



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOĞUM VE JİNEKOLOJİ
ANABİLİM DALI

SÜTÇÜ DÜVELERDE CİNSİYETİ BELİRLENMİŞ SPERMA İLE
ÖSTRUS BAŞLANGICINI TAKİBEN FARKLI SAATLERDE
TOHURLAMANIN GEBELİK ORANI ÜZERİNE ETKİSİ

BARIŞ GÜNER
(DOKTORA TEZİ)

BURSA-2019



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOĞUM VE JİNEKOLOJİ
ANABİLİM DALI

SÜTÇÜ DÜVELERDE CİNSİYETİ BELİRLENMİŞ SPERMA İLE
ÖSTRUS BAŞLANGICINI TAKİBEN FARKLI SAATLERDE
TOHURLAMANIN GEBELİK ORANI ÜZERİNE ETKİSİ

BARIŞ GÜNER

(DOKTORA TEZİ)

DANIŞMAN:

Prof. Dr. Ahmet GÜMEN

BURSA-2019

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum

“SÜTÇÜ DÜVELERDE CİNSİYETİ BELİRLENMİŞ SPERMA İLE ÖSTRUS BAŞLANGICINI TAKİBEN FARKLI SAATLERDE TOHURLAMANIN GEBELİK ORANI ÜZERİNE ETKİSİ” adlı çalışmamın proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.








Barış GÜNER

Tarih ve İmza

30.01.2019

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Barış Güner tarafından hazırlanan “Sütçü Düvelerde Cinsiyeti Belirlenmiş Sperma ile Östrus Başlangıcını Takiben Farklı Saatlerde Yapılan Tohumlamanın Gebelik Oranı Üzerine Etkisi” konulu Doktora tezi 28.01.2019 günü 11:00-12:45 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği/~~oy çokluğu~~ ile kabul edilmiştir.

	<u>Adı-Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Tez Danışmanı	Prof. Dr. Ahmet GÜMEN	
Üye	Prof. Dr. Dursun Ali DİNÇ	
Üye	Prof. Dr. Şükrü Metin PANCARCI	
Üye	Doç. Dr. Abdülkadir ORMAN	
Üye	Doç. Dr. Gülnaz MECİTOĞLU	

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı toplantısında alınannumaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ali AYDOĞDU

Enstitü Müdürü



ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ ÇALIŞMASININ YAZIM KURALLARINA UYGUNLUĞU FORMU

Adı Soyadı / No	Bariş Güner / 611344001
Anabilim Dalı / Bilim Dalı	Doğum Ve Jinekoloji / Klinik Bilimler
Programı (35.madde veya ÖYP ise belirtilecek)	<input type="checkbox"/> Yüksek Lisans <input type="checkbox"/> Lisans Sonrası Doktora <input checked="" type="checkbox"/> Doktora <input type="checkbox"/> 35.madde <input type="checkbox"/> ÖYP

Tezin Başlığı/Adı	Türkçe	Sütçü Düvelerde Cinsiyeti Belirlenmiş Sperma İle Östrus Başlangıcını Takiben Farklı Saatlerde Tohumlamamanın Gebelik Oranı Üzerine Etkisi
	İngilizce	The Effect Of Insemination Time With Sex-Sorted Semen After Onset Of Estrus On Conception Rate In Dairy Heifers
Tezin Konusu	Sütçü Düvelerde Cinsiyeti Belirlenmiş Sperma ile Kızgınlık Başlangıcını Takiben Optimum Tohumlama Zamanının Belirlenmesi	

