

Çeşitli Ekilibrasyon Süreleri ve Çözme Isılarının Donmuş Koç Spermatozoon'larının Motilitesi ve Akrozom Bozuklukları Üzerine Etkisi

Hazım GÖKÇEN *
Reşat N. AŞTI **
Mehmet KOZANDAĞI ***

Die Wirkungen von Unterschiedlichen Equilibrationszeiten und Auftautemperaturen über die Motilität und Akrosomschädigungen der Tiefgefrorenen Schafbockspermien

Zusammenfassung: In dieser Arbeit wurde untersucht, die Wirkungen der zwei- und dreistündigen Equilibrationszeiten und unterschiedlichen Auftautemperaturen auf das Einfrieren von Schafbocksamen, bzw. die Motilität und die Akrosomschädigungen der Spermien zu versuchen.

Die von 2 Merinoschafböcken gewonnene Ejakulate wurden mit Natrium citrate – Glucose – Eigelb Verdünner verdünnt. Der verdünnte Samen wurde nach zwei – und dreistündiger Equilibrationszeiten in Pailletten und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Der tiefgefrorene Samen wurde bei den drei verschiedenen Auftautemperaturen, bzw. 15 Sekunden bei 34°C, 10 Sekunden bei 50°C und 5 Sekunden bei 75°C aufgetaut. Die bessere Ergebnisse haben wir mit dem nach der dreistündiger Equilibration gefrorenen und 10 Sekunden bei 50°C aufgetauten Samen genommen. Allgemein kann gesagt werden, dass kurze Equilibrationszeiten und hohe Auftautemperaturen bessere Ergebnissen auf die Motilität und die Akrosomschädigungen von tiefgefrorenen Schafbockspermien ermittelt.

Özet: Bu çalışmada, iki ve üç saatlik ekilibrasyon süreleriyle, çeşitli çözme ısılarının donmuş koç spermatozoon'larının motilitesi ve akrozom bozuklukları üzeri-

* Doç. Dr.; U.Ü. Vet. Fak. Dölerme ve Sun'i Tohumlama Bilim Dalı, Bursa/TURKEY.

** Doç. Dr.; S.Ü. Vet. Fak. Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı, Konya/TURKEY.

*** Dr.; Tarım ve Orman Bakanlığı Vet. İş. Genel Müdürlüğü, Ankara/TURKEY.

ne etkisi araştırıldı.

İki Merinos koçundan alınan toplam 10 ejakülat, sodyum sitrat-glikoz-yumurta sarısı sulandırıcısı ile sulandırıldı; gliserolizasyon ve 2 ve 3 saatlik ekilibrazyondan sonra payetler içinde ve sıvı azot buharında dondurulup sıvı azot içinde saklandı. Dondurma işleminin ilk sulandırma, 5°C'ye soğutma, gliserolizasyon, 2 ve 3 saatlik ekilibrazyon evrelerinde, alınan sperma örneklerinde spermatozoon motilitesi ve Giemsa ile boyanmış preparatlarda akrozom bozuklukları oranları saptandı. Ayrıca, dondurulmuş ejakülatlar, 34°C de 15 saniyede, 50°C de 10 saniyede ve 75°C de 5 saniyede ilk su içerisinde çözülerek, donmadan sonraki spermatozoon motilitesi ve akrozom bozuklukları oranları bulundu.

Spermatozoon motilitesi ve akrozom bozuklukları bakımından en iyi sonuçlar, 3 saatlik ekilibrazyondan sonra dondurulup 50°C de 10 saniyede çözülen ejakülatlarda alındı. Elde edilen bilimsel verilerin ve ilgili araştırma sonuçlarının değerlendirilmesinden, kısa süreli ekilibrazyon ve yüksek ısıda kısa süreli çözmenin koç spermasının dondurulmasında daha iyi sonuçlar verdiği kanısına varıldı.

