

FARKLI SULANDIRICILAR KULLANILARAK DONDURULMUŞ ÇÖZDÜRÜLMÜŐ KOÇ SPERMASI İLE LAPAROSKOPIK İNTRAUTERİN TOHURLAMA

(Intrauterine Insemination by Laparoscopic Technique Using Frozen Thawed Ram Semen Extended With Different Diluents)

Umut TAŐDEMİR ¹

Hüseyin KİNET ¹

İbrahim ÖZCAN ¹

Remzi YURTSEVEN ¹

Pürhan Barbaros TUNCER ¹

1 : Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü, ANKARA

ÖZET

Bu çalışmada, koç spermaları taurin içeren Tris ve Hepes sulandırıcıları ile sulandırdıktan sonra sıvı azot buharında dondurulmuştur. Dondurulmuş ve nativ koç sperması kullanılarak laparoskopik yöntemle intrauterin tohumlanan koyunlarda (her grupta 20'şer olmak üzere toplam 60 koyun), gebelik ve doğum oranları karşılaştırılmıştır.

Tris ve Hepes sulandırıcıları ve nativ sperma ile tohumlanan koyunlarda gebelik oranları sırasıyla % 50, % 50 ve % 55, doğum oranları ise % 45, % 50 ve % 55 olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak; Tris, Hepes sulandırıcıları ve nativ sperma ile intrauterin tohumlanan koyunlarda, gebelik ve doğum oranları arasında istatistiki olarak önemli bir fark bulunmamıştır.

Anahtar Kelimeler : Dondurulmuş koç sperması, intrauterin tohumlama, laparoskopik teknik.

SUMMARY

In this study, the ram ejaculates were frozen in liqued nitrogen vapour after extended with Tris and Hepes diluents that its including taurin. Frozen ram semen and native semen were compared in regarding pregnancy and parturition rates in ewes (three group each has 20 animals) which were inseminated by intrauterine laparoscopic technique.

In the inseminated sheep with frozen Tris, Hepes extenders and native semen, pregnancy and parturition rates were determined 50, 50, 55 and 45, 50, 55 % respectively.

As a result; no significant differences were determined statistically between pregnancy and parturition rates in sheep which were inseminated with Tris, Hepes extenders and native semen.

Key Words : Frozen ram semen, intrauterine insemination, laparoscopic technique.

GİRİŞ

İntrauterin tohumlama tekniği Yeni Zelanda ve Avustralya'da yaygın olarak uygulanan ve ABD'de bazı saf ırkların yetiştirilmesinde sıkça kullanılan başarılı bir yöntemdir (11).

Koç spermasının soğutulması, dondurulması ve payetlenmesi esnasında motil spermatozoa oranı önemli ölçüde düşmektedir (10, 15). Serviksin koyunlardaki anatomik yapısından dolayı dondurulmuş koç sperması ile yapılan servikal tohumlamalarda sperma yeterli miktarda ovidukta ulaşamamakta ve böylece yüksek oranda dölverimi elde edilememektedir (1, 4, 8, 10, 15).

Laparoskopik intrauterin tohumlama tekniği; bir çok prosedür içermesi, alet ekipman temini, yetişmiş eleman ihtiyacı, hayvana cerrahi bir işlem uygulanması ve hayvan üzerinde stres oluşturması gibi dezavantajlara sahiptir. Ancak koç spermasında, boğa spermasında olduğu gibi dondurma sonrası yüksek motilite sağlanamadığından laparoskopik intrauterin tohumlama tekniği, koçlarda çözündürme sonrası motilitesi düşük spermanın uterusu doğrudan verilmesini sağladığı için tercih edilmektedir (5, 11, 20).

Koyunlarda nativ sperma ile vaginal ya da servikal tohumlamalar yapıldığında başarılı gebelik oranları elde edilmesine rağmen, dondurulmuş sperma için en ideal yöntemin intrauterin tohumlama tekniği olduğu bildirilmiştir (5, 6, 8, 9, 11).

Koyunlarda dondurulmuş sperma ile servikal tohumlamalardan elde edilen gebelik

oranlarının % 10-45 arasında değiştiği birçok araştırmacı tarafından bildirilmektedir (5, 6, 8, 9, 20, 21). Ancak, son yıllarda farklı sulandırıcı ve antioksidanlar kullanılarak dondurulmuş spermallerden daha iyi sonuçlar alındığı bildirilmektedir (21).

