

Sıvı Azotta Dondurulan Koç Spermasının Spermatolojik Özellikleri ve Değişik Yöntemlerle Tohumlamada Kullanılması Üzerine Araştırmalar*

Hazım GÖKÇEN, M. Kemal SOYLU, İbrahim DOĞAN
Uludağ Üniversitesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Bursa - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 18.03.1999

Özet : Çalışmanın birinci aşamasında sperma örnekleri Tris+Sitrik asit+Fruktoz+Yumurta sarısı ve Sodyum sitrat+Yumurta sarısı sulandırıcılarıyla sulandırılarak sıvı azot buharında donduruldu. İkinci aşamada 120 Merinos koyuna FGA içeren süngerler 14 gün uygulandı ve Süngerlerin çıkarıldığı gün 500 IU PMSG verilerek östrusları senkronize edildi. Koyunlar gruplara ve alt gruplara ayrıldı. Alt grupların yarısına kızgınlığın başlangıcında Gn-RH enjekte edildi. Tohumlamalar taze ve dondurulmuş sperma ile yapıldı. Kızgınlığın başında-sonunda ve sonunda taze sperma ile tohumlanan koyunlardan en yüksek gebelik elde edildi. Gn-RH'un önemli etkisi saptanmadı.

Anahtar Sözcükler: Koyun, senkronizasyon, taze ve donmuş sperma, sun'i tohumlama

Investigations on the Spermatological Characteristics of Ram Semen Frozen in Liquid Nitrogen Vapour and Used for Insemination with Different Methods

Abstract : In the first step, semen samples were diluted with Tris+Citric acid+Fructose+Egg yolk and Sodium citrate+Egg yolk diluents and were frozen in liquid nitrogen vapour. In the second step, 120 Merino ewes were synchronised with sponges, which contained flourogestone acetate, for 14 days. PMSG was injected into the ewes on the withdrawal day. Ewes were divided into groups and subgroups. Gn-RH was injected into half of the subgroup ewes at the beginning of their oestrus. Ewes were inseminated with fresh and frozen semen. Conception rates of ewes inseminated with fresh semen both at the beginning and at the end of the oestrus, and at the end of the oestrus were found to be highest. Gn-RH did not have a significant effect on the results.

Key Words: Ewe, synchronisation, fresh-, frozen semen, artificial insemination.

Giriş

Koç spermasının dondurulma çalışmaları ilk kez Emmens ve Blackshaw (1) tarafından kuru buz-etil alkol banyosunda -79°C'ta dondurularak başlatılmıştır. Daha sonra, dondurma işleminin koç spermasına etkileri incelenmiş ve fertilizasyonda azalma, motilite ve metabolik aktivite kaybı, akrozom bozukluğu, akrozomal enzimler ile membran lipidlerinde azalma saptanmıştır (2-6). Koç spermasının kalitesi sulandırıcı tipinden, yapısından, kriyoprotektif ajanın yoğunluğundan etkilenebilmektedir (7). Çözme hızı da motilite ve akrozom üzerine etkilidir(8).

Koyunlarda en çok servikal tohumlama kullanılmakta, ancak dondurulmuş sperma ile yapılan tohumlamalarda fertilite düşmektedir. Bununla ilgili olarak Gutierrez ve ark. (9), spontan veya senkronize kızgınlıkta koyunlarda

donmuş sperma ile yaptıkları tohumlamalardan %22.2 ve %7.1 doğum oranı elde ettiklerini bildirmektedirler. PGF_{2α} veya Progesteron+PMSG ile senkronize edilip donmuş sperma ile intrauterin yolla tohumlanan koyunlardan yüksek gebelik oranı elde eden araştırmacılar da bulunmaktadır (10-14). Koç sperması, intrauterin olarak kullanıldığında, yeterli döl verimi sağlayacak şekilde dondurulabilmesi halinde, sun'i tohumlama çalışmaları pratik ve ekonomik olabilecektir. Nitekim Azzarini ve Valledor (15), servikal yolla tohumladıkları koyunlardan % 8.0 ve 5.6, intrauterin tohumlardan ise ortalama %52.9 döl verimi elde ettiklerini bildirmektedirler. Servikal tohumlamalardan %83.7, laparoskopi ile yapılan tohumlamalardan ise %19.1 oranında gebelik elde ettiklerini bildiren araştırmacılar da bulunmaktadır (16).

