

TÜRKİYE'DE AYGIR SPERMASININ SIVI AZOTTA DONDURULMASI OLANAKLARI

(The possibility of freezing stallion semen liquit nitrogen in Turkey)

Mehmet KOZANDAĞI (*)

Mustafa İŞLER (**)

GİRİŞ

Ülkemizde uzun süredir sürdürülen at sun'i tohumlamasında karşılaşılan sorunların başında aygır spermasının sulandırılması ve uzun süre saklanamaması gelmektedir. Bu çalışmamızda amacımız; aygır spermasını, sulandırmada kullanılan yeni sulandırıcılardan yararlanmak suretile sıvı azotta derin dondurma olanaklarından faydalanarak uzun süre saklayabilmektir.

Halen ülkemizde yüksek performans gösteren damızlık aygırlardan istifade olanakları çok sınırlıdır. Bilindiği gibi ülkemizde damızlık aygırlardan ancak sıfat mevsiminde yararlanılmaktadır. Bu süre ise 3 - 4 ayı geçmemektedir. Bu araştırmamızda başarıya ulaşıldığı taktirde damızlık aygırların spermalarını uzun süre saklamak olanığı doğacaktır.

Bu çalışmamızda damızlık değeri yüksek aygırların uzun süre spermalarını saklamak suretiyle, damızlıkta kullanılmamaları, diğer bir anlamda damızlıktan çıkmaları ve ölmeleri halinde saklanan spermaları ile damızlıkta kullanılma olanakları devam edecek, ayrıca donmuş sperma ile pedigrî çalışmaları daha verimli ölçülere ulaşacaktır. Bilindiği gibi halen damızlık aygırların sıfat sezonu boyunca çoğu kez aşırı derecede sıfatta kullanıldıkları görülmektedir. Bu durum sperma kalitesine olumsuz etki yapmakta buna bağlı olarak dölverimi düşüklüğüne neden olmaktadır. Bu çalışmamızla aygırda yıl boyu belirli aralıklarla spermanın alınması sağlanacaktır.

(*) Dr., Uzman Vet. Hekim - Lalahan Zootečni Araştırma Enstitüsü

(**) Uzman Vet. Hekim - Borneva Sun'i Tohumlama Laboratuvarı

LİTERATÜR BİLGİSİ

Ayır spermalarının dondurulması hususunda çeşitli ülkelerde çok sayıda araştırma yapılmıştır.

Nishikawa ve Shinomiya (7), yaptıkları araştırmada 13 ayır kullandı. Sun'i vajenle alınan spermalar filtre edildikten sonra 3: 7 oranında glicose - Laktose - Raffinose - Citrate - Phosphate - Tartarate - Yumurta sarısı sulandırıcısı ile sulandırıldı. 10 dakika 600 - 800 devirde santrifüj edildi. Tabana çöken spermatozoitler tekrar 1:1 oranında aynı sulandırıcı ile sulandırıldı. 1 saatte 15°C soğutuldu. % 8 - 10 oranında gliserollü sulandırıcı da 1:1 oranında 3 - 4 safhada katıldı. 1 - 2 saat ekilibre edildikten sonra 1 cm³ lük payetlere çekildi ve - 80°C de likit nitrojen buharında donduruldu. Dondurulmadan hemen sonra canlı spermatozoit oranı % 80 idi. 3 - 4 payet çözülüp 25 ml. sulandırılarak yapılan tohumlamalarda gebelik oranı ortalama % 54. 5 olarak saptandı.