Yapılan bir çalışmada taurine antioksidanı içeren Tris ve Hapes sulandırıcıları ile sulandırılıp dondurulan spermallerde çözündürme sonrası motilite oranları sırası ile % 54.33 ve % 62.83 olarak belirlenmiştir (21).

Bu çalışmada; koç spermasının taurin antioksidanı içeren Hapes ve Tris sulandırıcıları kullanılarak dondurulması ve laparoskopik yöntemle uterusu verilen çözündürülmüş ve nativ spermanın gebelik ve doğum oranları üzerine etkileri karşılaştırılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada, materyal olarak Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsünde bulunan Akkaraman ırkından yaşları 3 ve 5 olan 2 baş koç ve en az bir doğum yapmış 3-5 yaşlı 60 baş koyun kullanılmıştır. Koyunlar 3 gruba ayrılmış ve her grup 20 baş hayvandan oluşmuştur.

Araştırma süresince her bir koçtan suni vajen yöntemiyle günlük arka arkaya 2 ejakülat alınmış ve elde edilen spermalar hacim (ml), mass aktivite (1-5), yoğunluk ($\times 10^6$ /ml), motilite oranı (%), pH, ölü – canlı (%) ve anormal spermatozoa oranları (%) gibi spermatojolojik özellikler yönünden incelenmiştir. Ejakülat miktarı; sperma toplama kadehinden direkt okunarak (ml) belirlenmiştir. Spermatozoa motilitesi (%) ve mass aktivite

lam ısıtma tablalı Phase Contrast mikroskopta 10x40 büyütmede muayene edilmiştir. Spermatozoa yoğunluğu 0.01 ml sperma örneği 5 ml Hayem solusyonunda sulandırılarak hemositometrik yöntemle saptanmıştır. Anormal spermatozoa oranının (%) değerlendirilmesi için 0.5 ml Hancock solusyonunda fikze edilen sperma (sıvı fikzasyon yöntemi) Phase Contrast mikroskobun immersiyon bakısında incelenerek, normal form dışında yapı gösterenler belirlenmiştir. Spermanın pH'sı renk skalası bulunan pH metre kullanılarak ölçülmüştür (19).

Spermaların sulandırılmasında Tris ve Hepses olmak üzere iki ayrı sperma sulandırıcısı kullanılmıştır. Sulandırıcıların pH sı NaOH ile 7.0'a ayarlanmıştır. Daha sonra Tris ve Hepses sulandırıcılarının içine 50 mM Taurine, %3 Glycerol ve %3 yumurta sarısı ilave edilmiştir.

Ejakülatlar 3 eşit kısma bölünerek I. ve II. kısımlar taurin antioksidanı içeren Tris ve Hepses solüsyonları ile bir tohumlama dozunda 100×10^6 motil spermatozoa bulunacak şekilde sulandırılarak 0.25 ml'lik payetlere çekildikten sonra sıvı azot buharında dondurulmuştur. III. kısım ise nativ olarak kullanılmıştır.

Doğal östrus gösteren koyunlar arama koçları yardımı ile belirlenmiş, kızgınlığı tespit edilen koyunlara sedasyon amacıyla ksilazin hidroklorür [3-5 mg/kg im (Rompun %2, 23.32mg/cc Xylazin Hydrochlorid, 50 ml, Bayer)] verilerek tohumlama sehpasına 45°'lik bir eğimle yatırılmıştır. Koyunun inguinal bölgesinin ventrali traş edilerek gerekli dezenfeksiyon sağlanmış, meme bölgesi