Progesteronların ve PGF_{2α}'nın senkronizasyon ve dövl verimi üzerine etkilerini incelemek ve karşılaştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada, 12 gün süre ile ve 12 gün ara ile 20 mg PGF_{2α} uygulanan koyunlarda kızgınlık oranları %92 ve %95, gebelik oranları da %64 ve %65 olarak saptanmıştır (17). Gökçen ve ark. ise (18), PGF2a ya da Crolone içeren vaginal sünger+PMSG uygulamalarından sırasıyla %84.3 ve %90.0 kızgınlık, %81.4 ve %76.4 gebelik elde etmişlerdir.

Kızgınlıkları senkronize edilen koyunlarda Gn RH'nun tek enjeksiyonu yerine uzun süreli uygulamaların etkisini araştıran Hamra ve ark. (19), 14 gün Cronolone içeren sünger uyguladıkları iki grup koyundan birinci gruptakilere 750 IU PMSG, ikinci gruptakilere 72. saate kadar bir saat ara ile 0.25 mg GnRH enjekte etmişler ve PMSG verilenlerin tümünde, GnRH verilenlerin ise yarısında kızgınlık, ovulasyon ve normal korpus luteum saptamışlardır. Aynı çalışma başka koyunlarda yinelenmiş, kızgınlık ve gebelik oranları PMSG verilenlerde %100 ve %56, GnRH verilenlerde %75 ve %44 olmuştur. GnRH uygulamalarından farklı sonuçların alınabileceğini bildiren bir çalışmada, koyunlara 14 gün süreyle 60 mg Medroksiasetat progesteron (MAP) içeren vaginal sünger uygulanmış, süngerler alındıktan sonra 48 saat içinde her altı saatte bir 50 µg GnRH enjekte edilmiş ve %77 kızgınlık saptanmış ancak hiç gebelik sağlanamamıştır (20). Erokhin ve Deryazhentsev ise (21), GnRH uyguladıkları üç grup koyundan sırasıyla %56, %45 ve %33, kontrol grubundan ise %48 doğum oranı elde ettiklerini bildirmektedirler. Tohumlamalardan 6 saat önce ve sonra GnRH verilen koyunlardan sırasıyla %80 ve %70 gebelik elde edilen çalışmaların yanında (22), PMSG enjeksiyonuyla %60.0-87.5 arasında değişen dövl verimi elde edilen çalışmalar da bulunmaktadır (23). Çalışmada dondurulan koç spermasının çözüm sonrası kimi spermatolojik özelliklerinin incelenmesi ve farklı yöntemlerle tohumlamalarda kullanılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

İki aşamada gerçekleştirilen çalışmada, Bandırma Koyunculuk Araştırma Enstitüsü'nde bulunan Merinos ırkı 120 koyun ve 5 koç kullanıldı. Koyunlar tesadüfi örnekleme ile bir kez doğum yapanlar arasından seçildi ve tüm materyal aynı bakım ve besleme koşullarında tutuldu.

Sperma koçlardan aşım mevsiminde sun'i vajen yardımıyla alındı ve kimi spermatolojik muayeneler

açısından değerlendirildi. Spermatozoonların motilitesi bir damla serum fizyolojik kullanılarak üç ayrı mikroskop alanında bir yönde hızlı hareketli spermatozoonların oranı olarak x40 büyütme ile, spermatozoon yoğunluğu da hemositometrik yöntemle hesaplandı. Ölü/canlı, anormal ve akrozom defektli spermatozoa için sırasıyla eosin-nigrosin, çini mürekkebi ve Giemsa boyaları kullanıldı.

Araştırma iki aşamada gerçekleştirildi. Birinci aşamada her bir ejakülat eşit hacimde ikiye bölünerek iki farklı sulandırıcı ile 1:2 oranında sulandırılarak donduruldu. Sulandırıcı olarak bileşimleri aşağıda verilen sulandırıcılar kullanıldı.