Bader (2), Ayır spermalarının derin dondurulmasında 32 ayır kullandı. Ayırlardan 65 ejakulat aldı. 1:3 oranında Laktoz - Yumurta sarısı - Gliserol sulandırıcısı ile sulandırdı. Kuru buz üzerinde pelet şeklinde donduruldu. Peletler sıvı azotta muhafaza edildi. Dondurulan spermanın çözülmesinde motil spermatozoit oranı ortalama % 50 (15 - 70) idi. Peletler 40°C de 15 - 25 cm³ steril sütle çözülerek karıştırıldı. Bir tohumlama dozu en az 100 milyon spermatozoit ihtiva ediyordu. Bu şekilde yapılan 27 kısarak tohumlamasında 13 gebelik sağlandı. Bunlardan 10 tanesi ilk tohumlamada diğerleri 2 ci , 3 cü ve 5 ci tohumlamalarda gebe kaldılar.

Aliev (1), Ayır spermalarını Laktoz - EDTA - Yumurta Sarısı - Sitrat sulandırıcısı ile sulandırdı.

Lactose	11.5 gr.
EDTA	100.0 mgr.
Na Bicarbonat	0.2 ml.
Na Citrate	0.25 ml.
Glycerol	2.5 ml.
Damıtık su	100.0 ml.

Ekilibrazyondan sonra 10 - 12 ml. lik dozlarda yumuşak tüplere konularak derin donduruldu. Sun'i tohumlamadan önce 1 dakikada 43°C de çözüldü. Tüpler kauçuk, katetere takılarak servixin içine verilmek suretiyle tohumlaması yapıldı. Çözüm sonu motilite ortalaması % 30 ve spermaların hayatta kalma süresi 148 saat idi. 75 gün muhafazadan sonra tohumlanan 30 kısarkta gebelik oranı % 83 olarak saptandı.

Platov ve Fomiņa (10), VNIİK - 3 adlı yeni bir sulandırıcısı ile ayır spermalarını sulandırdılar.

VNIİK – 3 sulandırıcısı:

Lactose	7 gr.
Tris	220 Mgr.
EDTA	873 mgr.
Tartarik asit (% 6.5 lik)	0.4 ml.
NaHco ₃ (% 2.05 lik)	0.3 ml.
Potasyum fosfat	2.7 ml.
Yumurta sarısı	5 ml.
Gliserol	3.5 ml.
Damıtık su	100 ml.

Bu sulandırıcı ile aygır spermasının dondurulmasında spermatozoit motilitesi % 15.9 - 34.1 idi.

Platov ve Fomina (11), Sovyet Rusya'da at yetiştirmede aygır spermasının dondurulması üzerine yaptıkları araştırmada % 50 motil spermatozoit ihtiva eden spermayı 0.2 ml. lik pelletler halinde dondurdular.

Bir tohumlama dozunda 300 - 400 x 10⁶ motil spermatozoit bulunacak şekilde yaptıkları 622 kısrağın tohumlamasında % 55 oranında gebelik elde ettiler.

Krause ve Grove (6), Aygır ve eşek spermalarını Glikoz - Yumurta sarısı - Gliserol, Laktoz - Yumurta sarısı - gliserol, Raffinoz - Yumurta sarısı - Gliserol sulandırıcıları ile sulandırdı. Pellet şeklinde donduruldu. Ejekulatlardaki ortalama spermatozoit motilitesi donmadan önce % 70 - 80, dondurulduktan sonra 40°C de steril sütte çözülen spermada ise % 50 - 70 idi. 40°C de 20 - 40 ml. steril sütte çözülen pelletlerde tohumlanan iki dişi eşekten bir gebelik, 4 kısrağın 2 gebelik saptandı.

Petelikova et al. (9), yaptıkları araştırmada 338 aygır ejakulatu sun'i vajenle alındı ve süzüldü. Ejekulatların ortalama miktarı 70.4, sperma konsantrasyonu 163.9 x 10³ /mm³ ve spermatozoit motilitesi % 64.7 olarak saptandı.

Ejekulatlar Naumenkov - Romankova sulandırıcısı ile sulandırıldı ve 251 dondurma yapıldı. Çözüm sonu sperma motilitesi ortalama % 31.6 idi. Bunlarla yapılan 27 kısrağın tohumlamasında % 66.6 gebelik elde edildi.

