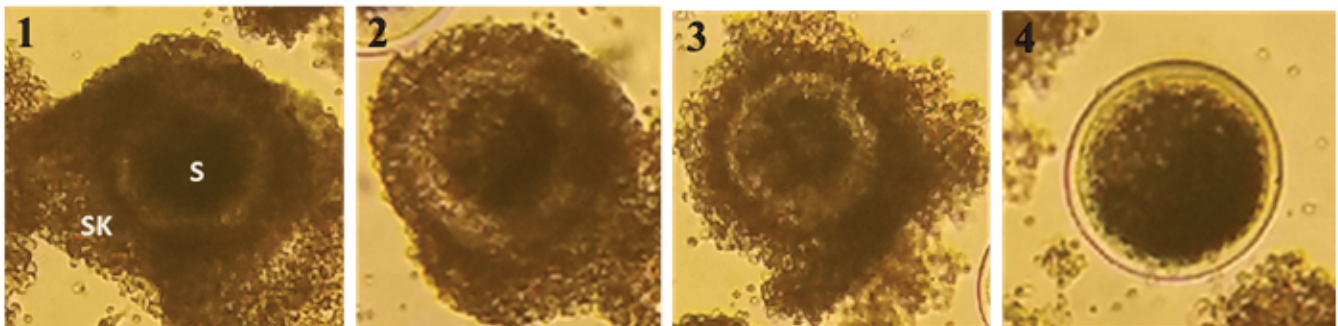
memiliki berat rata-rata 7.2 g, selanjutnya 5.5 g untuk status (+CL, -FD), 4.1 g dengan status (-CL, +FD), serta 4.5 g dengan status (-CL, -FD). Ovarium kerbau yang digunakan pada penelitian ini memiliki bentuk oval, seperti yang telah dilaporkan oleh El-Fouly (1983) bahwa ovarium kerbau dewasa dengan kondisi tidak bunting memiliki bentuk oval seperti almond. Menurut Dannell (1987) dan Zicarelli (1997) bahwa berat ovarium kerbau berkisar antara 2.5 g pada kondisi inaktif dan 4 g pada kondisi aktif, dan memiliki jumlah folikel tersier yang sedikit. Ovarium kerbau memiliki ukuran yang lebih kecil jika dibandingkan dengan sapi (Vittoria 1997).



Gambar 1. Status reproduksi ovarium kerbau. a. (+CL, +FD); b. (+CL, -FD); c. (-CL, +FD); dan d. (-CL, -FD). *Corpus luteum* (CL), folikel dominan (FD).

Kualitas oosit merupakan parameter yang penting dalam menentukan tingkat keberhasilan embrio (Gambar 2). Oosit dengan kualitas baik dan layak digunakan untuk produksi embrio *in vitro* adalah

oosit dengan grade A dan B yang ditandai dengan beberapa lapis sel kumulus yang kompak serta sitoplasma yang terlihat homogen (Manjunatha *et al.* 2007).



Gambar 2. Kualitas oosit kerbau: (1) grade A, (2) grade B, (3) grade C, dan (4) grade D. Sel k u m u l u s (S K) ; sitoplasma (S). (Perbesaran 10 x 10)

Hasil analisa menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan ($P>0.05$) antara status reproduksi ovarium terhadap kualitas oosit yang dihasilkan baik untuk grade A, B, C, maupun D (Tabel 1). Hal ini menunjukkan bahwa pada fase luteal [(+CL, +FD) dan (+CL, -FD)], fase folikuler (-CL, +FD), dan fase ovarium tidak aktif (-CL, -FD) tidak mempengaruhi kualitas oosit kerbau. Hal ini berbeda

dengan hasil yang telah dilaporkan oleh Manjunatha *et al.* (2007) bahwa kompetensi perkembangan oosit bergantung pada status ovarium. Proporsi oosit dengan kompetensi yang baik, lebih tinggi tanpa kehadiran FD dibandingkan dengan adanya FD. Menurut Hagemann *et al.* (1999) bahwa kehadiran FD pada salah satu atau sepasang ovarium dapat memberikan pengaruh negatif terhadap kompetensi perkembangan oosit.

Tabel 1. Potensi ovarium kerbau sebagai sumber oosit.

