

Dondurulmuş Köpek Spermasının Kullanım Avantajları ve Dezavantajları

Ülgen GÜNAY* M. Kemal SOYLU**

Geliş Tarihi: 18.11.1999

Özet: Köpek spermasının dondurulmasında etkili olan yöntemler köpek yetiştiriciliğinin temelini oluşturmuştur. Köpek spermasının dondurulmasında kullanılan metotlar ve etkileri kimi araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Spermanın uzun süreli saklanması derin dondurma yöntemi ile gerçekleştirilebilir. Spermanın dondurulması işleminde bir çok faktörün etkili olduğunu bildiren pek çok araştırmacı bu uygulamanın çok dikkat gerektirdiğini vurgulamışlardır. Dondurulmuş köpek spermasının kullanımının en büyük yararlarından birisi farklı ülkelerden köpek ırklarının yetiştirilebilme kolaylığıdır. Dondurulmuş spermanın bir avantajı da fazla sayıda damızlık köpeğin yetiştirilmesine gerek olmayışıdır.

Değerli genetik hatlar, dondurulmuş spermanın depolanması ile korunabilmektedir. Spermanın alınıp dondurulması ve depolanması ile arzu edilen bazı karakterleri taşıyan yeni nesiller üretmeye devam edilebilmektedir. Dondurulmuş spermanın diğer bir avantajı da köpeklerin seçilmiş eşleri ile çiftleşmek üzere yapacakları uzun yolculukların önüne geçilmesidir. Dondurulmuş spermanın dezavantajı ise pahalı ekipman gerektirmesidir. Dondurulmuş sperma zaman problemini ortadan kaldırmakta, sperma kullanılabilir mevcut halde bulunduğu andan istenildiği zamanda ve yerde kullanılabilir. Dondurulmuş-çözündürülmüş sperma genetik materyali korunmasından ve kullanılmaya hazır bulunmasından dolayı köpeklerde tohumlama amacıyla gittikçe artarak kullanılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Köpek, sperma, dondurma, avantaj, dezavantaj.

Advantages and Disadvantages of Use of Frozen Dog Semen

Summary: Methods being effective on dog semen freezing form basic principals in dog breeding. Methods and their effects used for dog semen freezing were investigated by some researchers. Many investigators reporting that a lot of factors affect semen freezing procedure have emphasized the importance of being very cautious. Semen can be stored by deep freezing for long period. One of biggest merit of use of frozen dog semen is to provide convenience for breeding dog races from different countries. Another advantage of using frozen dog semen is that it does not require lots of male dogs for breeding.

Valuable genetic lines can be saved by storing frozen dog semen. By taking, freezing and storing of semen, new offspring having some desired characteristics can be produced continuously. Another advantage of frozen semen is to prevent travel of dogs for breeding. However, disadvantage of semen freezing is require expensive equipments. Time is not a problem with frozen semen. By freezing, semen is available at any place when it is needed. Recently, because of saving genetic material and being available for use frozen-thawed semen has been used increasingly for artificial insemination in dogs.

Key Words: Dog, semen, freezing, advantage, disadvantage

Köpek yetiştiriciliği son yıllarda uluslararası bir hobi olarak güncellik kazanmaktadır. Pet sahiplerinin artışı ile belirli safkan ırklara olan talepler değişik ırktaki yavru köpek piyasasını

ortaya çıkarmış ve bu işi yapan yetiştiricilerin gelişimini desteklemiştir. İnsanlarda hobi olarak başlayan saf ve özel ırk köpek yetiştirme merakı bu alanda ekonomik kaynak yaratmaktadır. So-

* Araş. Gör. Dr.; U.Ü. Vet. Fak. Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, Bursa-Türkiye.

** Prof. Dr.; U.Ü. Vet. Fak. Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, Bursa-Türkiye.

nuçta köpek populasyonu artmakta ve bu hayvanların reproduktif fizyolojisinin ve endokrinolojisinin bilinmesi gereği ortaya çıkmaktadır. Üstün verim özelliklerine sahip köpeklerin spermalarının düşük ısı derecelerinde dondurulup uzun süre saklanması ve gereksinim duyulan bölgelere ulaştırılabilmesi ile bu köpeklerden daha geniş ölçüde yararlanılma olanağı sağlanmış olmaktadır¹.