Bielanski ve Kosiniak (3) yaptıkları araştırmada 4 aygırdan Mart - Aralık 1969 tarihleri arasında alınan ve dondurularak likit nitrojende muhafaza edilen 279 ejakulatin dondurulduktan hemen sonraki çözülmesi ile 2 - 7.5 ay muhafaza edildikten sonra çözülen spermalar arasında belirli bir fark görülmedi.

Mart - Temmuz arasında alınan spermaların motilitesi düşük, Ağustos - Aralık arasında alınan spermalardaki motilite ise tederici olarak yükselmiştir.

Knoop (5), yaptığı araştırmada sun'i tohumlamada kullanılan aygır spermasının dondurulmasında PH 6.9 - 7.2, spermatozoit oranı 40×10^6 ile 80×10^6 idi. -80°C de dondurulan spermaları çözdükten sonra motilitesi % 50 - 70 oldu. Bu şekilde dondurulan spermalarla tohumlanan 2000 kısırakta % 70 gebelik saptandı.

Leopold ve Zironi (4), 13 koşu atından alınan sperma tülbentten süzildükten sonra Lactose - Glycerol - Yumurta sarısı sulandırıcısı ile sulandırdılar. Pellet şeklinde dondurdular. Spermatozoit motilitesini dondurulmadan evvel ortalama % 49.07, dondurulduktan hemen sonra % 24.82 olarak buldular.

Rombe (12), yaptığı araştırmada aygır spermasını dondurarak sakladı. Bir aydan fazla saklamalarda motilitenin düştüğünü gördü.

MATERYAL VE METOD

Araştırmanın materyalini Çifteler Harası yetiştirmesi olan 4 baş damızlık aygır oluşturdu. Aygırlardan alınan spermalar 3 eşit parçaya bölünerek:

- A - Glikoz - Laktoz - Yumurta sarısı
- B - Laktoz - EDTA - Yumurta sarısı - Sitrata
- C - Laktoz - EDTA - Tartarik asit - Potasyum fosfat - Yumurta sarısı sulandırıcıları ile sulandırıldı.

A - Glikoz - Laktoz - Yumurta sarısı sulandırıcısı (8):

Glikoz	5.0 gr.
Laktoz	0.3 gr.
Sodyum sitrat	0.3 gr.
Sodyum fosfat	0.05 gr.
Potasyum - sodyum tartarat	0.05 gr.
Yumurta sarısı	5.0 İ. U. / ml.
Gliserol	% 5
Damıtık su	100 ml.
Penicillin	500 İ. U. / ml.
Streptomycin	500 mg/ml.

B - Laktoz - EDTA - Sitrata - Yumurta sarısı sulandırıcısı (1):

Laktoz	11.5 gr.
EDTA	0.1 gr.
Sodyum bi karbonat (% 3)	0.2 ml.

Sodyum sitrat (% 3)	0.25 ml.
Yumurta sarısı	2.5 ml.
Gliserol	% 5
Damıtık su	100 ml.
Penicillin cristalisee	500 İ. U./ml.
Streptomycine	500 mg/ml.

C – Laktoz - EDTA - Tartarik asit - Potasyum fosfat - Yumurta sarısı sulandırıcısı (10):

Laktoz	7.0 gr.
Tris	220 mgr.
EDTA	873 mgr.
Tartarik asit (% 6.5)	0.4 ml.
Sodyum bi karmonat (% 3)	0.3 ml.
Potasyum fosfat (% 2)	2.7 ml.
Yumurta sarısı	5.0 ml.
Gliserol	% 5
Damıtık su	100 ml.
Penicillin cristalisee	500 İ. U. /ml.
Streptomycin	500 İ. U./ml.

Sulandırıcılar iki bölüm halinde hazırlandı. Birinci bölüm gliserolsuz, ikinci bölüm gliserollü idi.