Perlakuan	Rata-rata berat ovarium (n)	Jumlah oosit terkoleksi	Rata-rata jumlah oosit/pasang ovarium berdasarkan klasifikasi			
			Grade A	Grade B	Grade C	Grade D
(+CL, +FD)	7.2 ± 0.8 g (3)	20	5.0 ± 1.0	4.7 ± 1.5	4.7 ± 0.4	5.7 ± 2.1
(+CL, -FD)	5.5 ± 0.5 g (4)	10	2.8 ± 0.3	1.8 ± 0.7	2.3 ± 1.1	3.3 ± 1.1
(-CL, +FD)	4.1 ± 0.3 g (3)	11.3	3.0 ± 1.5	3.0 ± 1.5	2.7 ± 1.7	2.7 ± 1.5
(-CL, -FD)	4.5 ± 0.8 g (5)	13.6	3.8 ± 2.2	2.6 ± 1.1	4.2 ± 1.1	3.0 ± 1.3

Keterangan: CL, *corpus luteum*; FD, folikel dominan; ada CL, ada FD (+CL, +FD); ada CL, tanpa FD (+CL, -FD); tanpa CL, ada FD (-CL, +FD); dan tanpa CL, tanpa FD (-CL, -FD).

Pada hewan monotokus, dalam satu siklus hanya satu folikel yang akan terpilih menjadi folikel dominan dan akan berovulasi ketika terjadi luteolisis. Folikel dominan tersebut akan menghasilkan estrogen dan inhibin yang akan memberikan umpan balik negatif terhadap sekresi *follicle stimulating hormone* (FSH) (Perera, 2011). Akibat dari rendahnya konsentrasi FSH menyebabkan folikel-folikel subordinat mengalami hambatan perkembangan dan selanjutnya mengalami atresi (Ginther *et al.* 1996), yang akan menurunkan jumlah folikel yang kompeten. Kejadian atresi pada folikel subordinat terutama yang terjadi selama fase dominan pada gelombang folikel sangat mungkin mempengaruhi kompetensi oosit. Menurut Boediono dan Setiadi (2006) bahwa

hambatan terhadap perkembangan folikel akibat keberadaan FD ternyata juga mempengaruhi kualitas oosit yang dihasilkan. Jumlah sel yang mengalami apoptosis lebih tinggi selama fase dominan dibandingkan fase pertumbuhan (Manjunatha *et al.* 2007).

Sebaliknya, kehadiran CL pada ovarium tidak menghalangi pertumbuhan folikel-folikel subordinat. Hormon progesteron yang dihasilkan dari CL menyebabkan hambatan terhadap pertumbuhan folikel dominan sehingga menurunkan konsentrasi estrogen dan inhibin (McGee dan Hsueh, 2000). Selanjutnya terjadi peningkatan sekresi FSH akibat hilangnya pengaruh negatif dari estrogen dan inhibin. Dengan demikian, folikel-folikel subordinat bisa tumbuh dan

berkembang lebih banyak dengan kualitas oosit yang lebih baik (Taylor dan Rajamahendran, 1991). Pada penelitian ini, tidak adanya pengaruh yang signifikan dari status ovarium juga mungkin disebabkan karena oosit kerbau yang rentan dengan stress. Menurut Neglia *et al.* (2003) bahwa oosit kerbau lebih sensitif terhadap stres lingkungan dibandingkan dengan oosit sapi.

Jika dilihat dari Tabel 1, tiap status ovarium yang berbeda hanya mampu menghasilkan oosit dengan kualitas baik sekitar 40-55% saja. Hanya sekitar 2-5 oosit yang layak untuk maturasi dengan *grade* A dan 1-5 oosit dengan *grade* B yang bisa diperoleh. Menurut Nandi *et al.* (2002) bahwa banyak faktor yang bisa mempengaruhi rendahnya kualitas oosit kerbau, salah satu diantaranya adalah tingginya persentase folikel atresi. Oosit yang berasal dari folikel yang mengalami atresi mempunyai kualitas yang rendah (Hennet dan Combelles 2012). Selain itu, rendahnya jumlah perolehan oosit juga diduga akibat sedikitnya jumlah cadangan folikel pada ovarium kerbau. Kerbau memiliki gelombang pertumbuhan folikel yang sama dengan sapi, yang terdiri atas fase perekrutan, seleksi, dominan, dan atresia (Campanile *et al.* 2010). Jumlah gelombang folikel selama siklus estrus bisa bervariasi mulai dari satu hingga tiga gelombang, namun yang paling sering muncul adalah 2 gelombang sekitar 63% (Baruselli *et al.* 1997; Neglia *et al.* 2007). Jumlah folikel yang direkrut pada kerbau dalam satu gelombang dilaporkan lebih rendah dibandingkan sapi. Hal ini berkaitan dengan rendahnya jumlah cadangan folikel primordial kerbau yaitu hanya sekitar 12,636 folikel dibandingkan dengan sapi sekitar 50,000 (Danell, 1987).

