

HOLŞTAYN BOĞA SPERMALARININ +4⁰C'DE SAKLANMASINDA FARKLI SPERMA SULANDIRICILARININ MOTİLİTEYE ETKİSİ

(Different Semen Extenders Effect on Motility of Holstein Bull Semen Stored at +4⁰C)

Pürhan Barbaros TUNCER¹

Mesut ÇEVİK²

Hüseyin KİNET¹

1 Lalahan Hay. Mrk. Araş. Enstitüsü, Sun'î Toh. Lab. – Ankara / TÜRKİYE
2 OMU Vet. Fak. Dölerme ve Sun'î Tohumlama ABD – Samsun / TÜRKİYE

ÖZET

Bu araştırma Laiciphose W 488 ve AndroMed sulandırıcıları ile sulandırılıp +4⁰C' de saklanan boğa spermalarında günlük motilite değerlendirilmesi ve sulandırıcıların karşılaştırılması amacıyla yapılmıştır. Araştırmada 4 Holştayn boğadan alınan toplam 40 ejakülat kullanılmıştır. Ejekülatlar iki kısma ayrılarak Laiciphose W 488 ve AndroMed ile sulandırılmıştır. Sulandırılmış spermaların sıcaklığı 45 dakikada +4⁰C' ye düşürüldükten sonra buzdolabına nakledilmiştir. Spermatozoa motilite kontrolleri sulandırmadan 10 gün sonrasında kadar bakılmıştır. Sulandırma sonrası spermatozoa motilitesi Laiciphose W 488 için % 83.37±0.37 ve AndroMed için ise % 83.12±0.38 olmuştur. Spermatozoa motilitesi 3. gün AndroMed ile sulandırılan spermalarda tüm boğalarda % 50' nin üzerinde bulunurken, Laiciphos W 488 ile sulandırılan spermalarda iki boğa için % 50' nin altında tespit edilmiştir. Spermatozoa motilitesi 3. günden sonraki günler tedricen azalmış ve 10. günde ise her iki sulandırıcı için spermatozoa motilitesi sıfırlanmıştır. Sonuç olarak her iki sulandırıcıyla sulandırılıp +4⁰C' de saklanan boğa spermaları 3 gün süresince sun'î tohumlamada kullanılabilir. Motilitenin korunması açısından iki sulandırıcı arasında önemli bir fark tesbit edilememiştir.

Anahtar Kelimeler : AndroMed, Boğa Spermaları, Laiciphose 488, Motilite.

SUMMARY

This study was conducted to compare Laiciphose W 488 and AndroMed extenders for maintaining sperm motility at 4⁰C in bulls. In the study 40 ejaculates collected from 4 Holstein bulls were used. Ejaculates were divided into two groups and were diluted with Laiciphos W 488 and AndroMed. Diluted semen was cooled to +4⁰C in 45 minutes. After that they were transferred into the refrigerator. Sperm motility was estimated daily up to day 10 post dilution. Immediately after dilution sperm motility rates were 83.37±0.37 % and 83.12±0.38 % for Laiciphos W 488 and AndroMed extenders, respectively. Sperm motility for the samples diluted with AndroMed on day 3 was above 50 % in all bulls studied. However, motility rates in sperm samples diluted with Laiciphos W 488 were higher than 50% in 2 bulls only. Motility rates gradually decreased day by day after day 3 post-dilution and, finally, dropped zero on day 10 in the both extender groups. As a result, it was concluded that bull sperm diluted with both extenders which can be used for artificial insemination during 3 days at +4⁰C and no significant difference was determined between extenders on the preservation of sperm motility.

Key Words : AndroMed, Bull Semen, Laiciphose 488, Motility.

GİRİŞ

Evcil hayvanların ekonomik verimlerinin temelinde dölvrimleri bulunmaktadır. Dölvrimi erkek hayvanlarda dişilere göre daha çok önemli olmaktadır. Dişi bir hayvan üreme yeteneğini kaybettiğinde oluşacak olan ekonomik kayıp yılda sadece bir yavru olduğu halde, spermatozoa motilitesi düşük veya fertilitite yeteneğini yitirmiş bir damızlık erkek hayvanın doğal aşım yaptığı veya o hayvana ait sperma ile tohumlanan tüm hayvanların kısır kalabileceği bir gerçektir. Bundan dolayı boğalardan yeterli oranda dölvrimi elde edebilmek büyük ölçüde spermatozoonların