GİRİŞ

Koç spermasının düşük ısıda dondurulmasında ve dondurulan sperma ile yapılan tohumlamalardan elde edilen dölveriminde, çözümlenmesi gereken kimi önemli sorunların bulunduğu, yapılan çok çeşitli araştırmalar ve yayınlarla ortaya konmuş bulunmaktadır. Bu sorunların başlıcalarının donmuş koç spermatozoonlarının akrozomlarında oluşan morfolojik bozukluklarla, madde yitimleri ve bu spermatozoonlarla yapılan tohumlamalardan elde edilen dölverimi düşüklüğü olduğunu, daha önce yaptığımız araştırmalarda saptamıştık^{3,4}. Ayrıca, akrozom morfolojisindeki bozuklukların daha çok dondurma işleminin gliserolizasyon evresinden kaynaklandığını, spermatozoon motilitesinin ise spermanın dondurulup çözülmesinden sonra ani bir düşüş gösterdiğini de bildirmiştik⁴. Tüm bu araştırmaların devamı niteliğindeki bu çalışmada ise, 2 ve 3 saatlik ekilibrazyon süreleriyle, üç değişik çözme ısının koç spermasının dondurulması sürecinde, spermatozoonların motilitesi ve akrozom morfolojisi üzerine etkisini incelemeyi amaçladık.

Ekilibrazyon (Alışım) süresi dondurma sırasında spermatozoonların ortama katılan gliserole alışması için geçen süre olarak tanımlanır. Bu sürenin uzun ya da kısa olmasının dondurmanın başarısındaki rolü konusunda değişik çalışmalar yapılmıştır. Örneğin, Markovic⁸, ampullerde ve 6-14 saatlik ekilibrazyondan sonra dondurduğu koç spermatozoonlarında motilitenin, dondurulduktan sonra % 70'in üzerinde olduğunu bildirmektedir. Öte yandan Hill et al.⁶, yumurta sarısı-sitrat sulandırıcısı ile sulandırdıkları koç spermasını 0,5 ve 18 saatlik ekilibrazyon süreleri sonunda ampullerde dondurdular. En iyi motilite oranını 0,5 saatlik ekilibrazyon süresi sonunda elde ettiler. Lightfoot ve Salamon⁷, yaptıkları çeşitli araştırmalar sonucunda 4 saatten daha uzun ekilibrazyon süresinin, spermanın dondurulmasında hiç bir yarar sağlamadığı görüşüne vardılar. Aynı şekilde Zelfel ve Kautz¹⁷, koç spermasının dondurulmasında ekilibrazyon süresinin 5 saati aşmaması gerektiğini vurgulamaktadırlar. Araştırmacılar, 25 ve 28 saatlik ekilibrazyon süresi sonunda dondurdıkları koç spermasından çok kötü motilite ve dölverimi sonuçları aldıklarını bildirmektedirler. Buna karşılık, rafinoz-sodyum sitrat-yumurta sarısı-gliserin sulandırıcısı ile koç spermasını sulandırıp 1 ve 4 saatlik ekilibrazyon süreleri sonunda donduran

Hess et al. ⁵, spermanın çözülmesinden sonraki motilite oranları bakımından ekilibrasyon süreleri arasında bir fark bulunmadığını saptadılar. Samouilidis ¹⁴ ve Andersen et al. ², koç spermasının dondurulmasında en iyi sonuç veren ekilibrasyon süresinin 1 ya da 2 saat olduğu konusunda görüş birliği içerisindeyler. Sevinç et al. ¹⁵, üç ayrı sulandırıcı ile sulandırdıkları koç spermasında ekilibrasyondan sonraki motilite oranlarını 2 saatlik ekilibrasyonda ortalama % 31.16; 5 saatlik ekilibrasyonda ortalama % 27.22; 7 saatlik ekilibrasyonda da ortalama % 25.55 olarak saptamışlardır.