Persentase folikel atresi kerbau cenderung tinggi dibandingkan dengan sapi sekitar 67% (Danell, 1987). Kurangnya rangsangan kawin bisa menyebabkan populasi oosit mengalami atresia atau penuaan yang berakibat pada rendahnya kompetensi

perkembangan oosit selama tahap folikular (Karja *et al.* 2002). Di sisi lain, jumlah folikel yang tidak mengalami atresi (>1.7 mm) antara 1-5 folikel pada kerbau, sedangkan pada sapi sekitar 17-32 folikel (Ty *et al.* 1989). Selain faktor tersebut, ovarium diambil dari kerbau yang disembelih sehingga diduga memberikan pengaruh yang besar. Kerbau biasanya disembelih dengan alasan subfertilitas, kondisi tubuh yang buruk, dan usia lanjut, dimana oosit *immature* yang berasal dari kerbau dengan performa reproduksi rendah atau yang mengalami penuaan memiliki kualitas yang heterogen dengan kompetensi perkembangan yang rendah (Raghu *et al.* 2002).

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa tidak ada pengaruh nyata dari status reproduksi ovarium terhadap kualitas oosit yang dihasilkan pada kerbau. Berat rata-rata ovarium kerbau berkisar antara 4.1 hingga 7.2 g.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk melihat kemampuan perkembangan oosit secara *in vitro* dari oosit yang berasal dari ovarium dengan status reproduksi yang berbeda.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi yang telah memberikan beasiswa program pascasarjana dalam negeri (BPPDN) sehingga penelitian ini bisa terlaksana. Prof. Dr. Ir. Herry Sonjaya, DEA, DES selaku kepala Laboratorium Terpadu Universitas Hasanuddin.

Daftar Pustaka

Abdoon, A.S.S. (2001) Factors affecting follicular population, oocyte yield and quality in camels (*Camelus dromedarius*) ovary with special reference to maturation time *in vitro*. *Anim.*

Reprod. Sci. 66: 71-79.