İtalyan fizyolog Abbe L. Spallanzani'nin 1780 yılında köpeklerde ilk sun'i tohumlama çalışmalarına başlaması ile günümüze kadar bu konuda önemli gelişmeler kaydedilmiştir²⁻⁴. Araştırmacı erkek köpekten alınan spermanın dişiye verilmesi ile üç adet yavru elde etmiştir⁵⁻⁶. Köpek spermasının uzun süreli saklanabilmesi ve dondurulması ile ilgili ilk çalışmalar 1968 yılında ABD'nin Oregon Üniversitesi Tıp Okulunda başlamıştır. Dondurulmuş köpek spermasıyla ilk başarılı gebelik 1969 yılında Seager tarafından elde edilmiştir⁷⁻⁹.

Köpek spermasının dondurulmasında kullanılan metotlar ve etkileri kimi araştırmacılar tarafından incelenmiştir^{2,10-14}. Köpek spermasının gerek kısa süreli saklanmasında^{10,11}, gerekse dondurulmasında çeşitli sulandırıcılar kullanılmıştır^{1,15-17}. Köpek spermasının dondurulması dünyadaki en iyi köpeklerden genetik materyalin elde edilmesine olanak sağlamış ve köpek yetiştiriciliğinde yeni bir bölüm açılmıştır.

Silva ve Verstegen¹⁰, saklama ve dondurma yöntemlerini etkileyen faktörleri; sulandırıcının çeşidi, spermatozoa yoğunluğu, sulandırıcıya katılan kriyoprotektif ajanın uygunluğu, soğutma şekli, ekilibasyon zamanı ve oranı ile çözme ısı ve zamanı olarak bildirmişlerdir. Dondurma-çözme yöntemi spermada hasar oluşturmakta bununla beraber kısa süreli saklamaya tercih edilmekte çünkü spermatozoanın yaşam süresi daha uzun olmaktadır¹⁸.

Dondurulmuş köpek spermasının kullanımı Mayıs 1981'de ABD'de Amerikan Köpek Kulübü (American Kennel Club) tarafından uygun bulunmuş ve dondurulmuş spermayla tohumlanan dişilerden elde edilen yavrular bu kulübe şartlı olarak kabul edilmişlerdir. Bu durum dondurulmuş spermanın önemini daha da arttırmıştır^{1,6}. Yapılan çalışmaların ardından 1985 yılında ABD'de dokuz merkezde köpek sperma bankası kurulmuştur^{19,20}.

Yapılan çalışmalarda^{2,21,22}, köpek sperması yaklaşık 1ml.lik ampullerde, pellet şeklinde ya da

payetlerde dondurulmuştur. Payetlerin çeşit ve büyüklükleri uluslararası olup ya 0.25 ya da 0.5 ml.lik tipleri kullanılmaktadır. Günümüzde ise pellet şeklinde veya payetlerde dondurulmaktadır²³⁻²⁵. Linde-Forsberg²⁴, pellet yönteminin dezavantajlarına değinerek pelletlerin identifiye edilmesinin zor, yöntemin zaman alıcı olduğunu, Olar ve ark.¹² ise payet yönteminin identifikasyon, depolama ve çözme kolaylığı sağlamasından dolayı bu dondurma yönteminin tercih edildiğini ifade etmişlerdir. Christiansen²⁶, spermanın dondurulması yöntemi ile önemli derecede fertilité kaybı olmaksızın spermanın yıllarca depolanabilmesinin mümkün olacağını açıklamıştır. Feldman ve Nelson²¹, köpek spermasının çözüm sonrası motilitede önemsiz bir azalma ile 9 yıl depolanabileceğini belirtmişlerdir.