Spermalar aygırlardan sun'i vajenle alındı. Önce makroskopik olarak miktar, renk, yoğunluk ve spermatozoitlerin toplu hareketleri incelendi. Daha sonra mikroskopik muayeneye geçildi. Bir damla sperma bir lam üzerine konularak mikroskopun küçük objektifi (10 x 10 büyütme) ile spermatozoitlerin toplu hareketleri incelendi. Daha sonrada küçük bir damla sperma lam üzerinde bir damla sulandırıcı ile karıştırılarak mikroskopun büyük objektifi (10 x 40 büyütme) ile bir yönde hızlı hareketli spermatozoit oranı (motilite) saptandı.

Spermatozoit yoğunluğu Hemositometre ile sayım yapılarak tayin edildi.

Bu şekilde gerekli muayenesi yapılan sperma 3 eşit parçaya bölündü. Her bölüm önce birinci bölüm olan gliserolsuz sulandırıcı ile 1 : 1 oranında sulandırıldı. Daha sonra 1000 devirlik santrifujde 15 dakika santrifuj edildi. İşlem sonunda plazma kısmı dibe çöken spermadan ayrıldı. Çöken sperma 1 : 1 oranında tekrar aynı sulandırıcı ile sulandırıldı. 45 dakikata + 4 °C ye düşürüldü. + 4 °C ye düşürülen bu sulandırılmış spermaya 45 dakikada 5 er dakikalık aralıklarla gliserollü sulandırıcı, gliserolsuz olarak sulandırılan sperma oranında katıldı. Böylece sulandırma işlemi tamamlanmış oldu. Daha sonra 0.5 cm.³ lük payetlere dolduruldu ve payetlerin açık kalan uçları polivinil alkol tozu ile kapatıldı. Ekilibrasyon için + 4 °C deki su banyosunda 2.5 saat bekletildi.

TABLO: 1 – Alınan Ejekulatın Spermatojok Özellikleri

Spermanın alındığı Tarih	Sperması alınan Aygırın No.su ve Adı	A L I N A N E J E K U L A T I N				Spermatozoit Motilitesi (%)			
		Miktarı (cm ³)	Spermatozoit konsantrasyonu (cm ³)	İlk Sulandırma- da	Dondurma- dan hemen önce	Dondurma- dan hemen sonra	8 ay bek- letildikten sonra		
								Dondurma- dan hemen önce	Dondurma- dan hemen sonra
17. 5. 1979	10 – 66 Seklavi	30	140 x 10 ⁶	50	45	35	35		
"	31 – 64 H. Zaman	75	110 x 10 ⁶	50	45	35	35		
"	54 – 75 H. Zaman	65	90 x 10 ⁶	60	50	45	45		
"	26 – 74 Alkuruş	25	150 x 10 ⁶	70	45	35	35		
29. 6. 1979	10 – 66 Seklavi	30	120 x 10 ⁶	60	45	40	40		
"	31 – 64 H. Zaman	45	90 x 10 ⁶	70	50	45	45		
"	54 – 75 H. Zaman	55	110 x 10 ⁶	60	50	45	45		
"	26 – 74 Alkuruş	30	100 x 10 ⁶	60	50	40	40		
ORTA LAMA		44	114 x 10 ⁶	60	47	40	40		

Ekilibrasyonu tamamlanmış spermanın dondurulması 2 aşamada yapıldı. Birinci aşamada — 100°C de azot buharında 7 dakika tutularak donduruldu. İkinci aşamada dondurulan bu spermalar sıvı azot içerisine daldırıldı ve orada muhafaza edildi.

Donma işlemi tamamlanmış spermalar 4°C de çözülerek mikroskopta motilite tayini yapıldı. Daha sonra bu spermalarda 8 ay süreyle ayda bir aynı şekilde çözülerek motilite durumları saptandı.