medio-lateral hattın 10 cm kranialine sol ve sağ yönlü olmak üzere infiltrasyon anestezisi (%2 Lidokain hidroklorür, Jetokain amp., Adeka) yapılmıştır. Daha sonra karın boşluğundaki organları daha iyi görmek için karın boşluğuna filtre edilmiş ajirojen hava verilmiş ve lokal anestezi yapılan noktalardan trokar yardımı ile karın boşluğuna girilmiştir. İki trokarın birinden laparoskop, diğerinden stile geçirilerek uterus ve ovaryumlar bulunmuş, gerekli muayeneler yapıldıktan sonra, stile çıkarılarak yerine özel suni tohumlama kateteri sokulmuştur. Ovulasyonun olduğu taraftaki kornu uteriye tek darbe ile girildikten sonra; 1. gruba Tris (taurin içeren) sulandırıcısı ile dondurulup çözündürülmüş sperma, 2. gruba Hepses (taurin içeren) sulandırıcısı ile dondurulup çözündürülmüş sperma ve 3. gruba ise nativ sperma verilerek tohumlamalar yapılmıştır. Daha sonra uterus ve karın boşluğunda herhangi bir kanama veya zedelenme olup olmadığı kontrol edilip, trokarlar yerinden çıkarılarak trokarla girilen noktalara sadece deri dikişi konulmuş, genel ve lokal antibiyotik [Lokal uygulama olarak Piyedif aerosol 140 ml, (3.675 g Kloramfenikol-0.07 Jansiyan moru, DİF), genel olarak Primamycin LA (200 mg/cc, oxytetracycline baz 50 mg/kg) Pfizer)] uygulamaları yapılmıştır.

Tohumlanan koyunlar gebeliğin ortalama 25. günü (B Mod Real Time linear rektal prob ve Shimadsu SDL32) ultrasonografi cihazı ile transrektal muayene edilerek gebe olanlar belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan koçların spermatozojik özellikleri "*t testi*", tohumlama-

lar sonrasında gebelik ve doğum oranları ise "z testi" ile istatistiki olarak değerlendirilmiştir (18).

BULGULAR

Bu araştırmada saptanan başlıca spermatojik özellikler Tablo 1' de belirtildiği gibi fizyolojik sınırlar içerisinde kalmıştır.

Taurin içeren Heps ile sulandırılıp dondurulan spermada çözündürme sonrası motilite Taurin içeren Tris'e oranla yaklaşık 2 kat daha yüksek olarak belirlenmiştir. Çözündürme sonrası spermatozoa motilitesi bakımından sulandırıcılar arasında belirlenen farklılık istatistiki olarak da önemli bulunmuştur ($P<0.01$).

Tablo 1: Tohumlamada Kullanılan Koçların Spermatojik Özellikleri

Koç No	Ejekülat Sayısı (n)	Hacim (cc) X ± Sx	Mass Aktivite X ± Sx	Yoğunluk ($\times 10^6$) X ± Sx	Motilite (%) X ± Sx	pH X ± Sx	Ölü-Canlı (%) X ± Sx	Anormal Spermatozoa (%) X ± Sx	Çözünme Motilitesi (%)		
									Heps X ± Sx	Tris X ± Sx	Ö.D.
1	20	3.43±0.281	4.53±0.140	3414±250	82.1±0.57	6.8±0.07	20.5±0.57	17.15±0.70	46.05±1.65	22.89±0.79	**
11	21	3.40±0.273	4.58±0.176	3368±224	81.0±0.72	6.7±0.8	21.19±0.68	20.8±0.46	45.79±1.59	21.84±0.79	**

** : $P<0.01$

Bu araştırma sonucunda elde edilen gebelik oranları Tris, Heps ve kontrol grubunda sırasıyla %50, %50 ve %55 olarak belirlenmiştir (Tablo 2). Yapılan

değerlendirme sonucunda gruplar arasında istatistiki olarak bir farklılık tespit edilmemiştir ($P>0.05$).

Tablo 2 : Gruplarda bulunan gebelik oranları

Uygulama Grupları	Hayvan Sayısı (n)	Gebe Kalan Hayvan Sayısı (n)	Gebelik Oranı (%)	Ö.D.
Tris	20	10	50	-
Heps	20	10	50	-
Taze sperma	20	11	55	-

- : $P>0.05$

Doğum oranları ise Tris, Heps ve kontrol grubunda sırasıyla % 45, % 50 ve % 55 olarak belirlenmiştir (Tablo 3). Gruplar arasında

doğum oranları bakımından istatistiki olarak bir farklılık saptanmamıştır ($P>0,05$).