Dondurulmuş köpek spermasının kullanımının en büyük yararlarından birisi farklı ülkelerden köpek ırklarının yetiştirilebilme kolaylığıdır²⁷. Farklı ırk köpek spermalarının ithal edilmesi günümüzde bazı ırklarda yaygın olan kalıtsal defektleri azaltmada ve hatta eradike etmede yardımcı olmaktadır. Buna bağlı olarak dünya çapındaki uygun damızlık köpeklerin seçiminin potansiyel olarak yetiştiricilere kalıtsal hastalıkları elimine etmede şans tanyacağı bildirilmektedir^{19,21,27,28}.

Dondurulmuş spermanın bir avantajı da fazla sayıda damızlık köpeğin yetiştirilmesine gerek olmayışıdır. Böylece dondurulmuş sperma yetiştiricilerin parasını korumaktadır. Dondurulmuş sperma kullanımı hava ya da kara yoluyla nakledilen köpeklerde tehlikeyi, zaman kaybını ve harcanan parayı elimine eder. Ayrıca sperma dondurma merkezlerinde uzun yıllar ucuza korunabilmektedir^{6,19}. Bu yöntemin bir avantajı da, nakliye boyunca donmuş spermanın bozulma tehlikesinin en aza indirgenmesidir²⁴.

Değerli genetik hatlar, dondurulmuş spermanın depolanması ile korunabilmektedir^{19,29,30}. Spermanın alınıp dondurulması ve depolanması ile arzu edilen bazı karakterleri taşıyan yeni nesiller üretmeye devam edilebilmektedir. Ayrıca spermanın depolanması, damızlık bir erkek köpeğin zamansız ölümü ya da bir yetiştirme programı sırasında steril kalması veya olabilecek bir kazaya karşı spermanın korunmasını sağlamaktadır^{2,27}. Eğer köpek çiftleşmeyi engelleyecek bir kaza geçirirse, dondurulmuş sperma dişi bir köpek kızgınlık dönemine girdiğinde büyük değer taşır. Spermanın dondurulması, genital yolla bulaşan hastalıkların yayılmasının sınırlandırılması açısından da önemlidir²⁷.

Dondurulmuş spermanın diğer bir avantajı da dişi köpeklerin seçilmiş eşleri ile çiftleşmek üzere yapacakları uzun yolculukların önüne geçilmesidir. Yolculuk stresi ile fertilizasyon ve implantasyon işlemleri ciddi bir şekilde etkileneceğinden yolculuktan kaynaklanacak stres doğurganlık ve hatta pek çok çiftleşmede fertilitiyi tehlikeye sokacaktır. Böylece nakil sırasında stresten oluşan etkileri dişilerden elimine etmek mümkün olmamaktadır^{18,27}.

Günümüzde yavru köpeklerin çoğunluğu doğal çiftleşme sonucunda doğmaktadırlar. Östrustaki dişiler bazı ülkelerde hala şehirler arası nakledilmektedirler. Fakat bu işlem ne kolay ne de ucuz olmaktadır. Aynı zamanda hem güvenilir hem de hayvan taşıyan kargoya sahip hava yolu şirketinin bulunması problemi ile karşılaşmaktadır. Taşımadaki olası gecikmeden ve hayvanların uzun süre kapalı kalmalarından dolayı oluşan stresin dişilerin huzursuzlaşmasına ve kavrama yeteneğinin azalmasına neden olduğu bildirilmiştir³¹.