BULGULAR

Kullandığımız 4 aygırın iki ayrı tarihte alınan spermaları 3 değişik sulandırıcı ile sulandırıldı. Ancak, sulandırıcılardan Glikoz - Laktoz - Yumurta sarısı sulandırıcısında ilk sulandırmadan ve gliserilizasyondan sonra (ikinci sulandırmada) tek yönlü hızlı hareketli spermatozoitler (Motilite) izlendiği halde Laktoz - EDTA - Yumurta sarısı - Sitrata sulandırıcısı ile Laktoz - EDTA - Tartarik asit - Potasyum fosfat - Yumurta sarısı sulandırıcılarda gliserilizasyondan sonra spermatozoitlerde % 10 - 15 motilite saptandı. Yapılan tekrarlamalarda hep aynı sonuç alındığından anılan sulandırıcılarla dondurulmadı ve değerlendirmeye alınmadı.

Aygırlardan aldığımız ejakulatlarda saptadığımız sperma miktarı, spermatozoit konsantrasyonu, Glikoz - Laktoz - Yumurta sarısı sulandırıcısı ile gliserolsuz olarak sulandırdığımız ilk sulandırmada ki spermatozoit motilitesi ve 8 ay likit nitrojende muhafaza edip her ay motilite kontrollerini yaptığımız spermanın 8 ayın sonundaki spermatozoit motilitesi Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablodanda izlenebileceği gibi 4 aygırdan değişik iki tarihte 8 ejakulattaki ortalama sperma miktarı 44 cm³. dür. Sperma miktarı bu ejakulatlarda enaz 25 cm³. ile en çok 75 cm³. arasında değişmektedir. Spermatozoit konsantrasyonu ortalama 114 x 10⁶/cm³. olup bu en az 90 x 10⁶/cm³. ile en çok 150 x 10⁶/cm³. arasında bulunmuştur. Spermatozoit motilitesi ortalama olarak ilk sulandırmada % 60, dondurulmadan hemen önce % 47 ve dondurulduktan hemen sonra % 40 olarak saptanmıştır. Dondurulan spermaların 8 aylık bekletilme süresinde her ay motilite yönünden muayeneleri yapılmış ve bir değişikliğe müşahade edilmemiş, spermatozoit motilitesi hep aynı kalmıştır.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Kullandığımız 4 aygırdan değişik iki tarihte alınan spermalardan elde edilen ortalama sperma miktarı 44 cm³. olmuştur. Oysa yaptıkları araştırmada aygır sperması miktarını Petelikova et al. (9) 70. 4 cm³. bulmuştur. Bizim bulduğumuz sonuç araştırmacıların sonucundan daha düşüktür. Bu fark kullanılan aygırların değişik ırklardan olması, kullanma süre ve sıklığı nedenlerinden ileri gelebileceği gibi aygırların bulunduğu çevre koşullarından ve bakım farklılıklarından da doğmuş olabilir.

Dört aygırın spermalarındaki spermatozoit konsantrasyonunu ortalama $114 \times 10^6 / \text{cm}^3$. bulduk. Oysa Petelikova et al. (9) spermatozoit konsantrasyonunu 338 aygırda $163.9 \times 10^6 / \text{cm}^3$, Knoop (5) ise $40 \times 10^6 / \text{cm}^3$. ile $80 \times 10^6 / \text{cm}^3$. arasında bulmuşlardır.

Bizim bulgularımız Petelikova et al. (9) in bulgularından düşük Koop (5) un bulgularından ise yüksektir. Bu farklı sonuçlar, aygırlar ırkları arasındaki genetik farklılıklardan ileri gelebileceği gibi spermatozoitlerin konsantrasyonunun saptanmasında kullanılan tekniklerin değişik olmasından, aygırların değişik bakım koşulları altında bulunmasından olabilir.