I. Sulandırıcı		II. Sulandırıcı	
Tris	0.2422 g	Sodyum sitrat dihidrat	0.29 g
Sitrik asit	0.1342 g	Yumurta sarısı	2 ml
Fruktoz	0.1000 g	Bidistile su	8 ml
Yumurta sarısı	2 ml		
Bidistile su	8 ml		

Sulandırma işlemi +35°C'de gliserol içermeyen ve +5°C'de gliserol içeren sulandırıcıların spermaya eklenmesi ile gerçekleştirildi. Payetlere (0.5 ml) çekilen sulandırılmış sperma equilibration (ekilibrasyon; alışım) için bir saat +5°C'de bekletildiler. Bu sürenin sonunda payetler -120°C'de sıvı azot buharında 7 dk tutularak donduruldular ve sıvı azot içerisinde depolandılar.

Dondurma işleminin her aşamasında (ilk sulandırma, +5°C'de, gliserolizasyon, equilibration ve çözüm sonu) motiliteler incelendi. Bu işlemi takiben dondurulan sperma örnekleri +34°C'de 15 sn de çözüldüler. Tohumlamaların gerçekleştirilmesi amacıyla çözüm sonrası en yüksek motilite değerlerini gösteren koçlar ve sulandırıcı belirlendi. Diğer koçlar ve sulandırıcı çalışmada kullanılmadı.

Çalışmanın ikinci aşamasında 120 koyun progesteron içeren süngerlerle senkronize edildi. Bu amaçla koyunlara 14 gün süreyle cronolone içeren vaginal süngerler uygulandı. Süngerlerin alındığı gün koyunlara 500 IU PMSG enjekte edildi. Bu uygulamaların sonunda koyunlar iki ana gruba, bu gruplar da üçer alt gruba ayrıldılar. Koyunlarda östrus aramaları sünger çıkarıldıktan 24 saat sonra arama koçları kullanılarak sabah (06.00) ve akşam (18.00) saatlerinde olmak üzere iki kez gerçekleştirildi. Östrusun belirlendiği ana östrusun başlangıcı ve 24 saat sonrasına ise östrusun sonu olarak karar verildi.

Birinci grubun alt gruplarından birincisi östrusun başında, ikincisi sonunda, üçüncüsü de hem başında hem de sonunda olmak üzere donmuş spermayla; ikinci grubun alt gruplarındaki koyunlar da yine östrusların başında, başında-sonunda ve sonunda olmak üzere taze spermayla servikal yolla tohumlandılar. Çözüm sonrası en yüksek motilite oranı belirlenen iki adet koçun sperması ve sulandırıcı kullanıldı. Taze sperma 1:2 oranında sulandırıldı ve bir tohumlama dozunda 0.2 ml olacak şekilde tohumlamalarda kullanıldı. Koçların donmuş-çözünmüş ve taze sperması her grubun tohumlamalarında eşit sayıda kullanıldı.

Her alt gruptaki koyunların yarısına östruslarının başında 0.004 mg GnRH enjeksiyonu yapıldı.

Gebelik oranları tohumlamayı izleyin 35 gün içerisinde tekrar östrus göstermeyenlerin oranına göre saptandı.

Bulgular

Araştırmanın birinci kısmını içeren çözüm sonrası en yüksek motilite oranı, iki adet koçta ve II. sulandırıcıda (Sodyum sitrat+Yumurta sarısı) saptandı. Çalışmada kullanılan iki koçun on ejakülatına ait ortalama değerler Tablo 1'de sunulmuştur. Diğer koçlar ve I. sulandırıcı (Tris) çalışmada kullanılmadı.

Araştırmanın ikinci kısmını içeren tohumlamalar spermatolojik değerlerine göre seçilen koçlar ve II. sulandırıcı ile gerçekleştirildi. Dondurulmuş sperma ile östruslarının başında, başında-sonunda ve sonunda GnRH enjekte edilen ve edilmeyen koyunlardan elde edilen gebelik oranları Tablo 2'de yer almaktadır.

