

İKİ FARKLI SULANDIRICIYLA DONDURULMUŞ SAANEN TEKE SPERMASININ İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

(In vitro evaluation of saanen buck semen frozen in two different extenders)

Recai KULAKSIZ¹

Ali DAŐKIN¹

¹Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı- Ankara

Geliş Tarihi : 03.03.2008

Kabul Tarihi : 16.07.2008

ÖZET

Sunulan çalışmanın amacı, in vitro olarak çözüm sonrası teke spermasının spermatolojik özellikleri üzerine Tris ve Andromed sulandırıcılarının etkisini araştırmaktır. Çalışmanın materyalini 2 baş Saanen ırkı teke oluşturmuştur. Spermalar aşım sezonu içerisinde her tekeden 5'er ejakülat olmak üzere haftada iki kez sun'i vajen yöntemiyle alınmuştır. Alınan spermalar iki eşit hacme bölündükten sonra 37°C' ye ayarlanmış su banyosunda Tris ve Andromed sulandırıcılarıyla sulandırılmıştır. Sulandırma 1:10 oranında yapılmıştır. Sulandırılmış sperma 0.25 ml'lik payetlere çekilmiş, 4°C' de 2.5 saat ekilibrasyona bırakılmıştır. Payetler sıvı azot buharında (-110°C/-130°C arasında 10 dakika) dondurularak, sıvı azot içinde (-196°C) muhafaza edilmiştir. Sperma su banyosunda 37° C' da 30 saniyede çözdürülerek spermatolojik muayeneler yapılmıştır. Bu çalışmada, çözüm sonrası; spermatozoa motilitesi (%) (34±4.1; 20±3.5), anormal spermatozoa oranı (%) (45.40±3.7; 62.40±5.7), akrozoma bağlı anormal oranı (%) (24.80±2.8; 42.80±2.7) ve hypo-osmotik Şişme test oranı (HOST) (%) (36±3.5; 27.20±2.3) yönünden Andromed ve Tris sulandırıcıları arasında istatistiki olarak önemli bir fark belirlenmiş (P<0.05), ölü spermatozoa yönünden istatistiki olarak önemli bir fark belirlenmemiştir (P>0.05). Sonuç olarak, Andromed sulandırıcısının Tris sulandırıcısından çözüm sonrası bazı spermatolojik parametreler üzerine daha olumlu etki yaptığı saptanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Teke sperması, sulandırıcı, dondurma, spermatolojik parametreler

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate for the effects of Tris-glucose-citric acid- egg yolk and Andromed extender, free of egg yolk, on sperm characteristics of buck semen after thawing in vitro. Two Saanen buck were used in this study. Semen was collected by an artificial vagina twice a week in autumn (mating season). After being divided into 2 equal aliquots, the collected semen diluted in tris diluent or andromed at 37°C in water bath. Dilutions were carried out at a proportion of 1:10. The diluted semen was placed in 0.25 ml plastics straws and equilibrated (at 4°C 2.5 hours) and frozen in vapour of liquid nitrogen (LN) (15 minutes at -110/-130 °C). Frozen straws were stored in liquid nitrogen (-196 °C). Straws were thawed in the water bath at 37°C for 30 seconds and spermatological examinations were carried out. The results demonstrated that spermatozoa motility (%), abnormal spermatozoa rate (%), acrosome abnormal rate (%) and hypo-osmotic swelling test (HOST) rate (%) were in frozen-thawed semen processed in Andromed (34±4.1, 45.40±3.7, 24.80±2.8, 36±3.5) were significantly (P<0.05) higher compare to Tris-egg yolk extender (20±3.5, 62.40±5.7, 42.80±2.7, 27.20±2.3). Regarding dead spermatozoa rate (%), there was no difference in between two extenders (51.80±6.3 Andromed versus 59.40±5.5 Tris; P>0.05). Consequently, it was found that Andromed was better than tris according to some sperm parameters evaluated post-thaw.