Dondurulmuş boğa ve koç spermaları, alan uygulamalarında tohumlamada kullanılmadan önce genellikle 34°C de 15 saniyede çözülmetedir. Oysa, bilimsel araştırmalarda koç spermasının çözülmesi konusunda çeşitli ısı dereceleri ve süreler denenmiştir. Örneğin, Meszaros ⁹, laktoz-yumurta sarısı-gliserin sulandırıcısı ile sulandırıp kısa süreli ekilibrasyondan sonra dondurduğu koç spermasını 40-45°C de çözmüş ve % 38 den % 45 e kadar varan motilite sonuçları elde etmiştir. Öte yandan Salamon ¹³, pellet biçiminde dondurduğu koç spermasını 45°C'de, 40°C'de, 30°C'de, 20°C'de, 15°C'de, 10°C'de ve 5°C'de çözdü; 45°C'de, 40°C'de ve 30°C'de çözülen spermaların en iyi motilite sonuçlarını verdiği buldu. Yine Neves ¹⁰, çözme ısısının motilite ve akrozom bozukluklarına etkisini saptamak amacıyla yaptığı çalışmada mini-tüp'te dondurduğu koç spermasını 70°C'de 8 saniyede ve 40°C'de 10 saniyede çözdü. Araştırmacı anılan özellikler bakımından en iyi sonuçları donmuş koç spermasını 70°C'de 8 saniyede çözdüğünde aldığı bildirmiştir. Aynı şekilde Roos et al. ¹², Mini-Tüp'te dondurulmuş boğa spermasının çözümünde en iyi motilite sonucunu % 55.5 ile 70°C'de 10 saniyede saptamışlardır. Norveç'te yapılan bir çalışmada ¹¹, Mini-Tüp'te dondurulan koç sperması 70°C'de 9 saniyede ve 35°C'de 10 saniyede çözülmüş, en iyi motilite ve dölverimi sonucu 70°C'de 9 saniyede çözüldüğünde alınmıştır. Tasseron et al. ¹⁶, gerek motilite, gerekse akrozom morfolojisi bakımından en iyi sonuçları 70°C de 15 saniyede çözdükleri pellet biçiminde dondurulmuş koç spermasında buldular. Andersen ve Aamdall ¹, ise 75°C'de 12 saniyede çözülen donmuş koç spermasında, 30°C'de 30 saniyede çözülen donmuş koç spermasına göre daha iyi motilite ve akrozom bozuklukları sonuçları elde edildiğini bildirmektedirler.

MATERYAL ve METOD

Lalahan Zootečni Araştırma Enstitüsündeki iki Merinos koçunun toplam 10 ejekülatı üzerinde çalışıldı.

Sperma, koçlardan sun'i vajenle alındı. Gerekli makroskopik ve mikroskopik muayeneleri yapılan ejekülatlar sodyum sitrat-glikoz-yumurta sarısı sulandırıcısının gliserol içermeyen birinci bölümü ile 1:5 oranında sulandırıldı. İlk sulandırması yapılan spermanın ısı 45 dakikada 5°C'ye düşürüldü ve bu ısıda, önceden hazırlanmış ve tüm sulandırıcıda % 5 bulunacak biçimde içine gliserol katılmış 2. sulandırıcı bölümüyle eşit oranda ve 30 dakikada azar azar karıştırıldı. Gliserolizasyonu tamamlanan ve payetlere çekilen spermanın bir bölümü 2 saat, diğer bölümü de 3 saat, 5°C'deki ılık suda ekilibrasyona bırakıldı. Bu süreler sonunda ekilibrasyonu tamamlanan sperma payetler içinde sıvı azot buharında dondurulup sıvı azotta saklandı.

Dondurulan sperma örnekleri 34° C'de 15 saniyede, 50° C'de 10 saniyede ve 75° C'de 5 saniyede ılık su içerisinde çözüldüler.

Dondurma işleminin ilk sulandırma, 5° C'deki ısıda gliserolizasyondan sonra, 2 ve 3 saatlik ekilibrazyondan sonra ve çeşitli ısılarda çözüldükten sonraki evrelerinde spermatozoit motilitesi ve akrozom bozuklukları oranları saptandı. Kullanılan ejakülatların ilk beşinde sadece motilite oranları; son beşinde de hem motilite oranları hem de akrozom bozuklukları oranları saptandı. Elde edilen bulgular tabloda topluca gösterildi.