Tartışma ve Sonuç

Kullanılan ejakülatın alındıktan sonra yapılan spermatolojik muayenelerinde sadece ölü spermatozoit oranı her iki koçta da normal değerlerin üzerinde bulunmuştur. Bunun, spermadan veya uygulanan tekniklerdeki olası bir hatadan kaynaklandığı sanılmaktadır. Sulandırıcı olarak Sodyum sitrat+Yumurta sarısı sulandırıcısı kullanıldı. Adı geçen sulandırıcıyla birlikte değişik sulandırıcılarla ve katkı maddeleriyle koç spermasının canlı kalma süresi üzerine yapılan bir çalışmada, sulandırmadan sonra motilitenin %70.0 olarak saptandığı bildirilmektedir (24). Bu sonuç, çalışmada elde edilen değerle uyum göstermektedir. Dondurma işleminin koç spermatozoitleri üzerine etkilerinin fertilizasyonda azalma, motilite kaybı ve akrozom bozukluğu şeklinde görüldüğü bildirilmektedir (2,3,5,6). Öte yandan, spermatolojik özelliklerde dondurulduktan sonra önemli ölçüde kayıp oluştuğu, özellikle akrozom membranının bozulduğu (4), saptanan bu bozukluğun da dondurma sürecindeki gliserolizasyondan sonra artış gösterdiği bildirilmektedir (25). Sunulan çalışmada ise, koç ejakülatının dondurulması sürecinde, özellikle dondurma işleminin ilk evresinden itibaren ölü ve anormal spermatozoit oranının yükseldiği gözlenmiştir. Nitekim 514/2 nolu koçta ölü spermatozoit oranı I. sulandırmadan sonra %49.0 olmasına karşın, çözümden sonra %70.2, anormal spermatozoit oranı da aynı evrelerde %19.0 olmasına karşın çözünmeden sonra %27.0 olarak saptanmıştır. 584/0 nolu koçta ise bu oranlar %45.0 ve %66.0, anormal spermatozoit oranı ise %18.0 ve %21.0 olmuştur. Görüldüğü üzere, her iki spermatolojik özellik

Tablo 1. Tohumlamada kullanılan koçların ejakülatlarının dondurma aşamalarındaki spermatolojik özelliklerine ait değerler (n=10).

Koç No	Spermatolojik özellik	Alındıktan sonra (%)	I. Sulandırmadan sonra (%)	+5°C'ta (%)	Gliserolizasyondan sonra (%)	Ekilibrazyondan sonra (%)	Çözüldükten sonra (%)
514/2	Motilite	80.0	70.0	70.0	60.0	60.0	50.0
	Ölü Spermatozoit	26.1	49.0	49.0	51.0	57.0	70.2
	Anormal Spermatozoit	5.4	19.0	21.0	22.0	25.0	27.0
	Akrozom defektli Spermatozoit	0.0	0.0	0.0	3.0	5.1	-
584/0	Motilite	90.0	90.0	80.0	70.0	70.0	50.0
	Ölü Spermatozoit	42.0	45.0	51.0	56.0	56.0	66.0
	Anormal Spermatozoit	14.0	18.0	19.0	19.0	21.0	21.0
	Akrozom Defektli Spermatozoit	0.0	0.0	0.0	2.1	4.2	-

Tohumlama zamanı	Tohumlama şekli	Tohumlanan koyun sayısı (n)	Gebe kalan koyun sayısı (n)	Gebelik oranı (%)
Kızgınlığın başında	Taze sperma ile	9*	5	55
	Donmuş sperma ile	14	6	40
	Taze sperma ile	9*	0	0
	Donmuş sperma ile	14	2	14
Kızgınlığın başında ve sonunda	Taze sperma ile	9*	7	77
	Donmuş sperma ile	9	7	77
	Taze sperma ile	9*	1	11
	Donmuş sperma ile	9	0	0
Kızgınlığın sonunda	Taze sperma ile	8*	6	75
	Donmuş sperma ile	8	8	100
	Taze sperma ile	9*	0	0
	Donmuş sperma ile	12	0	0

Tablo 2. Tohumlanan koyunlardan elde edilen gebelik sonuçları.