hareket yeteneğine yani spermadaki motil spermatozoonların oranına bağlı olmaktadır. 1940'lı yılların sonları ve 1950'li yılların başlangıcında sığır sun'î tohumlamasının gelişmesinde spermanın vücut ısısından +5⁰C 'ye soğutulmasında spermatozoonları buz kristallerine karşı korumak amacıyla yumurta sarısının koruyucu etkisinden uzun süre yararlanılmıştır ve halen bazı ülke (örneğin Yeni Zelanda) ve bölgelerde sulandırılarak +5⁰C'de saklanan spermalar sun'î tohumlamada kullanılmaktadır (15, 16) Iwanow, 1912 (4) yıllarında Locke's

sulandırıcısıyla boğa spermasını sulandırmış ve bu spermaları +2⁰C'de bekleterek sun'i tohumlamada kullanmak üzere uzak bölgelere nakletmiş ve yaptığı uygulamalarda olumlu sonuçlar almıştır. Kimi araştırmacılar (9, 11) spermatozoa motilitesi % 50' nin altına düşen spermaların sun'i tohumlamada kullanılmasını önermemektedirler. Philips (10), yaptığı çalışmada taze yumurta sarısı+sodyum fosfat ve potasyum fosfat içeren sperma sulandırıcısı ile boğaların spermasını 1:4 oranında sulandırmış ve bu sulandırıcıda bir kısım spermatozoonların 120-150 saat, bir kısmının da 300 saat canlılıklarını muhafaza ettiklerini bildirmiştir.

Franceschini ve ark. (3)' ları domuz spermasının buzdolabında saklanması spermatozoa motilitesi üzerine etkisini araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada 4 gün süreyle buzdolabında sakladıkları spermalarda 24. saatten sonra her geçen gün spermatozoa motilitesinin azaldığını bildirmişlerdir. Kumar ve ark. (8)' ları yaptıkları çalışmada spermayı buzdolabında 72 saat ve daha fazla süre saklamışlar ve sperma sulandırıcısı olarak kullandıkları süt içerisine % 3-6 gliserol ilave ettiklerinde spermatozoonların daha uzun süre canlı kaldığını tespit etmişlerdir. Kumar ve ark. (7)' ları yaptıkları bir diğer çalışmada Murrah ırkı mandalarda süt, tris veya % 2.9' luk sodyum sitrat gibi sulandırıcılara % 0, 5, 10, 20 oranlarında yumurta sarısı ilave ederek hazırladıkları sulandırıcılarla spermayı karıştırıp buzdolabında 24, 48 ve 72 saat bekleterek spermatozoa motilite kontrollerini yapmışlar ve % 5 yumurta sarısı ilave edilen örneklerin motilitelerinin, yumurta sarısı ilave edilmeyenlere göre daha yüksek olduğunu gözlemişlerdir. Vyas ve ark. (15)' larının çalışmalarında 5 boğadan aldıkları 166 ejakülatın ortalama spermatozoa motilitesini % 71.03 olarak saptamışlardır. Bu spermaları +4⁰C' de 24, 48, 72 ve 96 saat muhafaza ettikten sonra motilitelerini sırasıyla ortalama % 58.63, 50.47, 41.25 ve 30.15 olarak bildirmişlerdir.

Bazı araştırmacılar (9, 11, 16) boğa spermasının kısa süreli saklanması esnasında 2 veya 3 gün içerisinde kullanılmasının gerektiğini, daha fazla süre ile saklanan spermaların spermatozoa motilitesinin günden güne azaldığını ve buna bağlı olarak bu spermalarla yapılan tohumlamalardan elde edilen dölveriminin her geçen gün yaklaşık % 6 oranında düştüğünü bildirmektedir. Boğa sperması sulandırıldıktan sonra +15⁰ / +21⁰C arasındaki çevre ısısında bekletildiğinde sperma motilitesi hızlı bir şekilde azalır. Motilitenin azalmasıdaki nedenlerden biri mitokondriumlarda ATP kullanımının devam etmesi ve mitokondriyumların yaşlanması sonucu ATP kullanımının azalmasıdır. Bu nedenle sperma sulandırıldıktan sonra +5⁰C'de muhafaza edilirse yukarıda bahsedilen nedenden dolayı motilitenin azalması yavaşlar (6, 14). Dondurulan spermada metabolik aktivite geçici olarak durdurulduğundan enerji temini nispeten daha az önemlidir. Zira spermatozoonlar dondurulmadan önce çoğunlukla sadece birkaç saat için aktif kalırlar. Ancak sperma soğutularak kullanıldığında spermatozoon metabolizması birkaç gün takviyeye ihtiyaç duyduğundan enerji temini daha önemlidir (1).