BULGULAR

Araştırmada kullanılan koçların ejakülatlarında gerek dondurmanın ilk sulandırma, 5° C'ye soğutma ve gliserolizasyon evrelerinde, gerek 2 ve 3 saatlik ekilibrazyon sürelerinde, gerekse değişik çözme ısı ve sürelerinde saptanan spermatozoon motilitesi ve akrozom bozuklukları oranları Tablo: 1'de topluca verilmiştir.

Tablodanda izlenebileceği gibi, dondurma işleminin ilk sulandırma, 5° C'ye soğutma ve gliserolizasyondan sonraki evrelerinde genel ortalama motilite oranı değerleri sırasıyla % 82.0, % 76.0, % 68.5; akrozom bozuklukları oranı değerleri de sırasıyla % 3.1, % 7.3, % 14.3 olarak bulunmuştur. Ayrıca 2 saatlik ekilibrazyon süresinde motilite oranı ortalama % 65.0, akrozom bozuklukları oranı % 15.5; 3 saatlik ekilibrazyon süresinde ortalama motilite oranı % 75.5, ortalama akrozom bozuklukları oranı da % 14.5 olarak saptandı. Dondurma işleminin dondurup çözüldükten sonraki evresinde ortalama motilite oranları 34° C'de 15 saniyede 2 saatlik ekilibrazyonda % 33.5, 3 saatlik ekilibrazyonda % 41.0; 50° C'de 10 saniyede 2 saatlik ekilibrazyonda % 39.0, 3 saatlik ekilibrazyonda % 48.0; 75° C de 5 saniyede 2 saatlik ekilibrazyonda % 36.0, 3 saatlik ekilibrazyonda % 43.0 bulundu. Ortalama akrozom bozuklukları oranları ise 34° C de 15 saniyede çözmede, 2 saatlik ekilibrazyonda % 22.8, 3 saatlik ekilibrazyonda % 16.2; 50° C de 10 saniyede çözmede 2 saatlik ekilibrazyonda % 15.6, 3 saatlik ekilibrazyonda % 14.0; 75° C de 5 saniyede çözmede ise 2 saatlik ekilibrazyonda % 18.4, 3 saatlik ekilibrazyonda % 15.6 olarak saptandı.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Kullandığımız ejakülatlarda, dondurma işleminin ilk sulandırma, 5° C'ye soğutma, gliserolizasyon, 2 saatlik ekilibrazyon ve 3 saatlik ekilibrazyon evrelerinde ortalama spermatozoon motilitesi oranlarını sırasıyla % 82.0, % 76.0, % 68.5, % 65.5 ve % 75.5; ortalama akrozom bozuklukları oranlarını da sırasıyla % 3.1, % 7.3, % 14.3, % 15.5 ve % 14.5 olarak bulduk. Saptadığımız bu değerler, daha önce bu konuda yaptığımız araştırmalarda bulunan spermatozoon motilitesi ve akrozom bozuklukları değerlerine benzemektedir^{4.15}. İki saatlik ve üç saatlik ekilibrazyon süreleri sonunda bulunan spermatozoon motilitesi ve akrozom bozuklukları değerleri arasında, üç saatlik ekilibrazyon süresi lehinde ortaya çıkan % 10.5 ve % 1.0'lik farklar, özellikle spermatozoon motilitesi bakımından 3 saatlik ekilibrazyonun daha iyi

Tablo 1
Değişik Ekilibrasyon Süreleri Sonunda Dondurulup Farklı Isılarda Çözülen Koç Spermında, Dondurmanın Çeşitli Evrelerinde Saptanan Motilite ve Akrozom Bozuklukları Oranları