*GnRH uygulanan gruplar.

te başlangıç değeri olarak yüksektir. Oysa motilite değerleri bakımından her iki koçun ejakülatında dondurma işleminin I. sulandırma evresinden çözünme evresine kadar geçen süreçte önemli bir düşüş görülmektedir. Nitekim motilite oranı 514/2 nolu koçta I. sulandırmadan sonra %70.0, çözümden sonra %50.0, 584/0 nolu koçta ise %90.0 ve %50.0 olarak saptanmıştır. Literatür verilerine bakıldığında motilite oranları normal sayılabilir. Önemli olan, motilite oranlarıyla döl verimi arasında pozitif bir korelasyonun bulunmasıdır. Diğer bir deyişle, motilite yükseldikçe döl verimi oranının da yükselmesi beklenir. Ancak, koç spermasının dondurulması sırasında, özellikle akrozom morfolojisinde önemli hasar oluştuğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (2). Sunulan araştırmada, akrozom defektli spermatozoit oranları, her iki koçun ejakülatında da dondurulmuş payetlerin tümünün tohumlamalarda kullanılması zorunluluğundan dolayı, çözüm sonrasında saptanamamıştır. Bu nedenle, bu konuda kesin bir yargıya varmak güçleşmektedir. Her ne kadar akrozom defektli spermatozoit oranının dondurma işleminin gliserolizasyon evresinden sonra oluştuğunu bildirmekte ise de (4), sunulan araştırmada kullanılan koçların ejakülatında gliserolizasyondan sonra saptanan akrozom defektli spermatozoit oranı her iki koçta sırasıyla %3.0 ve %2.1 olarak bulunmuştur ki bu sonuçlar literatür verileriyle çelişmektedir.

Araştırmada kullanılan 120 koyun, FGA içeren vaginal süngerlerle senkronize edildiler. On dört gün süreyle uygulanan süngerler çıkarıldıkları anda 500 IU PMSG enjekte edildi ve 48 saat içerisinde %100 kızgınlık görüldü. Bu durum, literatür bulgularına uymaktadır (18,19). Nitekim yapılan bir çalışmada (18), FGA içeren vaginal sünger+500 IU PMSG uygulamalarından %90.0 kızgınlık elde edildiği bildirilmektedir. Öte yandan 14 gün süre ile Cronolone içeren sünger+PMSG uygulamalarından %100 kızgınlık elde edildiği de bildirilmektedir (19). FGA dışında Medroksiasetat progesteron (MAP) içeren sünger kullanıp ovulasyonu GnRH ile uyaran araştırmacılar, %77.0 kızgınlık saptamışlardır (20). Bu sonuç, gerek sunulan çalışmadaki gerekse literatürde bildirilen diğer çalışmalarda FGA+PMSG ile elde edilen sonuçlardan daha düşüktür. Bu durumda 40 mg FGA+PMSG enjekte edilen çalışmalarda kızgınlık oranı bakımından başarılı sonuçların alınabileceği söylenebilir.

Sunulan çalışmada elde edilen verilerden de anlaşılacağı üzere, kızgınlığın başında, başında-sonunda ve sonunda taze sperma ile GnRH uygulanarak ya da uygulanmayarak tohumlanan koyunlardan literatür bulgularıyla uyumlu sayılabilecek döl verimi sonuçları elde edilebilmiştir. Buna karşın, donmuş spermayla tohumlanan koyunlardan sadece kızgınlığın başında tohumlanan 14 koyundan %14 gibi düşük bir döl verimi

sağlanmıştır. Böylesine düşük döl verimi sonuçlarının özellikle dondurma işleminin başlangıcında ve sonunda saptanan ölü ve anormal spermatozoit oranlarına bağlı olabileceği düşünülmektedir. Kullanılan koçların ejakülatındaki akrozom defektli spermatozoit oranlarının, payetlerde dondurulan tüm sperma örneklerinin kullanılmasından dolayı saptanamamış olsa bile, özellikle çözüm sonrasında, diğer spermatolojik değerlere bakıldığında yüksek olacağı kuşkusuzdur. Sunulan çalışmada, tüm gruplarda taze sperma ile GnRH uygulanarak tohumlanan koyunlardan elde edilen en yüksek döl verimi kızgınlığın başında ve sonunda yapılan tohumlamalardan elde edilmiştir. Oysa GnRH uygulanmadan taze sperma ile tohumlanan koyunlarda ise en yüksek döl verimi kızgınlığın sonunda tohumlananlardan sağlanmıştır. Ancak, kızgınlığın hem