- Abdoon, A.S., Gabler, C., Holder, C., Kandil, O.M., Einspanier, R. (2014). Seasonal variations in developmental competence and relative abundance of gene transcripts in buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. *Theriogenology*. 82: 1055-1067.
- Baruselli, P.S., Mucciolo, R.G., Visintin, J.A., Viana, W.G., Arruda, R.P., Madureira, E.H., Oliveira, C.A. and Molero-Filho, J.R. (1997). Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*. 47: 1531-1547.
- Boediono, A. dan Setiadi, M.A. (2006). Tingkat Pematangan Inti Oosit Domba dari Ovarium dengan Status Reproduksi dan Medium Maturasi yang Berbeda. *HAYATI J. Biosci.* 13: 131-136.
- Campanile, G., Baruselli, P.S., Neglia, G., Vecchio, D., Gasparrini, B., Gimenes, L.U., Zicarelli, L., and D'Occhio, M.J. (2010). Ovarian function in the buffalo and implications for embryo development and assisted reproduction. *Anim. Reprod. Sci.* 121: 1-11.
- Danell, B. (1987). Oestrous behaviour, ovarian morphology and cyclical variation in follicular system and endocrine pattern in water buffalo heifers. PhD Thesis. Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences.
- Diwyanto, K., dan Handiwirawan, E. (2000). Strategi pengembangan ternak kerbau: Aspek penjarangan dan distribusi. Prosiding. Lokakarya Nasional Usaha ternak Kerbau Mendukung Program Kecukupan Daging Sapi. Balitbang Deptan Puslitbang Peternakan bekerjasama dengan Direktorat Perbibitan Ditjenak, DisPet Provinsi NTB dan Pemda Kab. Sumbawa. Sumbawa (ID), 4(5).
- El-Fouly, M.A. (1983). Some reproductive aspects of the Egyptian buffalo cow. *Buffalo Bulletin*. 2: 3-4.
- Gimenes, L.U., Fantinato Neto, P., Arango, J.S.P., Ayres, H. and Baruselli, P.S. (2009). Follicular dynamics of *Bos indicus*, *Bos taurus* and *Bubalus bubalis* heifers treated with norgestomet ear implant associated or not to injectable progesterone. *Anim. Reprod.* 6: 256.
- Ginther, O.J., Wiltbank, M.C., Fricke, P.M., Gibbons, J.R., and Kot, K. (1996). Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.* 55: 1187-1194.
- Hagemann, L.J., Beaumont, S.E., Berg, M., Donnison, M.J., Ledgard, A., Peterson, A.J., Schurmann, A. and Tervit, H.R. (1999). Development during single IVP of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. *Mol. Reprod. Dev.* 53: 451-458.
- Haldar, A. and Prakash, B.S. (2007). Effect of exogenous growth-hormone-releasing factor on blood metabolites and minerals in late maturing buffalo heifers (*Bubalus bubalis*). *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 91: 326-332.
- Hennet, M.L. and Combelles, C.M.H. (2012). The antral follicle: a microenvironment for oocytes differentiation. *Int. J. Dev. Biol.* 56: 819-831.
- Hufana-Duran, D., Pedro, P.B., Venturina, H.V., Duran, P.G. and Cruz, L.C. (2007). Full-term delivery of River buffalo calves (2n = 50) from *in vitro*-derived vitrified embryos by swamp buffalo recipients (2n = 48). *Livest. Sci.* 107: 213-219.
- Karja, N.W.K., Otoi, T., Murakami, M., Fahrudin, M., and Suzuki, T. (2002). In vitro maturation, fertilization and development of domestic cat oocytes recovered from ovaries collected at three stages of the reproductive cycle. *Theriogenology*. 57: 2289-2298.
- Kor, N.M. (2014). The effect of corpus luteum on hormonal composition of follicular fluid from different sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 7: S282-S288.
- Manjunatha, B.M., Gupta, P.S.P., Ravindra, J.P., Devaraj, M., Ramesh and H.S., Nandi, S. (2007). In vitro developmental competence of buffalo oocytes collected at various stages of the estrous cycle. *Theriogenology*. 68: 882-888.
- McGee, E.A. and Hsueh, A.J. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles 1. *Endocrinol. Rev.* 21: 200-214.
- Misra, A.K. and Tyagi, S. (2007). In vivo embryo production in buffalo: present and perspectives. *Ital. J. Anim. Sci.* 6: 74-91.

- Nandi, S. and Raghu, H.M., Ravindranatha, B.M., Chauhan, M.S. (2002). Production of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos in vitro: premises and promises. *Reprod. Dom. Anim.* 37: 65–74.
- Neglia, G., Gasparini, B., Brienza, V.C., di-Palo, R., Campanile, G., Presicce, G.A. and Zicarelli, L. (2003). Bovine and buffalo in vitro embryo production using oocytes derived from abattoir ovaries or collected by transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology*. 59: 1123–1130.
- Neglia, G., Natale, A., Esposito, G., Salzillo, F., Adinolfi, L., Zicarelli, L. and Francillo, M. (2007). Follicular dynamics in synchronized Italian Mediterranean buffalo cows. *Italian J. Anim. Sci.* 6: 611–614.
- Paul, S.S., Mandal, A.B., Pathak, N.N. (2002). Feeding standards for lactating riverine buffaloes in tropical conditions. *J. Dairy Res.* 69: 173–180.
- Perera, B.M. (2011). Reproductive cycles of buffalo. *Anim. Reprod. Sci.* 124: 194-199.
- Raghu, H.M., Nandi, S., Reddy, S.M. (2002). Recovery rate and developmental potential in vitro of buffalo oocytes depend on age of the animal. *Indian J. Anim. Sci.* 72: 57–8.
- Taylor, C., Rajamahendran, R. (1991). Follicular dynamics and corpus luteum growth and function in pregnant versus nonpregnant dairy cows. *J. Dairy Sci.* 74: 115-123.
- Ty, L.V., Chupin, D., Driancourt, D.A. (1989). Ovarian follicular population in buffaloes and cows. *Anim. Reprod. Sci.* 19: 171–178.
- Vittoria, A. (1997). Anatomy of the female genital tract in the buffalo. In: Proc. Third Course on Biotechnology of Reproduction in Buffaloes, Issue II, Caserta, Italy, pp. 15–20.
- Zicarelli, L. (1997). Reproductive seasonality in buffalo. In: Proc. Third Course on Biotechnology of Reproduction in Buffaloes, Issue II, Caserta, Italy, pp. 29–52