Ejek. Sayısı	İlk Sulandırma	+ 5° C de Gliserilizasyondan sonra						Ekilibrasyon																Dondurulup Çözüldükten Sonra											
		2 saat		3 saat		34° C de 15 san.				50° C de 10 san.				75° C de 5 san.																					
		Mot. (%)	Akr. (%)	Mot. (%)	Akr. (%)	Mot. (%)	Akr. (%)	Mot. (%)	Akr. (%)	Mot. (%)	Akr. (%)	Mot. (%)	Akr. (%)	Mot. (%)	Akr. (%)	Mot. (%)	Akr. (%)	Mot. (%)	Akr. (%)	Mot. (%)	Akr. (%)														
1	80	—	80	—	70	—	70	—	80	—	30	35	—	—	40	50	—	—	35	45	—	—													
2	75	—	60	—	70	—	50	—	70	—	35	40	—	—	35	40	—	—	40	40	—	—													
3	80	—	80	—	70	—	65	—	75	—	35	45	—	—	40	50	—	—	30	40	—	—													
4	80	—	75	—	70	—	60	—	70	—	50	50	—	—	45	50	—	—	40	45	—	—													
5	85	—	75	—	65	—	65	—	80	—	30	35	—	—	30	40	—	—	40	35	—	—													
6	85	3.0	70	3.9	60	13.6	60	13.0	80	90	30	40	21.0	15.0	50	60	17.0	15.0	30	40	17.0	21.0													
7	85	1.5	80	5.6	70	11.0	65	11.5	80	12.0	30	35	13.0	15.0	35	50	9.0	6.0	30	40	12.0	11.0													
8	85	4.0	80	11.0	70	23.0	70	18.0	75	27.0	35	40	29.0	16.0	35	40	16.0	22.0	40	40	26.0	17.0													
9	85	4.0	80	7.0	70	12.0	75	15.0	75	12.0	30	40	18.0	18.0	40	40	21.0	15.0	25	55	18.0	11.0													
10	85	3.0	80	9.0	75	12.0	70	18.0	70	12.0	30	50	21.0	17.0	40	50	15.0	12.0	50	50	19.0	18.0													
Ort.	82.0	3.17	6.0	7.36	8.5	14.3	65.0	15.5	75.5	14.5	33.5	41.0	22.8	16.2	39.0	48.0	15.6	14.0	36.0	43.0	18.4	15.6													

sonuç verdiğini, akrozom bozukluklarının aynı kaldığını göstermektedir. Ancak, spermatozoon motilitesini saptama yönteminin, değerlendirmeyi yapan kişiden kişiye değişiklik gösterebilen subjektif bir yöntem olması nedeniyle, bu konuda kesin bir yargıda bulunmak zordur. Ne var ki, gerek spermatozoon motilitesi, gerek akrozom bozuklukları bakımından elde edilen değerlerin her iki ekilibrasyon süresi sonunda da normal düzeyde bulunduğu söylenebilir.

İki ve üç saatlik ekilibrasyon süreleri sonunda dondurulan koç ejakülatları, 34°C de 15 saniyede, 50°C'de 10 saniyede, 75°C de 5 saniyede çözüldüler ve donmadan sonraki spermatozoon motilitesi ve akrozom bozuklukları oranları saptandı. Gerek spermatozoon motilitesi, gerek akrozom bozuklukları bakımından en iyi sonuçları 3 saatlik ekilibrasyondan sonra dondurulup 50°C de 10 saniyede çözülen ejakülatlarda aldık.

50°C de 10 saniyede çözülen ejakülatlarda 2 ve 3 saatlik ekilibrasyon süreleri sonunda saptanan % 39.0 ve % 48.0 lik spermatozoon motilitesi oranlarıyla, % 15.6 ve % 14.0 lük akrozom bozuklukları oranları, öteki ısı ve sürelerde çözülen ejakülatlarda saptanan değerlerden daha yüksek bulunmuştur. Aynı şekilde, 50°C de 10 saniyede çözülen donmuş koç spermalarında, 3 saatlik ekilibrasyondan sonra dondurulup çözülen ejakülatlarda saptanan spermatozoon motilitesi ve akrozom bozuklukları oranları, 2 saatlik ekilibrasyondan sonra dondurulup çözülen ejakülatlarda saptanan spermatozoon motilitesi ve akrozom bozuklukları oranlarından daha yüksek bulunmuştur.