Bu araştırma, Laiciphose W 488 ve AndroMed sulandırıcılarıyla ayrı ayrı sulandırılarak +4⁰C' de saklanan Holştayn boğa spermasındaki günlük spermatozoa motilitesinin saptanması amacıyla yapılmıştır.

MATERYAL METOT

Bu çalışmada materyal olarak Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsünde yetiştirilen 2-3 yaşlarında sağlıklı ve yetiştirme hastalıklarından ari olan 4 baş Holştayn (Siyah Alaca) boğa kullanılmıştır. Boğalardan, 2003 yılı Temmuz-Ağustos aylarında haftada iki kez olmak üzere 10' ar ejakülat sun'i vajen yöntemiyle sabah 9:00/10:00 saatleri arasında alınmıştır (17). Araştırmada kullanılan boğalar

gece-gündüz bireysel padoklarda barındırılmış, enstitü koşullarında hazırlanan özel damızlık rasyonla beslenmiştir.

Hayvanlardan alınan ejakülatların sulandırmaya uygun olanlarının yoğunlukları fotometrik yöntemle (Accucell Photometer, IMV, France) hesaplandı. Spermalar iki eşit kısma ayrılarak Laciphose W 488 (IMV, France) (LS) ve AndroMed (Minitub, Tiefenbach, Germany) (AS) sulandırıcılarıyla sulandırıldıktan sonra spermaların spermatozoa motilite tayinleri yapıldı. Soğutma kabine nakledilen sulandırılmış spermaların sıcaklığı 45 dakikada +4°C'ye düşürüldü ve sonra 5 ml'lik tüpler içerisine alınan numunelere alıştırma sonunda yeniden spermatozoa motilite tayini yapıldı.

+4°C'de bekletilen bu spermalarından her gün saat 16:00-17:00 arasında bir damla örnek alınarak lam üzerine konuldu. Üzeri lamelle kapatılarak bioküleri ısıtma (+38°C'de) tablalı mikroskop (Labophot, Nikon, Japan) üzerine yerleştirildikten sonra 1 dakika beklenilerek ısınması sağlandı. Üç değişik sahada muayene edilen spermatozoonların tek yönde ve hızlı hareket edenleri motil spermatozoa olarak kabul edildi ve ortalama değerler spermatozoa motilitesi (%) olarak kaydedildi (13).

Her boğadan elde edilen 10 ejakülat alındığı saatte, alıştırma sonrası, 1. günden motilitenin bütün spermalarda sıfırlandığı 10. güne kadar olmak üzere ortalama motilitesi ve 4 boğanın toplam 40 ejakülatının genel motilite oranlarının ortalama değerleri ve standart hataları hesaplanmıştır. İstatistik analizlerde "Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek Testi" kullanılmıştır (18).

BULGULAR

4 baş Holştayn boğanın her birinden 10' ar ejakülatın alındığı saatteki ortalama spermatozoa motilitesi ve 4 boğanın

spermasının alındığı saatten 3. güne kadar ki ortalama günlük spermatozoa motilitesi Tablo 1' de; 4. günden 9. güne kadar olan ortalama günlük spermatozoa motilitesi Tablo 2' de verilmiştir. 10. günde her iki sulandırıcıya ait spermatozoa motilite değerleri sıfırlandığı için tabloda verilmemiştir.

Bu boğaların her birisinden alınan spermaların alındığı saatteki ortalama spermatozoa motilitesi LS sulandırıcısı için % 84.0±0.66 ile 82.5±0.83 arasında değişirken 4 boğa için ortalama % 83.37±0.37 olarak bulunmuştur. AS sulandırıcısında ise bu oranlar % 84.0±0.66 ile % 82.5±0.83 arasında değişirken 4 boğa için ortalama oran % 83.12±0.38 tespit edilmiştir. Sulandırılmadan hemen sonra yapılan motilite kontrollerinde tespit edilen sonuçlara göre sulandırıcılar arasında istatiki bir fark tespit edilmemiştir (P>0.05). LS sulandırıcısı ile spermaları sulandırılan dört boğanın ortalama spermatozoa motilitesi alıştırma sonrası % 80.62±0.57, 1. günde % 72.37±0.59, 2. günde % 61.75±0.68, 3. günde % 50.75±0.86 olarak saptanmıştır. Oysa AS sulandırıcısı ile spermaları sulandırılan aynı dört boğanın ortalama spermatozoa motilitesi sırasıyla % 80.75±0.72, % 72.0±0.58, % 63.62±0.87, % 53.0±0.99 olarak saptanmıştır. Her iki sulandırıcıyla sulandırılan spermaların alıştırma sonrası, 1., 2. ve 3. gündeki motilitesi arasında istatikselsel olarak bir fark bulunmamıştır (P>0.05).