Key words : Buck semen, extender, freezing, spermatological parameters

GİRİŐ

Ülke hayvancılığı potansiyelinde önemli bir yere sahip olan keçi yetiştiriciliğinin et, süt, tiftik, deri, kıl gibi verimlerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Hayvansal üretimin artırılması, çevre koşullarının iyileştirilmesi yanında, asıl olarak hayvan ırklarının genotiplerinin ışlahı ile mümkündür. Bu ışlah çalışmalarının yapıl-

masındaki en önemli araç da suni tohumlamadır (21).

Ülkemizde süt keçiciliğine karşı giderek artan bir talep vardır. Keçi yetiştiriciliğinde damızlık gereksinimleri karşılamak üzere Saanen ırkı sütçü genotiplere gerek vardır. Bu noktada dondurulmuş teke sperması üzerinde durulmalıdır. Damızlık gereksinimlerin karşı-

lanmasında suni tohumlamadan mutlaka yararlanılmalıdır. Suni tohumlamanın yaygınlaştırılmasındaki en önemli unsur spermanın dondurularak uzun süreli saklanmasıdır (16,17).

Keçi spermasının saklanmasıdaki en önemli problem, spermatozoonların canlılığı üzerine seminal plazmanın zararlı etki göstermesidir. Yumurta sarısı içeren sulandırıcılarla ilişkilendirilen problem, bulbouretral bez sekresyonunda bulunan ve seminal plazmada yer alan, yumurta sarısı koagule edici özellik taşıyan enzime (EYCE) bağlanmıştır. EYCE, yumurta sarısı lesitini yağ asitlerine dönüştüren ve lisesitin hidrolizini katalizleyen fosfolipaz A olarak tanımlanmıştır. Lisesitin bileşiği teke spermatozoonları için toksiktir. Seminal plazmadaki fosfolipaz A2 etkinliği yumurta sarısı kullanılarak kanıtlanmıştır. Yumurta sarısı içeren sulandırıcılarla elde edilen başarı iki faktöre bağlanmıştır; (a) sezonal ve bireysel etkiye bağlı olarak değişen seminal plazmadaki EYCE varlığı, (b) tavukların yetiştirilmesine bağlı olarak değişiklik gösteren yumurta sarısı içeriisindeki varyasyondur (14,19).

Teke spermasının kısa veya uzun süreli saklanması en yaygın olarak kullanılan sulandırıcılar arasında, yağsız inek sütü-0,5 M glukoz, Tris-sitrik asit-glukoz-yumurta sarısı ve Na-sitrat-glukoz-yumurta sarısı sulandırıcıları sayılabilir. Çözüm sonrası canlılık ve fertilité oranlarının değerlendirilmesi sonucunda sulandırıcılar arasında önemli farklar belirlenmemiştir (5,11, 20).

Yumurta sarısı ve süt gibi hayvansal kökenli bileşikler içeren sulandırıcıların kullanılması mikroorganizmalarla muhtemel bulaşma riski açısından önemli kuşklara yol açmaktadır. Sulandırıcıları kontaminasyonu ve mikroorganizmaların metabolizma ürünlerinin artması spermatozoanın fertilitasyon kabiliyetinin bozulmasına yol açabilir. Soya fasülye-

sinden elde edilen lesitin ticari preparatlarının (Andromed, Bioxell vb) yumurta sarısıyla eşit derecede spermatozoayı soğuk şokundan koruduğu bildirilmiş ve sulandırıcılardaki hayvansal kökenli proteinlere alternatif olarak soya proteini (promine-D) kullanılmasının uygun olacağı belirtilmiştir (13).

Bu araştırmada, teke spermasının sulandırılmasında yaygın olarak kullanılan Tris sulandırıcısı ile bitkisel kökenli (soya lesitini içeren) Andromed sulandırıcısının çözüm sonrası başlıca spermatozojik parametrelere etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Hayvan materyali ve spermanın alınması

Çalışma materyalini, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü Hayvancılık İşletmesinde bulunan 2-3 yaşlarında 2 baş Saanen tekesi oluşturmuştur. Çiftleşme sezonu boyunca düzenli olarak tekelerden haftada en az iki kez suni vajenle sperma alınmıştır. Elde edilen ejakülatlar sperma alınan yerde başlıca spermatozojik özellikler yönüyle muayene edilmiştir.