Gerek çözme ısıları, gerek ekilibrasyon süreleri arasında spermatozoon motilitesi ve akrozom bozuklukları yönünden ortaya çıkan farklılıklar, az da olsa yine de önemli ve normal düzeyde sayılmalıdır. Nitekim, 50°C'de 10 saniyede 2 ve 3 saatlik ekilibrasyon sürelerinde elde ettiğimiz % 39.0 ve % 48.0'lik spermatozoon motilitesi sonuçları, Meszaros'un⁹ 40-45°C lik ısıda elde ettiği % 38.0-45.0'lik spermatozoon motilitesi sonucuna benzemektedir. Ayrıca, Salamon¹³ dondurmadan sonraki en iyi spermatozoon motilitesi sonuçlarını spermayı 45°C de çözdüğünde elde ettiğini bildirmektedir ki, bu da bizim elde ettiğimiz sonuca yakındır. Ancak Neves¹⁰, Roos et al.¹², Tasseran et al.¹⁶ ve Andersen ve Aamdall¹, 70-75°C de 9-12 saniyede çözülen donmuş koç ejakülatlarında en iyi sonuçları aldıklarını bildirmektedirler. Yine Norveç'te yapılan bir çalışmada da 70°C de 9 saniyede çözmenin spermatozoon motilitesi ve akrozom bozuklukları oranları bakımından daha iyi sonuç verdiği bulunmuştur. Bizim 50°C de 10 saniyede en iyi spermatozoon motilitesi sonuçları almamız karşısında, anılan araştırmacıların 70-75°C de 9-12 saniyede en iyi sonuçları almış olmaları çelişik gibi görünüyorsa da, 75°C de 5 saniyede çözülen koç spermalarından aldığımız spermatozoon motilitesi ve akrozom bozuklukları oranlarının, 50°C de 10 saniyede çözülenlerde aldıklarımızdan önemli ölçüde düşük bulunmaması durumu karşısında gerek bizim, gerek öteki araştırmacıların aldığı sonuçlar arasında benzerlik bulunduğu söylenebilir.

Her üç çözme ısısında da, 2 ve 3 saatlik ekilibrasyon süreleri sonunda saptadığımız spermatozoon motilitesi ve akrozom bozuklukları oranlarının, her ne kadar 3 saatlik ekilibrasyon süresi lehinde bir farklılık görünüyorsa da, önemli ölçüde değişik olmaması karşısında, öteki araştırmacıların^{2,5,6,7,8} 1-5 saatlik kısa süreli ekilibrasyondan sonra dondurdukları koç ejakülatlarında saptadıkları spermatozoon

motilitesi sonuçlarına benzerlik göstermesi de önemli bir bulgu olarak kabul edilebilir. Nitekim, Lightfoot ve Salamon ⁷, 4 saatten fazla ekilibrasyonun koç spermasının dondurulmasında hiçbir yarar sağlamayacağı görüşü yanında, Zelfel ve Kautz' da ¹⁷, koç spermasının dondurulmasında ekilibrasyon süresinin 5 saati aşmaması gerektiğini vurgulamaktadırlar. Aynı şekilde, Samouilidis ¹⁴ ve Andersen et al. ², koç spermasının dondurulmasında en iyi sonuç veren ekilibrasyon süresinin 1 ya da 2 saat olduğu konusunda görüş birliği içerisindedirler.

Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen bilimsel verilen ve yapılan tartışmaların ışığında, koç spermasının dondurulmasında kısa süreli ekilibrasyonun, dondurup çözdükten sonraki spermatozoon motilitesi ve akrozom bozuklukları bakımından daha iyi sonuç verdiği söylenebilir. Ayrıca, alan uygulamalarında rutin hale gelen, donmuş koç spermasının 34°C de 15 saniyede çözülmesi yerine, 50°C de 10 saniyede ve 75°C de 5 saniyede çözmenin de spermatozoon motilitesi ve akrozom bozuklukları yönünden aynı, hatta çoğu zaman daha da iyi sonuçlar verdiği, donmuş koç spermasının yüksek ısıda ve kısa sürede çözülmesinin anılan özellikler bakımından yararlı olabileceği, alan uygulamaları için de önerilebilir.

Ancak, bu çalışmaların spermatolojik özelliklerin araştırılması yanında, elde edilen bilimsel verilen dölverimine ne ölçüde yansıdığı saptanması amacıyla, kısa ekilibrasyon süreleri sonunda dondurulup yüksek ısıda kısa sürede çözülen koç spermalarıyla yapılacak tohumlamalardan sağlanacak gebelik oranlarının da, bundan sonraki çalışmalarda araştırılması yerinde olacaktır.

