

Teke Spermasının Saklanması ve Suni Tohumlama

Burcu ÜSTÜNER*

Ülgen GÜNAY**

Geliş Tarihi: 14.09.2009

Kabul Tarihi: 25.09.2009

Özet: Suni Tohumlama (ST), doğal aşımın aksine erkek bireyden alınan spermanın mekanik yolla dişi genital kanala verilmesidir. ST keçi yetiştiricilerine genetik olarak üstün özellikteki erkek bireylerin kullanımı imkanı verir. Birbirinden kilometrelerce uzaklıkta bulunan üstün özellikteki erkek ve dişi keçinin çiftleşmesi, donmuş sperma kullanarak gerçekleştirilen ST ile yapılmaktadır. Yapılan ST ile istenilen özellikte yeni sürüler oluşturmak, akrabalı yetiştirmeyi azaltmak, çiftleşme ile bulaşan hastalıkların kontrolü, üstün özellikteki bir tekedeki maksimum oranda faydalanmak ve sürüde teke eliminasyonu ile işletmeye getireceği masrafı azaltmak mümkün olmaktadır. 5°C'de kısa süreli saklanan ve -196°C'de uzun süreli saklanan spermalar ST'da kullanılmaktadır. Bu derlemede, teke spermasının saklanması ve saklanan spermalarla yapılan suni tohumlamalardan elde edilen gebelik oranları üzerine değinilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Teke sperması, spermanın saklanması, suni tohumlama.

Storage of Buck Semen and Artificial Insemination

Abstract: Artificial insemination (AI) involves placement of semen from a male in to the reproductive tract of a female by mechanical means rather than by natural mating. AI offers goat breeders the potential for use of genetically superior sires. The mating of outstanding sires and dams, even kilometers apart, may be effectively performed by AI using frozen semen. AI have the potential to create desirable new lines, reduce inbreeding, control of venerally transmitted diseases, maximal use of outstanding sires, elimination of bucks on the farm and decreased expenses about buck. Sperm stored short term at 5°C and long term at -196°C are used for AI. In this review, storage of buck semen and pregnancy rates obtained artificial insemination with stored semen have been mentioned.

Key Words: Buck semen, storage of semen, artificial insemination.

Giriş

Keçi yetiştiriciliği Dünya ülkelerinde tarım ekonomisi yönünden hayvan varlığı ve üretim yapıları ile değişiklik göstermektedir. Küçük başa ait toplam hayvan sayısında, et ve süt üretiminde keçi yetiştiriciliği sırasıyla; Dünya'da %42.9, %34.3 ve %59.7, Avrupa Birliği ülkelerinde %10.0, %7.9 ve %39.8, Türkiye'de %20.5, %14.4 ve %24.3'lük paya sahiptir².

Son yapılan istatistiklere göre Türkiye'de 6.5 milyon baş keçi bulunmakta ve bu yetiştirme

kolundan 12 390 ton et, 253 759 ton süt, 2 654 ton kıl, 302 ton tiftik ve 719 467 adet deri üretimi sağlanmaktadır. Dünya'da keçi sayısı ve verimsel üretim düzeyi artarken, Türkiye'de hızlı bir şekilde azalmaktadır. Keçi yetiştiriciliğinde 1991-2005 yılları arasında hayvan sayısı %39.5, et miktarı %36.7, süt miktarı %24.2, kıl miktarı %32.9 ve tiftik miktarı %79.1 oranında azalmıştır¹. Bu duruma keçi orman ilişkisine bağlı olarak 1960'lı yıllardan itibaren 5 yıllık kalkınma planlarında uygulanan yanlış hayvancılık politikaları, pazara yönelik üretimin yapılmaması,

* Dölerme ve Suni Tohumlama A.B.D., Bursa, TÜRKİYE, e-mail: bbaspinar@uludag.edu.tr

sadece aile işletmeciliğinde yürütülmesi ve beslenme alışkanlıkları en büyük etken olmuştur.