Spermanın sulandırılması ve değerlendirilmesi

Bu araştırmada ejakülatların sulandırılmasında Tris sulandırıcısı (3.63 gr tris, 1.99 gr sitrik asit , 0,5 gr glukoz, 10 ml yumurta sarısı, 5 ml gliserol /100ml distile su-pH:6,8) ve Andromed sulandırıcısı (1 ml Andromed solüsyonu 4 ml distile su ile sulandırılmıştır) kullanılmıştır. İki farklı Saanen tekesinden alınan spermalar deney tüplerinde birleştirilip karışım elde edildikten sonra 2 gruba ayrılmıştır. Karıştırılmış ejakülatlar her birisinde 0,5 ml olacak şekilde deney tüplerine bölünmüş ve hazırlanan 2 farklı sperma sulandırıcısı (Tris ve Andromed) 1:10 oranında sulandırılmıştır.

Sulandırma işlemini takiben 2 farklı renkte 0,25 ml'lik payetlere çekilmiş ve payetlerin açık uçları Polivinil alkol ile kapatılmıştır. 4° C' da 2,5 saat ekilibrasyona bırakılmıştır. Ekilibrasyonu izleyen süreçte sıvı azot seviyesinin 4-7 cm üzerinden (-110/-130°C) sıvı azot buharında 10 dakika süreyle dondurulmuştur. Dondurma işlemini takiben, payetler sıvı azot içine daldırılmıştır. Payetler spermatolojik değerlendirmelerin yapılacağı güne kadar sıvı azot tankında (sıvı azot içinde) saklanmıştır.

Yukarıda belirtilen işlemlerden geçirilerek, payetlerde dondurulan ve sıvı azot içinde tutulan 2 farklı sulandırıcı kullanılan spermalar 37 °C'lik su banyosunda 30 saniyede çözdürüldükten sonra; spermatozoa motilitesi, ölü-canlı spermatozoa oranı, anormal spermatozoa oranı, akrozoma bağlı anormal spermatozoa oranı ve hipoozmotik şişme testi (HOS-test) yönünden değerlendirilmiştir. Spermatozoa motilitesi 37°C'ta ısıtma tablalı faz kontrast mikroskopun 100x büyütmesinde lam-lamel arasına alınan bir damla sperma numunesinde en az 4 mikroskop sahasına bakılarak yapılmıştır, 4 sahanın ortalaması yüzde olarak kaydedilmiştir. Ölü-canlı spermatozoa oranının belirlenmesinde Eosin boyama testinden yararlanılmıştır. Temiz bir lam üzerine konan bir sperma örneği eşit büyüklükte eosin boyasıyla karıştırılarak hemen sürme preparat hazırlanmış ve sürme preparatlar mikroskop altında 400x büyütmede 400 spermatozoon sayılarak değerlendirilerek % olarak kaydedilmiştir. Baş kısmı boya almış spermatozoonlar ölü, boya almamış olanlar canlı olarak kabul edilmiştir. Anormal spermatozoa oranı ependorf tüplerindeki Hancock sıvısına (1ml hancock solüsyonuna 1 damla sperma eklenerek) alınan sperma numunesinin faz-kontrast mikroskopun immersiyon objektifinde lam-lamel arasına bir damlasında spermatozoa akrozom, baş, orta, kuyruk kısmı anomalilerin % olarak tespit edilmesiyle belirlenmiştir. Plazma membran

fonksiyonel bütünlüğünün belirlenmesi için HOS-test uygulanmıştır. HOS-test, hipoozmotik sıvının 300µl'sinin 30µl sperma numunesiyle karıştırılarak 37°C'ta 1 saat bekletilmesiyle yapılmıştır. Bu karışımdan yapılan frotide faz kontrast mikroskopun 400x büyütmesinde toplam 400 spermatozoa sayılmış, bunlardan kıvrık ve şişmiş kuyruğa sahip olanlar % olarak ifade edilmiştir.