Dondurulmuş sperma kullanımında "progeny testing" e gerek vardır ki bu test, test edilmiş üstün ırklardan ticari hayvan yetiştiriciliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Süt sığırı yetiştiriciliğinde donmuş sperma kullanımında progeny testing üstün avantajlar sağlamaktadır. Sperma progeny testing periyodu boyunca veya önceden alınıp dondurulabilir. Çoğu boğa progeny testing sonuçlandığında 7-8 yaşına ulaşmış olur ki boğaları bu yaşta tabi tohumlama için uzun süre kullanılmak mümkün değildir. Bundan dolayı progeny testing yapılacak hayvandan sperma alınıp dondurulur. Progeny testing sonuçlandığında eğer boğa memnuniyet verici ise sperma ayrılır ve kullanılır. Eğer boğadan iyi sonuç alınmazsa sperma atılır. Böylece progeny testingi iyi sonuç veren bu boğalardan uygun yaşta alınan donmuş sperma sayesinde istediğimiz özellikteki bu boğalardan yararlanmak söz konusudur. Hızlı maturasyon oranı ve gebelik süresinin daha kısa olmasından dolayı köpekler sığırlar ile karşılaştırıldığında daha kısa periyotlarda progeny testinge tabi tutulabilirler. Fakat progeny test sonucunu istatistiksel olarak değerlendirebilmek için yeterli nesil genellikle bir köpeğin doğal damızlık yaşamı boyunca elde edilemediğinden köpeklerde progeny testing geniş bir kullanım alanı bulamamaktadır⁶.

Yetiştiriciler dondurulmuş spermayı tercih ettiklerinde gelecek problemleri göz önüne almamalıdır. Çünkü spermanın toplanma ve depolan-

ma maliyeti önemlidir. Bunun yanı sıra donmuş spermanın kullanımını takiben gebelik oranları düşmektedir¹⁹. Bir köpeğin sperma üretimi ırka, yaşa ve sağlık durumuna bağlı olarak değişiklik gösterir. Ayrıca bir köpeğin ne kadar sperma üreteceği ya da dondurma ve çözme yöntemleri sonrasında ne kadar spermatozoitin canlı kalacağını önceden saptamak olası değildir⁶. Taze sperma dişi genital kanalda 6-7 gün canlı kalabilmektedir. Dondurulmuş sperma çözüm sonrasında hızla ölebilmekte ve taze köpek sperması gibi uzun periyotlar canlı kalamamaktadır^{2,24}.

Günümüzde köpeklerdeki pek çok tohumlama taze sperma ile yapılmaktadır^{24,32}. Çünkü nakledilmesi ve tohumlama tekniği kolaydır. Dondurulmuş spermanın bir dezavantajı da tohumlama tekniği hem zordur hem de pahalı ekipman gerektirir^{1,33}. Tohumlama tekniği taze spermaya göre daha komplikedir ve gebelik oranları taze spermadan elde edilenler kadar iyi değildir. Dondurulmuş sperma ile yapılan tohumlamalarda genellikle düşük gebelik oranları alınmaktadır^{12,34,35}. Bununla beraber iyi sonuç veren yayınlarda bulunmaktadır^{8,15,26}.

Dondurulmuş-çözündürülmüş sperma genetik materyalin korunmasından ve kullanılmaya hazır bulunmasından dolayı köpeklerde tohumlama amacıyla gittikçe artarak kullanılmaktadır. Dondurulmuş-çözündürülmüş sperma ile tohumlamanın sonuçlarını; dişi köpeğin fertilitite durumu, spermatozoa kalitesi, dondurma tekniği, spermanın depolanma şartları ve tohumlama zamanı ve tekniği de etkilemektedir^{10,36,37}.

Avrupa'da taze spermanın avantajlarının donmuş spermadan daha iyi olduğu bildirilmiştir²³. Bunun yanı sıra dondurulmuş spermayla intrauterin tohumlamanın intravaginal tohumlamaya tercih edilmesi donmuş spermanın avantajını artırır. Nitekim, Fontbonne ve Badinand³⁴, intravaginal yaptıkları tohumlamalara oranla intrauterin tohumlamalardan daha yüksek oranda gebelik elde ettiklerini belirtmişlerdir. Linde-Forsberg²⁴, taze sperma ile yaptığı tohumlamayı takiben gebelik oranını % 83.8 olarak saptarken bu oran donmuş spermada % 69.3 olarak bulunduğunu ifade etmiştir. Guerin³⁸ ise gebelik oranını taze spermada %80, donmuş spermada %50 oranında saptadığını bildirmiştir.