Keçi sütü, proteinlerinin besin değerinin anne ve inek sütündekinden daha yüksek olması, kazeinin düşük düzeyde bulunması, süt yağının %99'unun trigliserid yapısında ve kısa zincirli yağ asitlerince zengin olması nedenleri ile besin değerliliği çok yüksek ve sindirilmesi daha kolaydır. Bu durum karaciğer hastalıklarının tedavisinde ve bebek beslenmesinde önem taşımaktadır. Laktozun keçi sütünde, anne ve inek sütüne göre daha düşük düzeyde bulunması dolayısıyla laktoz intoleransına duyarlı bebek ve erişkinler için keçi sütü alternatif besin kaynağı olmaktadır. Keçi sütü bu yönüyle Avrupa ülkelerinde değişik ürünleriyle önemli bir pazar oluşturmaktadır. Keçi sütü yüksek fosfor içeriği nedeni ile yeterince et ve balık tüketemeyen toplumların beslenmesinde önemli bir yer tutmaktadır. Keçi sütü A, B₁, B₂ ve K vitaminleri yönünden de oldukça zengindir¹⁷.

Keçi sayısının ve gerekse hayvan başına alınan verim özelliklerinin artırılması, bilimsel ıslah programlarının uygulanabilirliği ölçüsünde mümkün olmaktadır. Yetiştiricilikte en önemli verim özelliği döl verimidir. Hayvanlardan sürekli ve iyi bir döl verimi alınabilmesi ise, büyük ölçüde döl verimini etkileyen faktörlerin kontrol edilebilmesine bağlıdır.

Hayvan yetiştiriciliğinde suni tohumlama yöntemi, sürüde genetik iyileşmenin hızlı bir biçimde gelişimini sağlayan modern bir yöntem olarak görülmektedir. Bu nedenle keçilerde suni tohumlama yönteminden yararlanarak üstün özellikteki erkek bireylerin dondurulmuş spermalarının kullanımı, yetiştirme programlarında hızlı bir genetik iyileşme elde edilmesi bakımından büyük önem taşımaktadır. Öte yandan, teke spermasının dondurulup suni tohumlama yöntemiyle tohumlamada kullanılması üzerindeki çalışmalar 1950'li yıllarda başlayarak günümüze kadar süregelmiştir²⁵.

Suni tohumlama uygulamalarının yaygınlaştırılması ile genetik ilerlemenin hızlandırılması, damızlık değeri yüksek tekelardan daha fazla yararlanılması, yetiştirmeye bağlı gereksiz uğraş ve masrafların azaltılması, çiftleşme ile bulaşabilecek reproduktif hastalıkların kontrolü ve döl veriminin artırılabilmesi sağlanabilecektir.

Keçilerde Seksüel Siklus

Keçiler mevsime bağlı poliöstrik hayvanlardır. Seksüel siklusun uzunluğu gün uzunluğuna, ırka ve beslenmeye bağlı olarak değişmekte-

dir. Ilıman bölgelerde çoğu keçi ırkları ilkbahar ve yaz mevsimi süresince anöstrusta olup, siklus sonbahar mevsimi süresince gün ışığının azalmasından dolayı tekrar başlamaktadır. Tropikal bölgelerde, gün uzunluğundaki değişimin daha az olmasından dolayı yerli ırk keçiler yıl boyunca aktiftirler. Bu yüzden ılıman iklimin ırkları tropik bölgelere götürüldüğü zaman reproduktif aktivitelerindeki mevsimsel değişim kaybolmakta ve yeni ortamın üreme özelliklerini göstermektedirler. Yüksek çevre sıcaklığı ve beslenmenin yetersiz olması tropikal bölgelerde yılın bazı aylarında seksüel aktiviteyi kısıtlayabilmekte fakat yağmurların başladığı mevsimlerde mera şartlarının iyileşmesi, uygun çevre sıcaklığının oluşması seksüel aktiviteyi artırmaktadır^{10,11}.

Tekelerin seksüel aktivitesi gün uzunluğundan etkilenmektedir. Seksüel aktivitedeki pik sonbahar mevsimi boyunca devam etmekte bu da aşım mevsimi boyunca plazma testosteron düzeyindeki artışla eş zamanlı olmaktadır. Tekelerde puberte testosteron sekresyonundaki artış, spermatogenezis ve çiftleşme davranışlarındaki belirginleşme ile ilişkilidir. Tekelerde spermatozoonların gözlenebildiği ejakülasyonlu bir kopulasyon, tekenin ergin ağırlığının %40-60'ına ve 4-6 aylık yaşa ulaştığı zaman şekillenmektedir. Serum testosteron düzeyindeki artış tekelere 17 ile 20 aylık yaşta olmaktadır¹⁰.