İstatiksel analiz

İstatiksel analizde 5 farklı uygulamadan elde edilen verilerin ortalamaları kullanılmıştır. Grupların karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Anlamlılık düzeyi olarak p=0.05 alınmıştır.

BULGULAR

Karışım natif spermanın ortalama spermatolojik değerleri: ortalama ejakülat miktarı 2.6±0.42 ml, motilite %79±4.18, ölü spermatozoa oranı %9.6±2.07, spermatozoa yoğunluğu 3.62±0.3 (x10⁹/ml), anormal spermatozoa oranı %11.8 ±1.92, akrozoma bağlı anormal oranı %3±0.79 ve hipoosmotik şişme test (HOST) oranı %70.6±2.70 olarak belirlenmiştir.

Saanen teke spermasının çözüm sonrası sulandırıcı grupları arasında ortalama motilite, anormal spermatozoa ve HOS-test oranları bakımından istatiksel bir fark saptanmış (P<0.05), ortalama ölü spermatozoa oranı bakımından gruplar arasında istatiksel bir fark saptanmamıştır (P>0.05) (Tablo 1).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Keçilerde dondurulmuş spermayla yapılan tohumlamalardan elde edilen fertilitte oranı büyükbaş hayvanlardaki tohumlamalardan daha düşüktür. Bunun nedeni kullanılan sulandırıcıların, sperma dondurma ve tohumlama tekniklerinin yeterince geliştirilmemiş olmasıdır. Teke sperması için kullanılan

Tablo 1. Saanen teke spermasının çözüm sonrası gruplara ait spermatolojik özellikleri

Sulandırıcı	n	Motilite (%)	Ölü (%)	Anormal (%)	Akrozoma bağlı anormal (%)	HOST test (%)
Tris	5	20.00±3.5	59.40±5.5	62.40±5.7	42.80±2.7	27.20±2.3
Andromed	5	34.00±4.1	51.80±6.0	45.40±3.7	24.80±2.8	36.00±3.5
P		*	-	*	*	*

∴ Gruplar arası farklılık önemli değildir (P>0.05)

* Gruplar arası farklılık önemlidir (P<0.05)

sperma yıkama, sulandırma, dondurma tekniklerinin optimum motilite ve fertilitiyi sağlayacak niteliğe kavuşturulması için bu yönde araştırmalar yapılmaktadır (6).

Çözüm sonrası motilite oranı Tris sulandırıcısında %20, Andromed sulandırıcısında %34 olarak tespit edilmiş ve sulandırıcı grupları arasındaki farklılık önemli bulunmuştur (P<0.05). Araştırmadan elde edilen çözüm sonrası motilite oranları; Gacitua ve Arav(12)'in Saanen teke spermasını Andromed sulandırıcısıyla sulandırarak dondurdukları çalışmadan elde ettikleri %61.2' lik motilite oranından düşük, Janet ve ark., (15) teke spermasını Tris ve Andromed sulandırıcıyla dondurdukları çalışmadan elde ettikleri sırasıyla %14 ve %25'lik progresiv motilite oranlarından yüksek bulunmuştur.

Çetin (6) Saanen teke spermasını Tris-sitrik asit, Tris-sitrik asit- fruktoz ve Tris-sitrik asit- laktöz sulandırıcısıyla dondurmuş, çözüm sonrası ortalama motilite oranlarını sırasıyla %4, %44, %41 olarak belirlemiştir. Tris-sitrik asit sulandırıcısı hariç diğer iki sulandırıcı grubunun motilite oranı, bu çalışmada elde edilen motilite oranlarından yüksektir.