Pek çok araştırmacı^{12,15,24}, köpeklerde donmuş-çözündürülmüş spermayla vaginal tohumlamayı takiben gebelik oranlarının düşük olduğu bildirilmektedirler. Dondurulmuş spermayla tohumlamayı takiben spermanın intrauterine depo-

lanmasının fertilitiyi arttırdığı görülmüştür^{2,24,34}. Dumon³⁹, gebelik oranını vaginal tohumlamada %80 bulurken intrauterin tohumlamada %65 olarak bulunduğunu belirtmiştir. Özellikle dondurulmuş sperma kullanılacağı zaman optimal tohumlama zamanı ile tohumlama dozunun bilinmesi gerekmektedir. Spermatozoanın kryopreservasyonu için yeni teknikler geliştirilmeli, amaç spermatozoada oluşan hasarı en aza indirmek ve canlı spermatozoa sayısını artıracak yöntemler geliştirmek olmalıdır⁴⁰.

Taze sperma kullanımının bir dezavantajı uygun zamanın dişiye göre ayarlanmak zorunda olması ve bu günün kararlaştırılmasında erkek ve dişinin sahiplerine ve veteriner hekime ihtiyaç duyulmasıdır. Dondurulmuş spermanın bir dezavantajı da sıvı azot konteynerlerinin ve spermanın hava ya da kara yoluyla naklinin pahalı olması ve genellikle sperma alıcılarının uzakta olmasıdır^{24,33}. Dondurulmuş spermanın diğer bir dezavantajı dondurma işlemi yapan az sayıda şirketin olmasıdır, ki buna karşın sayıları artmaktadır. Dondurma ve çözme işlemleri sonrasında sperma canlı olsa bile doğal çiftleşmedeki normal fertilitite garanti değildir²⁵.

Dondurulmuş spermanın avantajları arasında spermanın uygun olan zamanda nakledilebilmesi ve gerektiği zamanda kullanılabilmesi de yer alır²³. Bunun yanı sıra yavru elde etmek isteyen dişi köpek sahibinin tohumlama için veteriner hekimle ve spermanın toplanması için de erkek köpeğin sahibi ile bağlantı kurması gerekir. Oysa dondurulmuş sperma zaman problemini ortadan kaldırmakta, sperma kullanılabilir mevcut halde bulunduğu istenildiği zamanda ve yerde kullanılabilir³⁰. Ayrıca arzu edildiğinde fazla dozda spermanın bir transferde gönderilebilmesi maddi açıdan büyük yarar sağlamaktadır^{24,33}.

Sonuç olarak, dondurulmuş spermanın başlıca kullanım amaçlarını özetleyecek olursak;^{1,6,21,27-29},

- Arzu edilen genetik özelliklerin yayılmasını sağlamak,
- Araştırma gruplarında yer alan damızlık erkek köpeklerin sayısını azaltmak,
- Köpekler arasında çiftleşme ile bulaşan hastalıkları önlemek: Taze veya dondurulmuş sperma ile sun'i tohumlamada özellikle *Brucella canis* ve diğer enfeksiyöz hastalıkların artışından dolayı yetiştiriciler isteyebilmektedirler.
- Spermayı erkeğin üreme yaşamı dışında da koruyabilmek,

- Kalıtsal hastalıklar yönünden test edilmiş ve bu hastalığı taşımayan ırkların kullanımında yarar sağlamak,

- Spermanın çok uzak mesafelere naklini olası kılmak,

- Üstün genetik özelliklere sahip köpeklerin spermalarının hazır olarak elde var olması ile köpek ırklarının genetik ilerlemesine katkıda bulunabilmek: Böylece damızlık köpekler genlerini gelecek generasyonlara geçirebilecekler ve pek çok dişi köpek bu damızlık köpeklerin dondurulmuş spermaları ile tohumlanabilecektir.

- Dondurulmuş sperma ırkların üremesini kolaylaştırır ve artırır. Uygun çiftleşme, yetiştirme ve uygulamalar ırkların ıslahını temin edecektir.

- Dondurulmuş sperma, araştırmacılara potansiyel hayvan modellerinin depolanmasına olanak tanır. Bu durum, özellikle genetik araştırmalarda kullanılan büyük köpek gruplarında önem taşımaktadır.