Seksüel davranışlar, testis büyüklüğü, sperma üretim miktarı ve kalitesinde şekillenen mevsimsel değişimlerin, çalışmanın yapıldığı bölgenin enlemine bağlı olarak az ya da daha çok belirginleştiği bildirilmektedir^{6,11,36}.

Karagiannidis ve ark.¹⁵ aşım mevsimi boyunca tüm sperma özelliklerindeki ilerlemenin, LH ve testosteron düzeyini arttıran pineal melatonin sekresyonundaki değişime bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Kısalan günlerin LH sekresyonunu stimüle ettiği ve bu yolla testiküler büyümenin indüklenerek testosteronun salgılandığı bildirilmektedir. Uzayan günlerin ise LH sekresyonunu, testiküler büyümeyi ve testosteron salgılanmasını deprese ettiği tespit edilmiştir^{22,23,26}.

Tekelerde Sperma Alma Yöntemleri

Tekelerden spermanın en uygun şekilde suni vajen ya da elektroejakülatör kullanarak alındığı, suni vajenle alınacağı zaman dışardan uyarıya gerek duyulmadığı fakat fantom kullanılması gerektiği belirtilmiştir. Tekenin suni vajene sperma vermeye alıştırılması için sürece gereksinimin olduğu, alıştırma döneminin iki

günden birkaç haftaya kadar uzayabileceği, bazı tekelerin ise alıştırılmasının mümkün olmadığı belirlenmiştir. Sperma vermeye alışan tekelerden aşım mevsimi içinde ve östrustaki dişinin varlığında günde bir ya da iki kez sperma alınabileceği bildirilmiştir¹⁰.

Elektroejakülatörle sperma, üç elektrotlu rektal problu elektroejakülatörün (19x3.5cm. uzunlukxçap) kayganlaştırılarak rektuma yerleştirilmesi ile aralıklı olarak 2-3 saniyede bir verilen uyarımlarla alınabilmekte fakat elektroejakülatör kullanımında ejakülasyon dışarıdan müdahaleyle yaptırıldığı için libidonun değerlendirilememesi dezavantaj oluşturmaktadır. Başarılı olarak kullanılan elektroejakülatör yönteminin rektal probu ile tekenin rektumunda az bir travma ile 30 sn. masaj yapıp, daha sonra 8 ile 10 sn. direkt uyarımlar verilmelidir³⁹.

Suni vajen ve elektroejakülatörle sperma alma tekniklerinin karşılaştırıldığı çalışmalarda^{21,39}, elektroejakülatörle alınan sperma hacminin suni vajenle alınana göre daha fazla olduğu, sperma yoğunluğunun ise daha düşük bulunduğu belirtilmektedir.

Tekelerde Spermanın Kısa Süreli Saklanması

Teke sperması 2 ile 15°C arasında en çok 4-5°C'de saklanır. Sodyum sitrat-yumurta sarısı, sodyum sitrat-fruktoz-yumurta sarısı, sakkoroz-EDTA, yumurta sarısı içeren ya da içermeyen sütlü sulandırıcılar, Spermosol, Diloften gibi bir çok sulandırıcı 5°C'de saklanabilecek spermaların sulandırılmasında kullanılabilir. Son günlerde en çok kullanılan sulandırıcılar yağsız süt, sodyum sitrat- ve Tris-bazlı sulandırıcılardır. Yukarıda belirtilen sulandırıcılarla sulandırılarak 5°C'de saklanan spermanın viabilitesi ve fertilitesi 5-72 saat gibi geniş bir varyasyon göstermektedir. Seminal plazması ayrılmadan 5°C'de saklanan spermaların viabilite ve fertilitate sonuçlarının belirtildiği çalışmalarda, 5 ile 8 saat kadar bir sürecin memnuniyet verici olduğu bu süreden sonra özellikle 12-24 saat sonra fertilitenin düştüğü belirtilmektedir¹⁸.

Teke Spermasının Uzun Süreli Saklanması (Dondurulması)

Teke sperması ilk defa 1950 yılında Smith ve Polge³⁵ tarafından dondurulmuştur. Teke spermasının dondurulmasında; yağsız süt tozu, sodyum sitrat-glukoz-yumurta sarısı, laktoz-yumurta sarısı, raffinoz-yumurta sarısı,

spermasol-yumurta sarısı, Tris-yumurta sarısı ve Test-yumurta sarısı gibi birçok sulandırıcının ve %3-%9 arasında değişen gliserol konsantrasyonlarının kullanıldığı bildirilmektedir^{18,29}.