başında hem de sonunda GnRH uygulanmadan taze sperma ile tohumlanan koyunlardan elde edilen döl verimi ile kızgınlığın sonunda GnRH uygulanarak taze sperma ile tohumlanan koyunlardan elde edilen döl verimi arasında önemli bir fark olmadığı, gerek GnRH uygulanıp gerekse uygulanmayıp taze sperma ile tohumlanan koyunlardan en iyi döl verimi sonucunun kızgınlığın sonunda yapılan tohumlamalardan alındığı anlaşılmaktadır.

Sonuç olarak; kızgınlığın hem başında hem sonunda ve sonunda taze spermayla yapılan tohumlamalardan başarılı sonuçlar alındığı, GnRH uygulamasının senkronize edilen koyunlarda döl verimi üzerine önemli bir etkisinin bulunmadığı, koç spermasının düşük ısıda dondurulması alanında, başta teknik yetersizlikler olmak üzere kimi diğer sorunların var olduğu kanısına varılmıştır.

Kaynaklar

1. Emmens, C.W., Blackshaw, A.W., The Fertility of Frozen Ram and Bull Semen, Aust. Vet. J., 1955, 31, 76-79.
2. Aşti, R.N., Gökçen, H., Sıvı Azot Buharında Dondurmanın Koç Spermatozoalarının İnce Yapısı Üzerine Etkisi, Ankara Üniv.Vet.Fak.Derg., 1979,XXVII:3-4, 30-39.
3. Sevinç, A., Gökçen, H., Çetinkaya, K., Yorul, O., Çeşitli Sulandırıcılar ve Ekilibasyon Süreleri Kullanarak Sıvı Azotta Dondurulan Koç Spermasının Dölverimi Üzerinde Araştırmalar, 1978, TÜBİTAK Kesin Rapor, Proje No: VHAG-384.
4. Gökçen, H., Aşti, R.N., Sıvı Azotta Dondurma Yönteminin Çeşitli Evrelerinde Koç Spermatozoitlerindeki Akrozom Bozukluklarının Saptanması, Ankara Üniv.Vet.Fak.Derg., 1980, 27:3-4, 501-514.
5. Holt, W.V., Borris, G.T., Coulson, G., North, R.D., Direct Observation of Cold-Shock Effects on Ram Spermatozoa with the Use of a Programmable Cryomicroscope, J. Exp. Zool., 1980, 246: 3, 305-314.
6. Salamon, S., Fertility of Ram Spermatozoa Following Pellet Freezing on Dry Ice at -79°C and -140°C, Aust.J.Biol.Sci., 1971, 24, 183-185.
7. Polge, C., Observation on the Freezing of Ram Semen, 1968, 4th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Paris.
8. Fiser, P.S., Fairfull, R.M., Marcus, G.J., The Effect of Thawing Velocity on Survival and Acrosomal Integrity of Ram Spermatozoa Frozen at Optimal and Suboptimal Rates in Straws., Cryobiology,1986, 23:2, 141-149.
9. Gutierrez, T.P., Vallejo, O.E., Trojo, G.A., A Comparison of the Fertility of Frozen Semen From Different Rams, Anim. Breed. Abstr., 1991, 59:1059.
10. Tibary, A., Factors Affecting Semen Preservation and Estrus Synchronization in Moroccan Sheep, 1990, Abstr. of Thesis.
11. Nephew, K.P., Clay, J.C., Thayer, S.L., Baertsche, S.R., Parker, C.F., Pope, W.F., Intrauterine Insemination of Merino Ewes with Frozen Semen from Australian Merino Rams, Sheep Research Journal, 1990, 6:1, 5-7.
12. Ali, S.B.A., Tischner, M., Freezing Ram Semen in Aluminium Packets and Deep Cervical Insemination of Ewes with Modified Pipette, In 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, University College Dublin, Ireland, June 26-30, 1988, paper No. 219, 3pp.
13. Bustamante, G., Garcia, O., Sanchez, L.G., Evaluation of the Fertility of Frozen Thawed Ram Semen Deposited into the Uterus by means of Laparoscopy. Preliminary Results, Anim. Breed. Abstr., 1991, 59: 1047.
14. Magyar, K., Kombs, I., Veress, L., Laparoscopic Intrauterine Insemination of Sheep With Deep-Frozen Semen. Preliminary Report, Anim. Breed. Abstr., 1991, 59: 320.
15. Azzarini, M., Valledor, F., Intra-Uterine or Intra-Cervical Insemination of Ewes in Natural Oestrus with Frozen or Fresh Semen. Anim. Breed. Abstr., 1987, 57: 4961.
16. Correa, J.E., Bergmann, B., Gatica, R., Fertilization in Sheep Unilaterally Inseminated with Frozen Semen, Small Ruminant Research, 1994, 13:1, 99-101.
17. Inskeep, K., Lewis, P., Stille, N., Mulledy, R., Dinsmore, H., Synchronization of Oestrus as Management Tool in the Ewe Flock, Anim. Breed. Abstr., 1985, 53: 242.