Kriter	Tez Kısımları ve Yazım Kuralları	Uygun	Uygun Değil
Format	• Belirli tür ve boyuttaki harflerde uyum	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	• Tablo ve şekil yazıları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	• Metin başlıkları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	• İçindekiler	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	• Kaynakça	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	• Ekler	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Numaralama	• Tablo ve şekil numaraları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	• Metin bölümleri	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	• Ekler	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Doğruluk	• Yöntem	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	• Veriler	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	• İstatistik	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	• Dipnotlar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	• Kaynakça	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	• Şekiller	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dil	• İfadelerin doğru kullanılıp kullanılmadığı	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	• İfadelerin çok sık kullanılıp kullanılmadığı	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fiil Zamanları	• Cümlelerdeki zamanların kontrolü	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
İmla Kuralları	• Tüm noktalama işaretlerinin kontrolü	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Plan	• Metnin bütünlüğü	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	• Bölümlerin dağılımı ve dengesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kısaltmalar	• Gerçekten gerekli mi?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	• İlk okunduğunda açıkça anlaşılıyor mu?	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tablo ve Şekiller	• Tablo ve şekil üzerindeki yazıların metinle tutarlılıkları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Tez çalışmasının, Tez Yazım Yönergesindeki kurallara uygun olarak yazıldığını taahhüt ederim.

Danışman
(Unvan, Ad Soyad, Tarih, İmza)
Prof. Dr. Ahmet Günen

İÇİNDEKİLER

Dış Kapak	
İç Kapak	
ETİK BEYAN.....	II
KABUL ONAY.....	III
TEZ KONTROL BEYAN FORMU.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
TÜRKÇE ÖZET.....	VIII
İNGİLİZCE ÖZET.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. İneklerde Seksüel Siklus.....	3
2.1.1. Foliküler Gelişim.....	6
2.1.2. Foliküler Faz.....	9
2.1.3. Luteal Faz.....	10
2.2. Düve ve İneklerin Seksüel Siklusu Arasındaki Farklılıklar.....	14
2.3. Östrusun Dış Belirtileri.....	17
2.3.1. Östrusun Primer Bulgusu.....	17
2.3.2. Östrusun Sekonder Bulguları.....	18
2.4. Östrus Tespiti.....	19
2.5. Östrus Tespit Metotları.....	20
2.5.1. Gözlem Yoluyla Östrus Tespiti.....	20
2.5.2. Kuyruk Boyama Yöntemi.....	20
2.5.3. Yapıştırma Bant (Kamar®).....	21
2.5.4. Elektronik Atlama Dedektörleri.....	21
2.5.5. Pedometre.....	22
2.5.6. Aktivite-Ruminasyon Takip Sistemi.....	23
2.5.7. Hormonal Ölçümler.....	24
2.5.8. Vajinal Mukus Direnci Elektriksel İletkenlik.....	25

2.5.9. Süt Verimi Ölçümü.....	25
2.5.10. Vücut Sıcaklığı Ölçümü.....	26
2.5.11. Arayıcı Boğa.....	26
2.5.12. Kayıt Tutma.....	27
2.6. Cinsiyeti Belirlenmiş Spermanın Tarihi.....	28
2.7. Flow Sitometrik Yöntem.....	30
2.8. Cinsiyeti Belirlenmiş Spermanın Önemi.....	33
2.9. Cinsiyeti Belirlenmiş Sperma İle Tohumlama Sonrası Gebelik Oranları...34	
2.10. Cinsiyeti Belirlenmiş Spermada Gebelik Oranlarını Etkileyen Faktörler.37	
2.10.1. Flow Sitometri ile Ayırıştırma Süreci.....	38
2.10.2. Sperma Konsantrasyonu.....	38
2.10.3. Düve veya İneklerde Kullanımı.....	39
2.10.4. Tohumlama Sayısı.....	41
2.10.5. Tohumlama Protokolü.....	41
2.10.6. Boğanın Fertilitesi.....	43
2.10.7. Tohumlama Yeri.....	44
2.10.8. Graaf Folikül Çapı.....	44
2.10.9. Embriyonik ölüm.....	46
2.10.10. Sıcaklık stresi	47
2.10.11. Tohumlayıcı etkisi	48
2.10.12. Tohumlama Zamanı	49
2.11. Cinsiyeti Belirlenmiş Sperma ve Konvansiyonel Sperma ile Tohumlama Sonrası Doğan Buzağuların Karşılaştırılması.....	52
2.12. Yeni Teknoloji İle Cinsiyeti Belirlenmiş Sperma ve Yapılan Çalışmalar...53	
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	55
3.1. Hayvan Materyali, Barındırma ve Besleme.....	55
3.2. Östrus Takip Sistemi.....	56
3.3. Deneme Grupları.....	58
3.4. Ultrasonografik muayeneler.....	59
3.5. İstatistik Analizler.....	61