Teke spermasının dondurulması için en yaygın kullanılan sulandırıcılar ya yumurta sarısı yada yağsız süt tozu içermektedir. Bununla birlikte yumurta sarısı ya da süt içeren sulandırıcılar ile teke spermasının sulandırılması, spermatozonlar için zararlı olabilmektedir. Teke seminal plazması ve yumurta sarısı arasındaki zararlı ilişki ilk olarak Roy³² tarafından, seminal plazma ve süt arasındaki zararlı ilişki ise ilk olarak Nunes ve ark.²⁴ tarafından bildirilmiştir. Roy³², seminal plazma ayrıldığında spermatozonların yumurta sarısı içeren sulandırıcılarda motilitelerini devam ettirdiklerini fakat seminal plazmayı ayırmadan yumurta sarısı içeren sulandırıcı ilave edildiğinde yumurta sarısının koagüle olduğunu ve spermatozonların öldüğünü saptamıştır. Ayrıca bulbouretral bezden salgılanarak yumurta sarısını koagüle eden bu enzimin yumurta sarısını koagüle edici enzim (EYCE) olarak isimlendirildiğini bildirmiştir.

Nunes ve ark.²⁴, teke bulbouretral bezinden bir protein (SBUIII) identifiye ederek bu proteinin, sütlü bir sulandırıcı ile sulandırılarak soğutulan ya da dondurulan teke spermasının viabilitesini azalttığını belirtmişlerdir. Pellicer-Rubio ve ark.²⁷ tarafından yapılan bir çalışmada ise sütlü sulandırıcılarda inkube edilen spermatozonların akrozom reaksiyonlarının indüklendiği ve sonuçta hücre ölümünün şekillendiği tespit edilmiştir.

EYCE ve SBUIII'ün benzer moleküller yapıya sahip olduğu belirtilmiştir¹⁸. EYCE, fosfolipaz A olarak¹³, SBUIII ise teke bulbouretral bezinden salgılanan 55-60 kDa'luk bir glikoprotein lipaz (BUSgp60) olarak tanımlanmıştır²⁷. EYCE'in, yumurta sarısı lesitinlerini yağ asitlerine ve lisesitinelere hidrolize eden bir enzim olarak rol aldığı, bu hidrolizin spermatozon membranının daha füzyogenik hale gelmesine neden olarak akrozom reaksiyonunu ve sperma kromatin dekonduksiyonunu uyardığı ve sperma için toksik hale geldiği bildirilmektedir^{13,33,37}.

BUSgp60'ın, plazma membran trigliseridleri ve sütteki trigliseridlerin hidroliziyle yağ asitlerinin oluşumundan sorumlu olduğu ve hidroliz sonucu oluşan bu ürünlerin (yumurta sarısı ile lizesitinelere oluşumu ve süt trigliseridleri ile oleik asit oluşumu) sperma için toksik özellikte olduğu açıklanmaktadır. Ayrıca, EYCE ve BUSgp60'ın mekanizmalarına bakılmaksızın

sulandırıcı içindeki aktivasyonlarının soğutma ve dondurulma sırasında spermatozoonlar üzerinde zararlı olduğu da vurgulanmaktadır^{27,28}.

Seminal plazmanın, yumurta sarısı ya da süt proteinleri ile olan zararlı ilişkisini ortadan kaldırmak amacıyla teke spermasının sulandırılarak bir yada iki kez 550-950xg'de 10-15 dakika santrifüj edilerek seminal plazmanın ayrılmasının gerektiği ve santrifüjün zaman alan bir işlem olduğu, seminal plazmanın uzaklaştırılması işleminin uygun bir şekilde yapılmadığı zaman spermatozoonlara zarar verebileceği bildirilmiştir^{24,29,30,34}. Bulbourethral bezi cerrahi yöntemle alınmış (cowper-ectomize) tekelerden alınan spermalarda, EYCE ve SBUIII'ün toksik etkilerinin azaldığı tespit edilmiştir¹⁴.