Kaynaklar

1. NOTHLING, J.O.: Success with intravaginal insemination of frozen-thawed canine semen, W.S.A.V.A. X.I.X. World Congress, Durban, 612-613 (1994).
2. CONCANNON, P.W., BATTISTA, D.W.H.: Canine semen freezing and artificial insemination, Current Veterinary Therapy, Ed. KIRK, R.W., Small Animal Practice, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1247-1259 (1989).
3. YURDAYDIN, N., KOTZAB, E.: Köpek spermasının dondurulması üzerinde araştırmalar, A.Ü. Vet. Fak. Derg., 34:3, 534-540 (1987).
4. WATSON, P.F.: Artificial insemination and the preservation of semen, Marshall's Physiology of Reproduction, Volume 2, Reproduction In The Male, Fourth edition, Ede LAMMING, G.E., Churchill Livingstone, 769-811 (1990).
5. MICKELSEN, W.D., MEMON, M.A., ANDERSON, P.B., FREEMAN, D.A.: The relationship of semen quality to pregnancy rate and litter size following artificial insemination in the bitch, Theriogenology, 39:2, 553-560 (1993).
6. SEAGER, W.J., PLATZ, C.C.: Puppies from frozen semen. Purebred dog: A.K.C. Gazette, 98:6, 48-54 (1981).
7. BROWN, R.M.: An update of artificial insemination with fresh, chilled and frozen semen, Prob. in Vet. Med., 4:3, 445-452 (1992).