Spermaları AS ile sulandırılan tüm boğaların spermatozoa motilitesi 3. günde % 50' nin üzerinde bulunurken LS ile spermaları sulandırılan boğaların ikisinde % 50' nin üzerinde tespit edilirken diğerlerinde % 50' nin altında saptanmıştır.

Tablo 1: Laiciphose W 488 (LS) ve AndroMed (AS) sulandırıcılarıyla sulandırılan spermalarda sulandırma sonrası, 6. saat (alışım sonrası) ve ilk 3 günlük ortalama spermatozoa motilite değerleri.

Boğa	Spermatozoa Motilitesi (%)									
	X±Sx									
	0. Saat		6. Saat		Gün					
					1.		2.		3.	
	LS	AS	LS	AS	LS	AS	LS	AS	LS	AS
A	82.50±0.83	82.50±0.83	80.00±1.05	79.50±1.38	72.00±0.81	72.00±0.81	61.00±0.66	63.50±1.50	49.50±1.17	52.50±2.01
B	83.00±0.81	82.50±0.83	80.00±1.49	80.00±1.83	72.50±1.54	72.50±0.83	62.50±1.86	64.50±1.57	52.00±1.86	54.50±1.57
C	84.00±0.66	84.00±0.66	81.50±1.07	82.50±1.12	72.00±1.53	72.00±1.53	60.00±1.29	64.50±2.17	48.50±1.50	54.50±2.17
D	84.00±0.66	83.50±0.76	81.00±1.0	81.00±1.45	73.00±0.81	71.50±1.50	63.50±1.30	62.00±1.86	53.00±2.13	50.50±2.17
Genel (n=40)	83.37±0.37	83.12±0.38	80.62±0.57	80.75±0.72	72.37±0.59	72.0±0.58	61.75±0.68	63.62±0.87	50.75±0.86	53.00±0.99
P	-		-		-		-		-	

(-): P>0.05

Tablo 2: Laiciphose W 488 (LS) ve AndroMed (AS) sulandırıcılarıyla sulandırılan spermalarda 4. gün ile 9. gün arasında günlük değerlendirilen ortalama motilite değerleri.

Boğa	Spermatozoa Motilitesi (%)											
	X±Sx											
	Gün											
	4.		5.		6.		7.		8.		9.	
LS	AS	LS	AS	LS	AS	LS	AS	LS	AS	LS	AS	
A	39.00±1.00	42.50±2.01	29.00±1.00	32.50±2.01	19.00±1.00	22.00±2.00	9.50±0.50	12.50±1.71	4.50±0.50	6.00±1.00	0.00±0.00	1.50±0.76
B	41.50±1.83	44.50±1.57	31.50±1.83	34.50±1.57	21.00±1.80	24.00±1.63	11.50±1.50	14.00±1.63	5.50±0.89	7.00±0.81	1.00±0.66	2.00±0.81
C	38.00±1.33	44.50±2.17	28.00±1.33	34.50±2.17	18.00±1.33	24.00±2.21	9.00±0.66	14.50±1.89	4.00±0.66	7.00±1.11	0.00±0.00	2.50±0.83
D	43.00±2.13	40.50±2.17	33.00±2.13	30.00±2.11	23.00±2.13	20.00±2.11	13.50±1.83	11.00±1.63	6.50±1.07	5.00±1.05	2.00±0.81	1.00±0.66
Genel (n=40)	40.37±0.84	43.00±0.99	30.37±0.84	32.87±0.99	20.25±0.83	22.50±0.99	10.87±0.66	13.00±0.85	5.12±0.41	6.25±0.49	0.75±0.28	1.75±0.38
P	*		*		-		-		-		*	

* : P<0.05
(-) : P>0.05

LS ve AS ile sulandırılan spermalarda 4. günden 8. güne kadarki günlük spermatozoa motilite değerleri arasında yapılan istatistiksel analizde 4. ve 5. günlerde sulandırıcılar arası spermatozoa motilitesi önemli bulunmuştur ($P<0.05$).