Teke spermasında, eritme sonrası maksimum motilite ve akrozom bütünlüğü elde edebilmek için seminal plazmanın ayrılması gerektiğini belirten çalışmalar^{8,21,38} yanında bazı çalışmalarda^{3,30} spermanın yıkanmadan dondurulmasından pozitif sonuçlar elde edildiği belirtilmiştir.

Kısa ve Uzun Süreli Saklanan Spermalar ile Yapılan Suni Tohumlamalardan Elde Edilen Gebelik Oranları

5°C'de saklanan sperma ile yapılan servikal tohumlamadan sonra fertilitenin düşmesinin sebebi dişi genital kanalda spermanın transportundaki bozukluk ve viabilitesinin iyi olmaması olarak açıklanmaktadır²⁰. Eppleston ve ark.⁹ tarafından, düşük fertilitite oranlarını desteklemek amacıyla tohumlamalar serviksden değilde laparoskopik olarak intrauterin yapılmıştır. Bu amaçla tohumlamalar Tris-fruktoz-sitrik asit-yumurta sarısı ile sulandırılarak 5°C'de en az 8 gün fertilitisini koruyan spermalar ile yapılmıştır. 5°C'de saklanan sperma ile 2, 4 ve 8. günlerde servikal ve intrauterin olarak yapılan tohumlamalardan elde edilen gebelik oranları sırasıyla %64 ve %65; %36 ve %16; %3 ve %25'dir.

Mara ve ark.¹⁹'nın yapmış oldukları çalışmada ise finalde 100x10⁶ spermatozoon/ml olacak şekilde sütle sulandırarak 5°C'de 7 saat beklettikleri sperma ile 42 keçi tohumlamışlar ve %71.4 (30/42) gebelik oranı elde etmişlerdir.

Dorado ve ark.⁸, dondurulmuş sperma ile yaşları 2 ve 5 yaş arasında değişen genç ve yaşlı keçilerde servikal tohumlama yapmışlar gebelik oranını genç keçilerde ve yaşlı keçilerde sırasıyla %33.33 ve %55.56 elde etmişlerdir. Gebelik

oranları bakımından gruplar arasında istatistiksel fark tespit edilmemiştir (P>0.05). Dondurulmuş spermayla yapılan tohumlamaların fertilitite sonuçları ile ilgili olarak, %3-15 arasındaki gebelik oranlarının düşük, %20-48 arası orta düzeyde ve %70'in üzerinin başarılı olduğu belirtilmiştir⁵.

Dogan ve ark.'nın⁷ sünger/PMSG ve sünger/PGF2 α kullanarak senkronizasyon yaptıkları bir sürüde dondurulmuş sperma kullanarak servikal tohumlama yapmışlar ve gebelik oranlarını sırasıyla %27.7 ve %35.0 elde etmişlerdir.

Süt ve Tris sulandırıcısı kullanarak dondurdukları spermalarla yapmış oldukları intra-servikal tohumlamalardan⁸ sırasıyla %52.4 ve %42.9 gebelik oranı elde etmişlerdir.

Batista ve ark.⁴ tarafından finalde 400x10⁶ spermatozoon/ml olacak şekilde Tris-glukoz-sitrik asit-yumurta sarısı sulandırıcısı kullanarak dondurdukları spermaları sıvı azotta sakladıktan 1 ay ve 6 ay sonra çözündürmüşler ve servikal olarak östrus başladıktan 18-20 saat sonra tohumlama yapmışlardır. Saklamadan 1 ve 6 ay sonra çözündürülen spermalardan elde edilen yavrulama oranları sırasıyla %43.6 ve %42.8'dir ve gruplar arasında istatistiksel bir fark tespit edilmemiştir.

Holtz ve ark.¹² Ovsynch ve progesteron içeren sünger kullanarak her grupta 24 hayvan olacak şekilde senronizasyon yaparak sabit zamanlı tohumlama yapmışlar ve yavrulama oranlarını sırasıyla %58 ve %46 elde etmişlerdir.

Tris-sitrik asit-glukoz sulandırıcısı kullanarak pellet yöntemine göre dondurdukları teke spermaları ile intra-servikal ve laparoskopik yöntemle tohumlama yapan Ritar ve ark.³¹ %40.7 ile %64 gebelik oranları elde etmişlerdir. Aynı araştırmacılar yapmış oldukları bu çalışmada serviksin 1 cm ilerisine, serviksin 1.5-3 cm ilerisine ve uterus içine spermayı verdiklerinde sırasıyla %23.2, %34.2 ve %44.9 gebelik oranları elde etmişlerdir.