Tablo 3: Gruplarda bulunan doğum oranları

Uygulama Grupları	Hayvan Sayısı (n)	Doğuran Hayvan Sayısı (n)	Doğum Oranı (%)	Ö.D.
Tris	20	9	45	-
Hepes	20	10	50	-
Taze sperma	20	11	55	-

- : P>0.05

TARTIŞMA VE SONUÇ

Transservikal suni tohumlama uygulamalarında başarı oranının düşük olmasının nedeninin serviksin koyunlardaki anatomik yapısına bağlı olarak yeterli miktarda spermatozoanın ovidukta ulaşamamasından kaynaklandığı bildirilmektedir (1, 5, 8, 11, 15). Bu nedenle süperovulasyon ve embriyo transferi çalışmalarında spermanın laparoskop yardımı ile doğrudan uterusu verilmesinin tercih edildiği bildirilmiştir (1, 8, 20).

Süperovulasyon uygulaması yapılmış koyunlara sulandırılmış nativ sperma kullanılarak yapılan laparoskopik intrauterin tohumlamalarda % 80 oranında başarı sağlanmış, fakat servikal yöntemle yapılan uygulamalarda bu oran daha düşük belirlenmiştir (8, 13, 20). Bunun yanında dondurulmuş sperma kullanılarak yapılan laparoskopik intrauterin tohumlamalarda gebelik oranının % 50 ile % 80 arasında değiştiği bildirilmektedir (2, 8, 12, 14, 15,16).

Eppleston ve Roberts (7), dondurulmuş sperma ile koyunlarda laparoskopik intrauterin

tohumlama yapmışlar ve % 49.8 oranında doğum tespit etmişlerdir. Windsor ve ark. (22), Merinos ırkı koyunlarda yaptıkları bir çalışmada dondurulmuş sperma kullanarak laparoskopik intrauterin tohumlama sonucu % 48, servikal yöntemle tohumlama sonucu % 9 oranında gebelik elde ettiklerini belirtmişlerdir.

Sanchez-Padrída ve ark (17), Tris ve Tris + 50 mM Taurine içeren sulandırıcılarla koç spermasını dondurmuşlardır. Kızgınlıkları sinkronize edilen koyunlara intrauterin yolla tohumlama yapmışlar ve sırası ile % 41.0 ve % 41.4 oranında fertilité elde etmişlerdir. Bu araştırmada ise tris içerisine taurin katılarak spermalar dondurulmuş ve çözdüürüldükten sonra laparoskopiyile yapılan intrauterin tohumlamalar sonucunda daha yüksek gebelik oranı elde edilmiştir. Bu fark kızgınlıkların sinkronize edilmesinden, spermanın dondurma ve çözdüürme tekniğinin farklı olmasından, tohumlamayı yapan kişilerin tecrübesi gibi nedenlerden kaynaklanmış olabilir.

Tablo 4: Değişik araştırmacıların farklı sulandırıcı ve metotlarla dondurdukları koç spermalarıyla yaptıkları intrauterin laparoskopik tohumlama sonuçları (17).

Referans	Sulandırıcı	Toh. Dozu (x10 ⁶ her iki kornuya verilen miktar)	Tohumlama Zamanı (Sünger çıkarıldıktan sonra)	Toh. Hayv. Sayısı	Fertilite %	Sinkronizasyon Metodu
Maxwell (1984)	Tris	40	60-66	837	50.7	FGA sünger
Eppleston ve Roberts (1986)	Tris	50	48	41	31.7	FGA sünger
			60	39	61.5	
			72	46	37.0	
Maxwell (1986)	Tris	50	48	111	45.9	FGA sünger
			60	107	55.1	
			72	115	57.4	
			78	61	39.3	
Gourley ve Riese (1990)	Tris	20	55-60	294	60.2	Sezon içi
				30	63.3	FGA sünger ve Norgestomet implant - Sezon dışı
Maxwell (1995)	Tris	20	60 (sperma pellet şeklinde donduruldu)	150	70.7	FGA sünger
			60 (sperma 0.25'lik payette donduruldu)	150	56.7	
			60 (sperma 0.5'lik payette donduruldu)	150	55.3	
			60 (sperma minitüb içinde donduruldu)	150	65.3	
Molinia ve ark. (1996)	Tris (360 mM)	20	50-60	42	66.7	FGA sünger
	Tris (300 mM)			40	47.5	
	Hepes			45	71.1	
Sanchez-Patrida ve ark. (1997)	Tris	30	46-60	39	41.0	FGA sünger
	Tris+50mM Taurine			41	41.4	