18. Gökçen, H., Tümen, H., Doğan, İ., Koyunlarda Östrus Sinkronizasyonu ve Sun'î Tohumlama Saha Çalışmaları. I. Cronolone İçeren Vaginal Sünger ya da Prostaglandin F2a'nın Sinkronizasyon ve Dölverimine Etkisi. U.Ü. Vet. Fak. Derg., 1992, 3 (11), 110-119.
19. Hamra, A.H., Al-Jalil, Z.F., Al-Hiti, S.M., Alkass, J.E., Fertility in Ewe Lambs Pretreated with Progestagen Intravaginal Sponges and Injected with HCG or Gn-RH. Anim. Breed. Abstr., 1989, 57:280.
20. Alna, A.H., Jassim, M.M., Reproductive Performance of Awassi Ewes Treated with HMG, HCG, PMSG and GnRH. 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Dublin, Ireland, June 29-30, 1988, p:435-437.
21. Erokhin, A.S., Deryazhentsev, V.I., The Use of Surfagon in Inseminating Ewes. Anim. Breed. Abstr., 1991, 59:6840.
22. Soylu, M.K., Gökçen, H., Tümen, H., Deligözoğlu, F., Doğan, İ., Bilgin, B., Koyunlarda Farklı Zamanlarda Uygulanan Gonadotropin Salgılayıcı Hormonun (Gn-RH) Döl verimine Etkisi Üzerinde Bir Araştırma, U.Ü. Vet. Fak. Derg., 1993, 12 (1), 81-88.
23. Kobayashi, M., Fukui, Y., Tetsuka, M., Ono, H., Effects of Times of PMSG Injection and Ram Introduction on Estrus Incidence and Lambing Rate in Ewes Treated During the Non-Breeding Season, Japan, J.Anim. Reprod., 1986, 32 (1), 32-25.
24. Gökçen, H., Soylu, M.K., Tümen, H., Ilgaz, B., Farklı Sulandırıncılarla Sulandırılan Koç Ejakülatlarında Değişik Katkı Maddelerinin Spermatolojik Özellikler ve Canlı Kalma Süresi Üzerine Etkileri. U.Ü. Vet. Fak. Derg., 1989-1990, 8-9 (1-2-3), 155-161.
25. Gökçen, H., Aşti, R.N., Kozandağı, M., Sulandırıncıya Değişik Oranlarda Katılan Gliserolün Dondurma İşleminin Çeşitli Evrelerinde Koç Spermatozoonlarının Motilitesi ve Akrozom Morfolojisi Üzerine Etkisi, U.Ü. Vet. Fak. Derg., 1983, 2 (1), 59-64.