Azeredo ve ark., (2)'nin Saanen tekesi spermasını seminal plazmasından ayırmaksızın ve ayırarak Tris-sitrik asit- glukoz-yumurta sarısı (%2.6)-gliserol (%5.3) solüsyonuyla sulandırarak dondurdukları çalışmadan elde ettikleri %18 ve %28 'lük ortalama motilite oranı ile karşılaştırıldığında; seminal plazma ayırmaksızın dondurulan spermanın motilite

yüzdesi bu çalışmadan elde edilen yüzdenin altında kalırken, seminal plazmasının ayrılması halinde ise bu çalışmadaki Tris sulandırıcının motilite yüzdesinden yüksek, Andromed sulandırıcısından ise düşüktür.

Daşkın ve Tekin'in (8) Ankara Tekesi spermasını seminal plazmasından ayırmaksızın Tris-sitrik asit-fruktoz-yumurta sarısı (%20)-gliserol (%7) solüsyonuyla sulandırarak dondurdukları çalışmadan elde ettikleri %47.4' lük motilite oranı ile karşılaştırıldığında; motil spermatozoa oranları bu çalışmadaki sulandırıcı gruplarından yüksektir.

Daşkın'ın (7) Ankara teke spermasını seminal plazmayı ayırmaksızın çözüm sonrası %40.1 olarak belirlediği motilite oranından, bu çalışmadaki tris ve andromed sulandırıcılarıyla elde edilen ortalama motilite yüzdesinden yüksektir.

Çözüm sonrası motil spermatozoa oranlarında gözlenen farklılıklar seminal plazmanın ayrılıp ayrılmamasına, dondurma işleminde kullanılan sulandırıcılar ile, sulandırıcıların içerdiği komponentlerin miktar ve oranlarının, özellikle sperma sulandırıcısının içerdiği yumurta sarısı oranlarının farklılığından kaynaklanmış olabileceği gibi, ayrıca spermanın sulandırılmasında ve dondurulmasında kullanılan tekniklerdeki farklılıklara, çözüm süresi ve sıcaklığındaki değişimlere, analizi yapan kişi veya cihaza bağlı olarak meydana gelmiş olabilir. Ayrıca tür, ırksal, mevsimsel ve bireysel farklılıklar da motilite oranlarında farklılığa neden olmuş olabilir.

Çözüm sonrası ölü spermatozoa oranı, Tris sulandırıcısında %59, Andromed sulandı-

ricisinde %51 olarak tespit edilmiş ve sulandırıcı grupları arasındaki farklılık önemli bulunmamıştır ($P>0.05$). Araştırmadan elde edilen çözündürme sonrası ölü spermatozoa oranları; Peterson ve ark., (18) 'nın Saanen ırkı tekelerde tris-sitrik asit-glikoz-yumurta sarısı-gliserol sulandırıcısını seminal plazmayı ayırmadan ve seminal plazmayı ayırdıktan sonra dondurduklarında çözüm sonrası ölü spermatozoa (%45, %35) Janet ve ark., (15) teke spermasını Tris ve Andromed sulandırıcıyla dondurdukları çalışmadan elde ettikleri sırasıyla ölü spermatozoa oranlarından yüksek (%30, %46) belirlenmiştir. Cabrera ve ark., (4), Kanarya ırkı tekelerde yaptıkları çalışmada ise çözüm sonrası ölü spermatozoa oranı yıkanmış spermada %69.6; yıkanmamış spermada ise %72 olarak tespit etmişleridir. Çalışmada çözüm sonrası elde edilen ölü spermatozoa oranları bu değerlerin altında kalmaktadır.

Çalışmada çözüm sonrası gruplarda elde edilen ölü spermatozoa oranlarıyla diğer araştırmacıların elde ettiği çözüm sonrası ölü spermatozoa oranları arasındaki farklılıklar sperma sulandırıcısının içeriğinden, özellikle sperma sulandırıcısının içerdiği yumurta sarısı oranlarının farklılığından kaynaklanmış olabileceği gibi seminal plazmanın ayrılıp ayrılmasından, sulandırma oranından, dondurma tekniğindeki farklılıklardan ve çözüm sıcaklığı ile süresinden kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca spermanın sulandırılmasında ve dondurulmasında kullanılan tekniklerdeki farklılıklara, çözüm süresi ve sıcaklığındaki değişimlere, teke ırklarının farklılığından, analizi yapan kişi veya cihaza bağlı olarak meydana gelmiş olabilir. Ayrıca irksal, mevsimsel ve bireysel farklılıklar da ölü spermatozoa oranlarındaki farklılığa neden olmuş olabilir.