Dokuzuncu günde LS ve AS için ortalama motilite $\% 0.75\pm0.28$ ve 1.75 ± 0.38 saptanmıştır. LS ile spermaları sulandırılan boğaların ikisinde spermatozoa motilitesi 9. günde sıfır bulunurken, AS ile spermaları sulandırılmış dört boğada ise aynı günde motil spermatozoonlar tespit edilmiştir ve bu değer istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($P<0.05$). 10. günde yapılan kontrolde ise dört boğanın spermalarında da hiçbir motil spermatozoon saptanmamıştır.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Kimi araştırmacıların (3, 7, 8, 14, 16) bildirdiklerine göre boğa, koç, domuz spermaları çeşitli sulandırıcılarla sulandırılıp buzdolabı ısısında saklandıklarında spermatozoa motilitesi her geçen gün azalmaktadır. Bu durum bu çalışma sonucu ile doğrulanmış ve boğa spermasının motilitesinin buzdolabında günden güne azaldığı görülmüştür.

Tardif ve ark. (12)'ları yaptıkları çalışmada, nativ spermada motiliteyi *Tyrodé'nin modifiye solüsyonunda* $\% 87$, *Cornell Üniversitesi sulandırıcısında* $\% 79$ ve *yumurta sarısı – gliserol – Tris sulandırıcısında* $\% 66$ tespit etmişlerdir. Soğutma ve $+5^{\circ}\text{C}$ 'de saklama süresince son iki sulandırıcıda motilitede küçük azalmalar saptamışlardır. Keza spermanın 3 gün bu ısıda saklanması süresince sperma hareket hızında küçük fakat istatistiki olarak önemli azalmalar tespit etmişlerdir. Bu bekleme süresince hiperaktif spermatozoon sayısında küçük yüzdelik oranlarda artışların olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise sulandırıcılar farklı olup ilk sulandırma sonrası motiliteler ilk sulandırıcıya

göre düşük, diğer sulandırıcılara göre yüksek bulunmuştur. Daha sonra yapılan motilite muayenelerinde canlılığın $\% 50$ civarında olduğu tespit edilmiştir. Bu iki çalışma arasındaki en büyük fark motilite tayin yönteminde olmaktadır. Tardif ve ark.'ları motilite tayininde Hamilton Thorne'un CASA (Computer Asisted Sperm Analysis) sistemini kullanmıştır.

Demirci ve ark. (2)'ları ise Laiciphos 488 ile sulandırarak buzdolabında sakladıkları boğa spermalarında motilite tayini yapmışlardır. 72. Saatten sonra spermalarda motilitenin $\% 50$ 'nin altına düştüğünü, bazı boğalarda 192. saatte motilitenin sıfırlandığını ve 240. saatlerde tüm spermalarda motilitenin $\% 0$ olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise hem Laiciphos W 488 ve hem de AndroMed ile sulandırılıp $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilen spermaların motilite oranları daha yüksek bulunmuştur. Bu fark boğanın genetik yapısına, spermayı sulandırma tekniğine, sulandırıcıya, muayeneyi yapan araştırmacıya, spermanın muayene metoduna bağlı olabilir. Benzer biçimde Kumar ve ark. (7)'ları aynı spermayı farklı sulandırıcılarla sulandırıp 72 saat sonra muayene ettiklerinde $\% 5$ yumurta sarısı ilave ettikleri sulandırıcıyla saklanan spermalarda motiliteyi daha yüksek bulmuşlardır. Bu durum sulandırıcıların motiliteyi önemli derecede etkilediğini doğrulamaktadır.

Bozkurt ve Tekin' in (1) yaptıkları çalışmada, ortalama motilite oranlarını nativ spermada $\% 75.25\pm1.33$, sulandırma sonrası Biociphos ile $\% 60.89\pm2.66$, Laiciphos ile $\% 63.30\pm1.25$, Sitrat ile $\% 45.72\pm1.97$ ve Tris ile $\% 58.96\pm2.62$ olarak saptamışlardır.

Sun'i tohumlamanın çok yoğun olduğu dönemlerde sulandırılmış nativ spermaların kullanılması çok doğaldır. Yalnız sulandırıcıların seçimi önemlidir ve çoğunlukla kaprojen (caprogen extenders) sulandırıcıların

kullanılması tercih edilmelidir. Çünkü bu tip sulandırıcılarla sperma oda ısısında 3 günden fazla canlı muhafaza edilebilmektedir. Fertilitenin % 4 oranında azaldığı belirtilmekle beraber bu oranın kabul edilebilir sınırlarda olduğu bildirilmektedir (5).