Araştırmada kullandığımız 4 aygırın spermalarında dondurmadan önce ilk sulandırmada bir yönde, hızlı hareketli spermatozoit oranını ortalama % 60 olarak saptadık. Oysa Krause ve Grove (6) % 70 - 80, Petelikova et al. (9) % 64. 7 olarak bulmuşlardır. Bizim bulgularımız bu sonuçlardan daha düşüktür. Bunun nedeni sulandırıcılardan, sulandırma oranlarının değişik olmasından ve farklı tekniklerden ileri gelebilir.

Spermayı 5°C de gliserollü sulandırıcı bölümü ile sulandırdıktan ve 2. 5 saat ekilibre ettikten sonra (Dondurmadan hemen önce) spermatozoit motilitesini ortalama % 47 olarak saptadık. Oysa dondurmadan hemen önce spermatozoit motilitesini Leopold ve Zironi (4) 13 koşu atından aldıkları spermalarda % 49. 07, Platov ve Fomina (11) Sovyet Rusya'da at yetiştirmede aygır sperması üzerinde yaptıkları çalışmada % 50 olarak saptamışlardır. Bu bulgular bizim bulgularımıza benzerlik göstermektedir.

Dondurduğumuz aygır spermasını dondurmadan hemen sonra çözerek yaptığımız muayenede spermatozoit motilitesini ortalama % 40 olarak saptadık. Oysa Nishikawa ve Shinomiya (7) % 80, Krause ve Grove (6) % 50 - 70, Knoop (5) % 50 - 70, Bader (2) % 50, Aliev (1) % 30, Platov ve Fomina (10) % 15. 9 - 34. 1, Petelikova et al. (9) % 31. 6, Leopold ve Zironi (4) % 24 - 82 olarak bulmuşlardır. Bizim bulgularımız Nishikawa ve Shinomiya (7) nın, Krause ve Grove (6) ın, Knoop (5) un ve Bader (2) in bulgularından düşük; Aliev (1) in, Platov ve Fomina (10) nın, Petelikova et al. (9) ın, Leopold ve Zironi (4) nin bulgularından yüksektir. Bunun nedeni sulandırıcıların niteliğinden sulandırıcıya katılan gliserol oranının farklı oluşundan, sulandırma ve dondurma tekniklerinin farklı oluşundan meydana gelmiş olabilir.

Dondurulan spermaları likit nitrojen içerisinde 8 ay müddetle muhafaza edip her ay yapılan muayene sonunda ve 8 ayın sonunda spermatozoitlerin motilitesinde bir farklılığın mevcudiyeti görülmemiştir.

Aygır sperması üzerinde çalışan araştırmacılar Bielanski ve Kosiniak (3) likit nitrojende 2 - 7. 5 ay muhafaza ettikleri spermalarda bekletilme sonu belirli bir fark görmediler. Ancak Rombe (12) bir aydan fazla saklanan aygır spermasının motilitesinin, düşüğünü saptamıştır. Bununla birlikte farklı ırktan aygırların kullanılmış olması dondurma

işleminde ve muhafazasında değişik tekniklerin kullanılmasından ileri gelebilir.

Yaptığımız araştırmada glikoz - laktoz - yumurta sarısı sulandırıcısı ile aygır spermasının dondurulmasının kimi literatür verilerine uygunluğu nedeniyle memleketimiz şartlarında kullanılabileceği görülmektedir. Ancak kesin kanaate varabilmek için araştırmamızın ikinci aşaması olan kısırak tohumlamasına bir an evvel geçerek dölverimi yönünden de araştırmamızın yapılması umulan verilerin elde edilmesinde kesinlik kazanması bakımından daha da faydalı olacaktır.