Molinia ve ark. (17)'nin yaptıkları çalışmada Hepes ile sulandırıp dondurdukları spermaları çözdürdükten sonra kızgınlığı sinkronize edilen koyunlarda laparoskopi ile intrauterin tohumlama yapmışlar ve % 71.1 oranında gebelik elde etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada Hepes sulandırıcısı grubunda bulunan % 50.0 doğum oranına göre bildirilen bu değer oldukça yüksektir. Araştırmacıların sperma dondurma tekniklerinin farklı olması ve koyunların kızgınlıklarının toplulaştırılması gibi nedenlerden dolayı bu farklılık ortaya çıkmış olabilir.

Ataman ve Çoyan (2), doğal östrus gösteren koyunlarda dondurulmuş sperma ile

yaptıkları servikal tohumlamalar sonucunda % 34.78 gebelik ve % 26.09 doğum oranı elde etmelerine rağmen intrauterin tohumlamalardan % 63.83 gebelik ve % 55.32 doğum oranı tespit etmişlerdir.

Ayar ve Akdeniz (3), Ankara keçilerinde dondurulmuş sperma kullanarak yaptıkları intraservikal ve intrauterin tohumlamalardan sırası ile % 10.5 ve % 36.8 oranında gebelik elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Gourley ve Riese (11), sezon içinde ve sezon dışında dondurulmuş sperma ile yaptıkları laparoskopik intrauterin tohumlamalardan sırasıyla % 73 ve % 63 oranında gebelik tespit etmişlerdir.

Thimonier (20), Fransız ırkı koyunlarda, Espinosa (8) ise, İspanya'nın kuzey bölgesinde yetiştirilen sütçü ırk koyunlarda laparoskopik yöntemle intrauterin tohumlama yapmışlar, sırasıyla % 61 ve % 55 gebelik oranı; % 47 ve % 43 doğum oranı elde etmişlerdir.

Daha önce yapılan çalışmaların sonuçları ve bu araştırma bulgularına paralel olarak suni tohumlama çalışmalarında laparoskopik teknik ile yapılan intrauterin tohumlama uygulamalarının intraservikal, transservikal uygulamalarına oranla gebelik ve doğum oranlarının daha yüksek olduğu, günümüzde hala uygulanabilir bir teknik olduğu düşüncesi benimsenmiştir.

Armstrong ve Evans (1), yaptıkları bir çalışmada süperovule koyunlarda nativ ve dondurulmuş sperma kullanarak intrauterin tohumlamalar yapmışlar, nativ sperma ile yapılan tohumlamalarda dondurulmuş spermaya oranla gebelik ve doğum oranlarının daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada, Armstrong ve Evans'ın (1) yaptıkları çalışmadan farklı olarak nativ ve dondurulmuş spermalarla yapılan suni tohumlamalarda gebelik ve doğum oranlarında istatistiki olarak herhangi bir farklılık belirlenmemiştir (Tablo 2-3). Gebelik ve doğum oranlarında farklılığın olmamasının, sulandırıcılar içerisine katılan taurin antioksidanına bağlı olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak; taurin antioksidanı katılarak Tris ve Heps sulandırıcıları ile dondurulan sperma ve nativ sperma ile yapılan tohumlamalar sonucunda elde edilen gebelik ve doğum oranları arasında istatistiki yönden önemli bir

farkın olmadığı ve bu nedenle de intrauterin tohumlamalarda nativ sperma yerine taurin antioksidanı katılarak sulandırılmış ve dondurulmuş spermaların rahatlıkla kullanılacağı söylenebilir.