LİTERATÜR

1. ANDERSEN, K. and J. AAMDALL (1972): Artificial insemination with frozen semen in sheep in Norway. World Rev. Anim. Prod. 8, 77-79.
2. ANDERSEN, K., J. AAMDALL and J.A. FOUIGNER (1973): Intrauterine and deep-cervical insemination with frozen semen in sheep. Zuchthyg. 8, 113.
3. AŞTI, R. ve H. GÖKÇEN (1979): Sıvı azot buharında dondurmanın koç spermatozoolarının ince yapısı üzerine etkisi. A.Ü. Vet. Fak. Derg., Cilt: XXVII, No: 3-4, S. 30-39.
4. GÖKÇEN, H. ve R. AŞTI (1981): Sıvı azot buharında dondurma yönteminin çeşitli evrelerinde koç spermatozoitlerindeki akrozom bozukluklarının saptanması. A.Ü. Vet. Fak. Derg. Cilt: XXVII, Sayı: 3-4, S: 501-514.
5. HESS, R., W. SCHAEFER und W. BAUM (1967): Tiefkühlkonservierung von Schafback sperma unter Verwendung von flüssigem Stichstoff bei-196°C. Fortpflanzg. Haust. 3, 167.
6. HILL, J.R., W.C. GODLEY and V. HURST (1959): Effect of glycerol, equilibration time, glycerol level and rate of temperature descent on the freezing of ram spermatozoa. J. Anim. Sci. 18, 614.
7. LIGHTFOOT, R.J. and S. SALAMON (1969): Freezing ram semen by the pellet method. II. The effects of method of dilution rate, glycerol concentration and duration of storage at 5°C prior to freezing on survival of spermatozoa. Austr. J. Biol. Sci. 22, 1547.

8. MARKOVIC, B. (1955): Ernige Uuterlagen über die Konservierung und Tiefkühlung von Widdersperma. Ref: Wien. Tieraerztl. Mschr. 45, 48, 1958.
9. MESZAROS, S. (1968): Die künstliche Besamung bei Schafen in Ungarn. 18. lutern. Fachtagung für Künstl. Besamung der Havstieve, Welt/Oö.
10. NEVES, J.P. (1980): Untersuchungen zur Samen-übertragung beim Schaf unter besonderer Beruch-sichtigung der spermatiefgefrierkonservierung. Dissertation, Tieraerztliche Hochschule, Hannover.
11. OLAFSSON, T. (1980): Insemination of sheep with frozen semen. Zuchthyg., 15, 50-59.
12. ROOS, B., H. BADER, J. PFEILSTICKER und H. MARRE (1974): Untersuchungen zur Konfektionierung von Bullensperma in Minitüb-Röhrchen-Labor-und Feldversuche. Dtsch. Tieraerztl. Wochenschr. 81, 610-614.
13. SALAMON, S. (1968): Deep freezing of ram semen: Recovery of spermatozoa after pelleting and comparison with other methods of freezing. Austr. J. Biol. Sci. 21, 351-360.
14. SAMOUILIDIS, S. (1970): Ein Beitrag zur Tiefkühlkonservierung von Schaf- und Ziegenbochsamen mit Hilfe des Pellet-bzw. Paillettenverfahrens. Dissertation, Ludwig-Maximillian Universitaet, München.
15. SEVİNÇ, A., H. GÖKÇEN, K. ÇETİNKAYA ve O. YORUL (1978): Çeşitli sulandırıcılar ve ekilibrasyon süreleri kullanarak sıvı azotta dondurulan koç spermasının döverimi üzerinde araştırmalar Kesin Rapor, TÜBİTAK, Proje No: VHAG-384.
16. TASSERON, F., D. AMIR and H. SCHINDLER (1977): Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution, cooling and freezing. J. Reprod. Fertil. 51, 461-462.
17. ZELFEL, S. und M. KAUTZ (1965): Versuche zur Tiefkühlkonservierung von Schafbocksperma. Fortpfl. Haust. 2, 167.