8. SEAGER, S.W.J., FLETCHER, W.S.: Progress on the use of frozen semen in the dog, *Vet. Rec.*, 92, 6-10 (1973).
9. SEAGER, S.W.J.: Freezing and transportation of dog semen, VIIIth Int. Congr. on Anim. Reprod. and Artif. Insem., Kracow, July 12-16, 223 (1976).
10. SILVA, L.D.M., VERSTEGEN, J.P.: Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa, *Theriogenology*, 44:4, 571-579 (1995).
11. SAINZ, J.J., JOSA, A., ESPINOSA, E., NINO-JESUS, A., GIL, L., MUNOZ, I., ETXEGARAY, A.: Refrigeracion del semen de perro: Temperature y tiempos de supervivencia y activacion, *Publicacoes do 5o Simp.Int. de Reprod. Anim.*, September, Luso, 2, 481-487 (1993).
12. OLAR, T.T., BOWEN, R.A., PICKETT, B.W.: Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on postthaw motility of canine spermatozoa frozen in straws, *Theriogenology*, 31:2, 451-461 (1989).
13. PENA, A.J., BARRIO, F., QUINTELA, L.A., HERRADON, P.G.: Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog semen longevity and acrosomal integrity, *Theriogenology*, 50:1, 163-174 (1998).
14. KIM-B.J., KIM- Y.J.: Studies on artificial insemination with canine semen frozen using methanol and preserved in liquid nitrogen, *Korean J. of Vet. Clin. Med.*, 12:2, 207-214 (1995).
15. NOTHLING, J.O., VOLKMANN, D.H.: Effect of addition of autologous prostatic fluid on the fertility of frozen-thawed dog semen after intravaginal insemination, *J. Reprod. Fert., Suppl.*, 47: 329-333 (1993).
16. FARSTAD, W., BERG, A.K.: Factors influencing the success rate of artificial insemination with frozen semen in the dog, *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 39: 289-292 (1989).
17. ROTA, A., STROM, B., LINDE-FORSBERG, C., RODRIQUEZ-MARTINEZ, H.: Effects of Equex-STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C, *Theriogenology*, 47:555, 1093-1101 (1997).
18. ENGLAND, G.C.W., PONZIO, P.: Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen, *Theriogenology*, 46: 165-171 (1996).
19. BUCKRELL, B.: The use of frozen semen from dogs in Canada, *Can. Vet. J.*, 27: 161-163 (1986).
20. STOCKNER, P.K.: Status of canine frozen semen industry, *Mod. Vet Pract*, 66:2, 98-100 (1985).
21. FELDMAN, E.C., NELSON, R.W.: Disorders of canine male reproductive tract, *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*, Ed. Feldman, E.C., Nelson, R.W., W.B.Saunders Company, Philadelphia, 481-524 (1987).
22. IVANOVA-KICHEVA, M.G., BABADOV, N., SOMLEV, B.: Cryopreservation of canine semen in pellets and in 5 ml aluminium tubes using three extenders, *Theriogenology*, 48:8, 1343-1348 (1997).
23. LINDE-FORSBERG, C.: Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen, *Small Anim. Pract.*, 21:3, 467-485 (1991).
24. LINDE-FORSBERG, C.: Artificial insemination with fresh, chilled extended and frozen-thawed semen in the dog, *Sem.Vet. Med.Surg. (Small Anim.)*, 10:1, 48-58 (1995).
25. YU-XUELI, PANG, Y., LI, YINGHUA., YU-X.L., PANG, Y.Z., LI, Y.H., WANG, Z.B.: Study on freezing canine pellet semen by the new method of frying in liquid nitrogen, *Chin. J. of Vet. Sci.*, 17:3, 289-291 (1997).
26. CHRISTIANSEN, I.B.J.: Reproduction in the Dog and Cat, Bailliere Tindall, London, 115-123 (1984).
27. MORTON, D.B.: Review on the use of frozen semen in dog breeding, *Animal Technology*, 37:1, 67-71 (1985).
28. SEAGER, S.W.J.: Semen collection and evaluation in the dog, *Current Therapy in Theriogenology 2*, Ed. MORROW, D.A., W.B. Saunders Company, Philadelphia, 539-541 (1986).
29. ENGLAND, G.C.W., VERSTEGEN, J.P.: Radiographic contrast medium for uterine insemination in the bitch and its effect upon the quality and fertility of fresh dog semen, *Theriogenology*, 46: 1241-1243 (1996).
30. RAVASZOVÁ, O., MESÁROS, P., CÍGÁNKOVÁ, V., LUKACINOVÁ, M.: A study of the properties of dog ejaculate during long-term storage, *Folia Vet.*, 40:3-4, 95-99 (1996).
31. PRISCILLA, K., STOCKNER, M.S.: Status of the canine frozen semen industry, *Mod. Vet. Pract.*, 66:2, 98-101 (1985).
32. TSUTSUI, T., TEZUKA, T., SHIMIZU, T., MURAO, I., KAWAKAMI, E., OGASA, A.: Artificial insemination with fresh semen in Beagle bitches, *Jpn. J. Vet. Sci.*, 50:1, 193-198 (1988).
33. LINDE-FORSBERG, C.: Artificial insemination in the dog, *W.S.A.V.A. XIXth World Congress*, Durban, 606-611 (1994).
34. FONTBONNE, A., BADINAND, F.: Canine artificial insemination with frozen semen: Comparison of intravaginal and intrauterine deposition of semen, *J. Reprod. Fert.*, 47: 325-327 (1993).
35. GUERIN, C.: Artificial insemination in dogs, *Summa*, 15:2, 9-18 (1998).

36. THOMAS, P.G.A., LARSEN, R.E., BURNS, J.M., HAHN, C.N.: Comparison of three packaging techniques using two extenders for the cryopreservation of canine semen, *Theriogenology*, 40:6, 1199-1205 (1993).
37. ROTA, A., INGUER-OUADA, M., VERSTEGEN, J., LINDE-FORSBERG, C.: Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a Tris-extender with or without Equex STM Paste, *Theriogenology*, 51, 1045-1058 (1999).
38. GUERIN, C.: Artificial insemination in canine species, *Point-Vet.*, 28:185, 1631-1640 (1997).
39. DUMON, C.: Artificial insemination: Interest and performance in canine practice, XVII. W.S.A.V.A. World Congress, Durban, 1411-1417 (1994).
40. STROM, B., ROTA, A., LINDE-FORSBERG, C.: In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation, *Theriogenology*, 48:2, 247-256 (1997).