Karatzas ve ark.¹⁶, aşım sezonu dışında yapmış oldukları çalışmada dondurulmuş sperma ile bir kez ve iki kez yapılan suni tohumlamalardan sırasıyla %44.9 ve %59.1 doğum oranı elde etmişlerdir ve gruplar arasında P<0.001 düzeyinde istatistiksel fark tespit etmişlerdir.

Sonuç

Keçilerde ST'da elde edilecek başarılı bir fertilitite oranı, sperma kısa veya uzun süreli saklansa da spermanın alınmasından depolanmasına kadar geçen her aşamada hassas olunması gerek-

tiğidir. Bu prosedür spermaların alınacağı tekele-
rin beslenmesinden başlanılarak spermanın
alınma şekli, işlenmesi hatta uzun süreli saklan-
cak olursa azot tankına belli aralarla azot ikmaline
kadar varır. Keçilerde östrus ve
ovulasyonların senkronizasyonu ile doğru yapı-
lan bir kızgınlık tespiti ve ovulasyona yakın
yapılacak tohumlamayı da kapsayan başarılı bir
ST organizasyonu ile istenilen özellikte yeni
sürüler oluşturmak mümkün olabilmektedir.

Kaynaklar

1. Anonim. Die, Hayvancılık İstatistikleri, Ankara, 2005.
2. Anonim.FAO Production Yearbook, 2005.
3. Azerêdo, G.A., Esper, C.R., Resende, K.T., 2001. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. Small Ruminant Research, 41, 257-263.
4. Batista, M., Niño, T., Alamo, D., Castro, N., Santana, M., González, F., Cabrera, F., Gracia, A., 2009. Successful artificial insemination using semen frozen and stored by an ultrafreezer in the Majorera goat breed. Theriogenology, 71, 1307-1315.
5. Corteel, J.M.,1973. Artificial insemination of goats: physiological basis, present state and future prospects. Word Rev Anim Prod, 9, 73-99. (abstract).
6. Doğan, I., Nur, Z., Gunay, U., Soylu, M.K., 2005. Semen characteristics during the transition period in Saanen bucks. Indian Vet. J, 82,1080-1082.
7. Dogan, I., Konyalı, A., Gunay, U., Yurdabak, S., 2008. Comparison of the effect of cronolone sponges and PMSG or cloprostenol on estrous induction in Turkish Saanen goats. Polish Journal of Veterinary Sciences, 11, 29-34.
8. Dorado, J., Rodriguez, I., Hidalgo, M., 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.
9. Eppleston, J., Pomares, C.C., Stojanov, T., Maxwell, W.M.C., 1994. In vitro and in vivo fertility of liquid stored goat spermatozoa. Proc. Aust Soc Reprod Biol 26, 111 (Abstract).
10. Gordon, I., 1999. Controlled reproduction in sheep and goats, 2nd Ed., CABI Publishing, pp. 351-359.
11. Hafez, E.S.E., Hafez, B., 2000. Reproduction in farm animals, 7th Ed, Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, pp.172-182.
12. Holtz, W., Sohnrey, B., Gerland, M., Driancourt, M.-A., 2008. Ovsynch synchronization and fixed-time insemination in goats. Theriogenology, 69, 785-792.
13. Iritani, A., Nishika,W.A., 1961. Studies on the egg yolk coagulating factors in goat semen: II properties of the coagulating factor and influential conditions for foagulation. In: Proceedings of Silver Jubilee Laboratory of Animal Husbandry, Kyoto University, 97-104.
14. Iritani A., Nishika W.A., 1963. Studies on the egg-coagulating enzyme in goat semen: IV. On the position of yolk constituents attacked by the coagulating enzyme. Jpn J Anim Reprod 8 (4),113-117.
15. Karagiannidis, A., Varsakeli, S., Karatzas, G., 2000. Characteristics and seasonal variations in the semen of Alpine, Saanen and Damascus goat bucks born and raised in Greece. Theriogenology, 53, 1285-1293.
16. Karatzas, G., Karagiannidis A., Varsakeli, S., Brikas, P.,1997 Fertility of fresh and frozen-thawed goat semen during the nonbreeding season. Theriogenology, 48, 1049-1059.
17. Kaymakçı, M., Aşkın,Y., 1997. Keçi yetiştiriciliği, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları.
18. Lebouf, B., Restall, B., Salamon, S., 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. Anim Reprod Sci 62, 113-141.
19. Mara, L., Dattena, M., Pilichi, S., Sanna, D., Branca, A., Cappai, P., 2007. Effect of different diluents on goat semen fertility. Animal Reprod.Sci., 102,152-157.
20. Maxwell, W.M.C., Salamon, S., 1993. Liquid storage semen: A review. Reprod Fertil Dev, 5, 613-618.
21. Memon, M.A., Bretzlaff, K.N., Ott, R.S., 1986. Comparison of semen collection techniques in goats. Theriogenology, 26, 823-827.
22. Miyamoto, A., Umezu, M., Hamano, K., Mass, A.K.I. J., 1987. Seasonal changes in inhibin activity in seminal plasma and serum concentrations of FSH, LH and testosterone in male goat (*Capra hircus*). Theriogenology, 28, 67-76.
23. Muduuli, S., Sanford, L.M., Palmer, W.M., Howland, B.E., 1979. Secretory patterns and circadian and seasonal changes in luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, prolactin and testosterone in male Pygmy goat. J.Anim Sci, 49, 543-553.
24. Nunes, J.F., Corteel, J.M., Combarnous,Y., Baril, G., 1982. Role of seminal plasma in the in vitro survival of goat sperm Reprod Nutr Dev, 22, 611-620. (abstract).
25. Özkoca, A., 1984. Çiftlik hayvanlarında reproduksiyon ve sun'î tohumlama, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları.