ÖZET

Aygır spermasının sıvı azotta dondurulması üzerine yaptığımız araştırmada Çifteler Harası yetiştirmesi olan 4 aygır kullanıldı. Bunlardan değişik tarihlerde alınan spermalarda ortalama sperma miktarı 44.4 cm^3 spermatozoit konsantrasyonu $114 \times 10^6/\text{cm}^3$ olarak bulundu. Bu spermalar,

A – Glikoz - Laktoz - Yumurta sarısı,

B – Laktoz - EDTA - Sitrat - Yumurta sarısı

C – Laktoz - EDTA - Tartarik asit - Potasyum fosfat - Yumurta sarısı sulandırıcıları ile sulandırıldı. İlk sulandırmada ortalama % 60 spermatozoit motilitesi bulundu. Bu sulandırıcılardan yalnız Glikoz - Laktoz - Yumurta sarısı sulandırıcısı ile yapılan gliserilizasyon, ekilibasyon ve dondurma sonucu kimi literatür verilerine uygun sonuç alındı. Alınan bu sonuçta spermatozoit motilitesi dondurulmadan hemen önce % 47, dondurulduktan hemen sonra % 40 olarak saptandı. 8 ay müddetle her ay yapılan motilite muayenelerinde bu oran değişmedi.

SUMMARY

In this study, four stallions were which breeding in the Çifteler Zootechnical Research Institute were used. The average voluma of the semen taking from these stallions on the different dates was 44.4 cm^3 . The concentration of the spermatozoit was found $114 \times 10^6/\text{cm}^3$.

This semens were diluted as below

A – Glycos - Lactos - Egg york

B – Lactos - EDTA - Citrat - Egg york

C – Lactos - EDTA - Tartaric acid - Potassium phosphate - Egg york.

In the first dilution, the motilite of the spermatozoit was found sixty percent (% 60). The results taking from glycerelization, equilibration and freezing by using glucose - lactose - egg york were similiar the literatures and the motilite of the spermatozoit were obtained fourty seven percent (% 47) before freezing and fourty percond (% 40) after freezing.

This percent wasnit changed during eight months period.

LITERATUR

- 1 — ALIEV, A. (1975): *In improved technique of semen freezing* Anim. Breed. Abstr. 44: 180
- 2 — BADER, H. (1968): *Deep - freezing of stallion semen in pellet form.* Anim. Breed. Abstr. 37: 59.
- 3 — BIELANSKI, W., and KOSINIAK, K. (1970): *Artificial insemination of horses. III. properties of stallion semen frozen at various times of the year* Anim. Breed. Abstr. 39: 2821.
- 4 — LEOPOLD, A., and ZIRONI, A. (1970): *The freezing of horse semen.* Anim. Breed. Abstr. 38: 3270.
- 5 — KNOOP, C. E. (1969): *Freezing equine semen for use in artificial insemination.* Anim. Breed. Abstr. 37: 2223.
- 6 — KRAUSE, D., and GROVE, D. (1967): *Deep - freezing of jackass and stallion semen in concentrated pellet form.* Anim. Breed. Abstr. 36 : 67.
- 7 — NISHIKAWA, Y., SHINOMIYA, S. (1972): *Our experimental results and methods of deep freezing of horse spermatozoa.* Anim. Breed. Abstr. 42 : 4133.
- 8 — NISHIKAWA, Y., and SHNOMIYA, S. (1972): *Freezability of horse semen collected during non - breeding season. VII. Int. Congr. Anim. Reprod. A. I. München, 2, 1593.*
- 9 — PETELIKOVA, J., MATOUSER, V., MÜLLER, Z. (1977): *Experiences with artificial insemination of mares with frozen semen.* Anim. Breed. Abstr. 46: 3162.
- 10 — PLATOV, E. M., FOMINA, E. L., MURAV'eva, L. N. (1975): *Freezing of stallions semen.* Anim. Breed. Abstr. 44: 1058.
- 11 — PLATOV, E. M., FOMINA, E. L. (1976): *Freezing stallion semen in the horsebreeding of the USSR.* Anim. Breed. Abstr. 45: 1152.
- 12 — ROMBE, S. M. (1966): *Changes in the quality of thawed stallion semen in relation to the duration of storage at -79°C .* Anim. Breed. Abstr. 35: 3296.