Çözüm sonrası anormal spermatozoa ve akrozoma bağlı anormal spermatozoa oranları Tris sulandırıcısında %62, %42, Andromed

sulandırıcısında %42, %24 olarak tespit edilmiş ve sulandırıcı grupları arasındaki farklılık önemli bulunmuştur ($P<0.05$). Deka ve Rao (9) teke spermasını sodyum sitrat-fruktoz- yumurta sarısı-gliserol ve tris-sitrik asit-fruktoz-yumurta sarısı-gliserol sulandırıcıları ile dondurmuşlar ortalama anormal akrozom oranını sırasıyla, %18.60 ve %12.37 olarak tespit etmişlerdir. Tespit ettikleri değerler bu çalışmadaki grupların ortalama anormal akrozom oranından düşük bulunmuştur. Dorado ve ark., (10)'nın, Florida teke spermasını seminal plazmasını ayırarak Tris ve Yağsız süt tozu ile sulandırıp dondurdukları çalışmadan elde ettikleri %51.19 ve %45.77 ortalama anormal akrozom oranları, Tris sulandırıcısından düşük, Andromed sulandırıcısından yüksektir. Cabrera ve ark., (4)'nin Kanarya tekelerinde yaptığı çalışmada yıkanmış spermanın %12 yumurta sarısı içeren Tris sulandırıcısıyla çözüm sonrası elde ettiği %62'lik anormal akrozom oranı, bu çalışmadaki tris sulandırıcısıyla tespit edilen anormal akrozom oranıyla aynı, Andromed sulandırıcısından yüksektir.

Bu araştırmada elde edilen anormal akrozom oranıyla diğer çalışmalarda elde edilen akrozom oranları arasındaki farklılıklar tekelerin genotipik farklılıklarından, sperma sulandırıcısının içeriğinden, seminal plazmanın ayrılıp ayrılmamasından, dondurma ve çözüm sonrası prosedürleriyle değerlendirmede kullanılan teknikler arasındaki farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir.

Çözüm sonrası HOST test yanıt vermiş spermatozoa oranları, Tris sulandırıcısında %27 Andromed sulandırıcısında %36 olarak tespit edilmiş ve sulandırıcı grupları arasındaki farklılık önemli bulunmuştur ($P<0.05$).

Bucak (3), Tris-sitrik asit- glukoz- yumurta sarısı (%9) – gliserol (%6) sulandırıcısıyla Ankara teke spermasını çözüm sonrası ortalama HOST test oranını %16.2 olarak belirle-

miştir. Bu değer çalışmadaki sulandırıcı gruplarıyla elde edilen HOST test oranlarından düşük, Arı'nın (1), Ankara teke spermasını Tris-sitrik asit-glukoz- yumurta sarısı (%20)-gliserol (%7) sulandırıcısıyla dondurup çözüm sonrası elde ettiği HOST test oranına (%30) yakındır.