26. Pelletier, J., Cemineau, P., Delgadillo, J.A., 1988. Seasonality of sexual activity and its photoperiodic control in the adult ram he-goat. 11th Int Congr Anim Reprod AI, 211-219.
27. Pellicer-Rubio, M.T., Magallon, T., Combarous, Y., 1997. Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60-kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. *Biol Reprod*, 57, 1023-1031.
28. Pellicer-Rubio, M.T., Combarous, Y., 1998. Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60. *J Reprod Fertil*, 112, 95-105.
29. Purdy, P.H., 2006. A review on goat sperm cryopreservation, *Small Ruminant Res*, 63, 215-225.
30. Ritar, A.J., Salamon, S., 1982. Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. *Aust J Biol Sci*, 35, 305-312.
31. Ritar, A.J., Ball, P.D., O'May, J.O., 1990. Artificial insemination of Cashmere goats: effects on fertility and fecundity of intravaginal treatment, method and time of insemination, semen freezing process, number of motile spermatozoa and age of females. *Reprod Fertil Dev*, 2, 377-384.
32. Roy, A., 1957. Egg yolk coagulating enzyme in the semen and cowper's gland of the goat. *Nature*, 179, 318-319.
33. Sawyer, D.E., Brown, D.B., 1995. The use of an in vitro sperm activation assay to detect chemically induced damage of human sperm nuclei. *Reprod Toxicol*, 9, 351-357.
34. Singh, M.P., Sinha, A.K., Singh, B.K., 1995. Effects of cryoprotectants on certain seminal attributes and on the fertility of buck spermatozoa. *Theriogenology*, 43, 1047-1053.
35. Smith, A.H., Polge, C., 1950. Survival of spermatozoa at low temperatures. *Nature*, 166, 668-671.
36. Tuli, R.K., Holtz, W., 1995. Effect of season on the freezability of Boer goat semen in the northern temperate zone. *Theriogenology*, 43(8), 1359-1363.
37. Upreti, G.C., Hall, E.L., Koppens, D., Oliver, J.E., Vishwanath, R., 1999. Studies on the measurement of phospholipase A₂ (PLA₂) and PLA₂ inhibitor activities in ram semen. *Anim Reprod Sci*, 56, 107-121.
38. Ustuner B, Gunay U, Nur Z, 2009. Effect of seminal plasma, egg yolk and season on freezability of Saanen buck semen. *Bull Vet Inst Pulawy.*, 53,(Basimda).
39. Youngquist, R.S., 1997. Current therapy in large animal theriogenology, 1st Ed, Philadelphia, pp 481-499.