KAYNAKLAR

1. **Armstrong DT, Evans G** (1984). Intrauterine insemination enhances fertility of frozen semen in superovulated ewes, *J. Reprod. Fert.*, 71, 89-94.
2. **Ataman MB, Çoyan K** (1996). Koyunların donmuş çözünmüş sperma kullanılarak laparoskop yardımı ile intrauterin tohumlaması. *Hayv. Araşt. Enst. Derg.*, 6(1-2) 31-34.
3. **Ayar A, Akdeniz C** (1995). Ankara keçilerinde dondurulmuş sperma kullanılarak intrauterin ve intracervikal tohumlama uygulamaları. *Lalahan Hayv.Araşt.Enst.Derg.*, 35(1-2)79-86.
4. **Chemineau P** (1992). Medio ambiente y reproducción animal. 6^{as} jornadas. *Int. Reprod. Anim. E.E.A., Salamanca, 2-5 Junio, Libro de ponencias y mesas redondas*, 292-306.
5. **Chemineau P** (1998). "Hayvancılık Üretim" kursu ders notları, Zaragoza, İspanya.
6. **Dziuk PT, Lewis JM, Graham EF, Mayer RH** (1972). Comparison between natural service and artificial insemination with fresh or frozen sperm at an appointed time in the ewe. *J. Anim. Sci.*, 35, 572-575.
7. **Eppleston J, Roberts EM** (1986). The effect of progestagen, PMSG and time of insemination on fertility in ewes following intrauterine insemination with frozen semen, *Aust. Vet. J.*, 63 (4) 124-125.
8. **Espinosa E** (1998). "Hayvancılık Üretim" kursu ders notları, Zaragoza, İspanya.
9. **Evans G** (1998) Current topics in artificial insemination of sheep. *Aust. J. Biol. Sci.*, 41, 103-106.
10. **Evans G and Maxwell WMC** (1987). *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. Sydney: Butterworths.
11. **Gourley DD, Riese RI** (1990). Laparoscopic artificial insemination in sheep, *Veterinary Clinics of North America, Food Anim. Prac.*, 6 (3), 615-633.
12. **Haresign W** (1990). Controlling reproduction in sheep. In: Slade, C.F.R. and Lawrance, T.L.J. (eds). *New Development in sheep production British Societs of Animal Production, Occasional Publication.*, No:14. pp: 23-37

13. **Mc Kelvey WAC, Robinson JJ, Aitken RP And Robertson IS** (1985b). The evaluation of a laparoscopic insemination technique in ewes. *Theriogenology* 24,519-535.
14. **Maxwell WMC** (1986b). Artificial insemination of ewes with frozen thawed semen at a synronised oestrus. 1. Effects of dose of spermatozoa and site of intrauterine insemination on fertility. *Animal Reproduction Science* 10, 309-316.
15. **Maxwell WMC and Hewitt LJ** (1986). A comparison of vaginal, cervical and intrauterine insemination of sheep. *Journal of Agricultural Science., Cambridge* 106, 191-193.
16. **Ritar AJ, Ball PD** (1993). The effect of freeze-thawing of goat and sheep semen at a high density of spermatozoa on cell viability and fertility after insemination, *Anim.Reprod. Sci.*, 31, 249-262.
17. **Salamon S, Maxwell WMC** (2000). Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci* 62 : 77 - 111.
18. **Soysal MT** (2000). Biometrinin Prensipleri (İstatistik I ve II Ders Notları). Trakya Üniv. Tekirdağ Ziraat Fakakültesi Yayın No: 95, Tekirdağ.
19. **Tekin N, Rose Agapel, Yurdaydın N, Yavaş Y, Daşkın A, Keskin O, Ethem H** (1991). Östrusları sinkronize edilen koyunlarda sun'i tohumlama yöntemiyle elde edilen dölverimi. *Ank. Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 38: 60-73.
20. **Thimonier, M.** (1998). "Hayvancılık Üretim" kursu ders notları, Zaragoza, İspanya.
21. **Uysal O, Kinet H, Çevik M, Çetinkaya S,** (2000). Değişik antioksidanlar içeren farklı sulandırıcılarla dondurulmuş koç spermalarında elde edilen dölverimi A.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi, 47, 2, 177 - 189.
22. **Windsor DP, Szell AZ, Buschbeck C, Edward AY, Milton JTB and Buckrell BC** (1994). Transcervical artificial insemination of Australian merino ewes with frozen-thawed semen, *Theriogenology*, 42: 147-157.