Sonuç olarak, teke spermasının dondurulmasında Andromed sulandırıcısının Tris sulandırıcısına kıyasla çözüm sonrası spermatojik parametreler üzerinde daha olumlu etki yaptığı saptanmıştır. Andromed sulandırıcısının teke spermasının dondurulmasında alternatif bir sulandırıcı olarak kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Arı UÇ (2006) *Yıkanmış Ankara teke spermasının boğa ve koç seminal plazması eklenmiş sulandırıcıyla dondurulması*. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
2. Azeredo GA, Esper CR, Resende KT (2001) *Evaluation of plasma integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma*. Small Rum. Res., 41, 257-263.
3. Bucak MN (2007) *Ankara tekesi spermasının dondurulmasında bazı kriyoprotektanların Etkisi*. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
4. Cabrera F, Gonzalez F, Batista M, Calero P, Medrano A, Gracia A (2005) *The effect of removal of seminal plasma, egg yolk level and season on sperm freezability of Canary buck (Capra hircus)*. Reprod. Dom. Anim., 40, 191-195.
5. Corteel JM (1977) *Production, storage and artificial insemination of goat semen*. In: Management of Reproduction in sheep and Goats Symposium, Madison, July 24-25, pp. 41-57.
6. Çetin A (2006) *Teke spermasının fruktoz ve laktöz şeker içeren tris tamponlu sulandırıcıda seyreltilmesi ve dondurulmasının spermatozoa kalite özelliklerine etkisi*. Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
7. Daşkın A (1991) *Teke spermasının dondurulması ve değişik yöntemlerle östrusları sinkronize edilen Ankara Keçilerinin tohumlamalarından elde edilen dölvürimi*. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
8. Daşkın A, Tekin N (1996) *The effect of egg-yolk on the quality of frozen Angora Buck semen*. Tr. J. of Vet and Anim Sci., 20, 395-398.
9. Deka BC, Rao AR (1985) *Effect of extenders and thawing methods on post-thawing preservation of goat semen*. Indian Vet. J., 64, 591-594.
10. Dorado J, Rodriguez I, Hidalgo H (2007) *Cryopreservation of goat spermatozoa: comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination*. Theriogenology, 68,168-177.
11. Evans G, Maxwell WMC (1987) *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. Sidney: Butterworths, pp. 8-21, 107-141.
12. Gacitua H, Arav A (2005) *Successful pregnancies with directional freezing of large volume buck semen*. Theriogenology, 63, 931-938.
13. Hansen GD, Delhomme G, Camus A, Bousseau S, Brillard JP, Guerin B (1996) *In vitro and in vivo fertility results of bovine frozen semen with ready to use extender free of egg yolk*. I.M.V-10, rue Clemenceau-61300 L'Aigle, France.
14. Iritani A, Nishikawa Y, Rukuhara R (1961) *Studies on the egg-yolk coagulating factor in goat sperm: I. Localization of coagulating factors and decline of pH following coagulating*. In: Proc. Silver Jubilee Lab. Anim. Husbandry, Kyoto University, pp. 89-96.
15. Janet F, Fuschini E, Keo S, Thun R (2005) *Comparison of AndroMed and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of buck semen*. Reprod. Dom. Anim., 40, 356.
16. Kaymakçı M, Eliçin A, Tuncel E, Pekel E, Karaca O, Işın F, Taşkın T, Aşkın Y, Emsen H, Özdemir M, Selçuk E, Sönmez R (2000) *Türkiye'de küçükbaş hayvan yetiştiriciliği*. V. Ziraat Mühendisleri Odası Teknik Kongresi, 17-21 Ocak 2000, Ankara.
17. Kaymakçı M, Taşkın T (2001) *Süt tipi keçi yetiştiriciliği ve Kıl keçilerinde verimliliği artırma yolları*. Çivril Tarımı ve Sorunları Sempozyumu, 13-14 Eylül 2001, Çivril- Denizli.
18. Peterson K, Kappen MAPM, Ursem PJF, Notling JO, Colenbrander B, Gadella BM (2007) *Microscopic and flow cytometric semen assessment of Dutch AI-bucks: Effect of semen processing procedures and their correlation to fertility*. Theriogenology, 67, 863-871.
19. Roy A (1957) *Egg-yolk –coagulating enzyme in the semen and cowper's gland of the goat*. Nature, 179, 318-319.
20. Ritar AJ, Ball PD, O'may PJ (1990) *Examination of methods for the deep freezing of goat semen*. Reprod. Fertil. Dev., 2, 27-34.
21. Tekin N, Muyan M (1985) *Keçilerde başlıca dölvürme özellikleri*. Doğa Türk Vet Hay Derg., 9, 208-218.