Boğa sperması Laiciphose W 488 ve AndroMed sperma sulandırıcıları ile sulandırılarak buzdolabında saklandığında, spermatozoonlar uzun süre canlı kalabilmektedirler. Fakat her iki sulandırıcıyla sulandırılıp, +4°C saklanan spermalar 3 gün boyunca sun'i tohumlamada kullanılabilirler.

Sonuç olarak, buzdolabında saklanan boğa spermaları spermanın alındığı gün dahil olmak üzere üç günden fazla kullanılmamalıdır. Çünkü motilite % 50' nin altına düşeceğinden döl verimini olumsuz yönde etkileyecektir. Ayrıca bu çalışmada karşılaştırılan iki sulandırıcı arasında motilitenin korunması açısından önemli bir farklılık tespit edilememiştir.

KAYNAKLAR

1. **Bozkurt E, Tekin N** (2002) *Boğa Spermasının Farklı Sulandırıcılar İle Dondurulması ve İn Vitro Değerlendirilmesi*. Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi 42(2) : 1 – 17.
2. **Demirci E, Gür S, Kinet H, Eroğlu A** (1995) *Laiciphos 488 İle Sulandırılmış ve Buzdolabında (+4°C) Saklanan Holştayn Boğa Spermasının Günlük Motilitesi*. Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi 35(1 - 2) : 21 – 29
3. **Franceschini PH, Pinheiro LEL, Leite FG, Oliveira-Filho EB, Esper CR** (1984) *Effects of storage on sperm motility in refrigerated boar semen*. Revista-Brasileira de Reproducao Animal 8 : 2, 91 – 95.
4. **Iwanow E** (1912) *Die künstliche Besamung der Haustiere*. Schaper, Hannover, 80 pp.
5. **Jansen HB and Umland J** (1988) *Optimal use in A.I. of high ranking Holstein bulls*. In: Proceedings 11 th International Congreces Animal Reproduction Artificial Insemination, Dublin, Ireland, Vol.3, 259.
6. **Karabinus DS, Evenson DP, Kaproth MT** (1991) *Effects of egg yolk- citrate and milk extenders on chromatin structure and viability of cryopreserved bull sperm*. Journal Dairy Science, 74: 3836-3848.
7. **Kumar S, Sahni KL, Benjamin BR, Mohan G** (1993) *Effects of various levels of yolk and deep-freezing and storage of buffalo semen in different dilutors without adding glycerol*. Buffalo Journal, 9 : 1, 79-85.
8. **Kumar S, Sahni KL, Mohan G** (1992) *Effects of different levels of glycerol and yolk of freezing and storage of buffalo semen in milk, tris and sodium citrate buffers*. Buffalo Journal, 8 : 2, 151-156.
9. **Özkoca A** (1986) *Sığırlarda reproduksiyon ve infertilite*. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları. No:7, İstanbul.
10. **Philips PH** (1939) *Preservation of bull semen*. J. Biol. Chem., 130 . 423.
11. **Sevinç A** (1977) *Dölerme ve sun'i tohumlama*. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, No:12, Ankara.
12. **Tardif AI, Farrell PB, Troven-Trend V, Foote RH** (1997) *Computer assisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5 degrees C*. Journal Dairy Science, Aug;80(8): 1606-1612.
13. **Tekin N** (1994) *Spermanın muayenesi ve değerlendirilmesi*. Theriogenology, s. 69-79. Editör E. Alaçam. 1. Baskı, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Ankara.
14. **Vishwanath R, Shanon P** (1997) *Do sperm cells age? A review of the physiological changes in sperm during storage at ambient temperature*. Reproduction Fertility Development, 9: 321-331.
15. **Vyas S, Mohan G, Dhami AJ, Sahni KL** (1992) *Studies on the norms and correlations of initial and postthaw seminal attributes of triple crossbred bull*. International Journal Animal Science, 7: 1, 73 – 76.
16. **Weitze KF and Petzoldt R** (1992) *Preservation of Semen*. Animal Reproduction Science, 28: 229-235.
17. **Yurdaydın N** (1994) *Spermanın alınması, saklanması ve sun'i tohumlama*. Theriogenology, s. 77-89. Editör E. Alaçam. 1. Baskı, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Ankara.
18. **Zar, J.H.** (1999) *Bioistatistical Analysis*. Fourth Edition Simon&Schuester/A Viacom Company., New Jersey. 288-299 p, USA.