4. BULGULAR.....	62
4.1. Genel Sonuçlar.....	62
4.2. Genel Gebelik Oranı ve Gebelik Kaybı Oranı.....	63
4.3. Deneme Gruplarında Gebelik Oranları.....	63
4.4. Östrus Gösterme Süresinin Gebelik Oranı Üzerine Etkisi.....	63
4.5. Deneme Gruplarında Östrus-Tohumlama ve Tohumlama-Ovulasyon Arası Süreler.....	64
4.6. Maksimum Östrus İndeksinin Gebelik Oranı Üzerine Etkisi.....	65
4.7. Graaf Folikül Çapının Gebelik Oranı Üzerine Etkisi.....	67
4.8. Boğa Etkisinin Değerlendirilmesi.....	68
4.9. Tohumlayıcıların Gebelik Oranı Üzerine Etkisi.....	68
4.10. Sıcaklık Stresinin Gebelik Oranı Üzerine Etkisi.....	69
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	70
6. KAYNAKLAR.....	81
7. SİMGELER ve KISALTMALAR.....	110
8. EKLER.....	111
9. TEŞEKKÜR.....	114
10. ÖZGEÇMİŞ.....	115

ÖZET

Bu çalışmada düvelerde cinsiyeti belirlenmiş sperma (CBS) ile östrus başlangıcını takiben farklı zamanlarda tohumlamanın gebelik oranı üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlandı. Çalışmada 299 adet 13 aylık ve üzeri Holstein ırkı düve kullanıldı. Çalışmaya hem östrus indüksiyonu/senkronizasyonu (tek doz PGF_{2α}) sonrası hem de doğal östrusa gelen düveler dahil edildi. Düvelerin östrus takibi aktivite-geviş ölçer sistemi (SCR Dataflow II) ile yapıldı. Östrusları tespit edilen düveler rastlantısal olarak üç gruba ayrıldı; Grup1 (n=100) östrus başlangıcından itibaren 12-16. saatler, Grup2 (n=100) 16,1-20. saatler, Grup3 (n=99) ise 20,1-24. saatler arasında üç farklı boğaya ait CBS ile tohumlandı. Düvelere 30±3 ve 60±3 günlerde olmak üzere ultrasonografi ile iki kez gebelik muayenesi yapıldı. Sıcaklık stresini değerlendirmek amacıyla Sıcaklık-Nem İndeksi (SNİ) kullanıldı. İstatistiki değerlendirmeler SPSS paket programı kullanılarak yapıldı. Birinci gebelik muayenesinde Grup1’de %49,0 (49/100); Grup2’de %49,0 (49/100) ve Grup3’de %58,6 (58/99) gebelik oranı tespit edildi. Gruplar arasında istatistiki fark belirlenemezken, Grup3’te diğer gruplara göre yaklaşık %10’luk sayısal bir farklılık belirlendi. İkinci gebelik muayenesinde (Grup1’de %49,0; Grup2’de %47,0 ve Grup3’de, %55,6) gruplar arası fark saptanamadı. Kullanılan spermalar karşılaştırıldığında C boğasına ait sperma ile (%65,6) diğer iki boğaya ait spermalara (A boğası sperması %41,4; B boğası sperması %49,5) göre daha fazla ($p<0,02$) gebelik elde edildi. Tohumlama günü SNİ’nin 72’nin üzerinde (%50,0) ve altında (%52,5) olması durumunda gebelik oranının değişmediği belirlendi. Sonuç olarak, boğalar arasında fertilitate farkının olduğu ve sütçü düvelerde CBS ile östrus başlangıcından 20,1-24 saat sonra (Grup3) yapılan tohumlamanın gebelik oranını yaklaşık %10 arttırdığı ancak gruplar arasında istatistiki farkın olmadığı saptandı.

Anahtar Kelimeler: Düve, Cinsiyeti Belirlenmiş Sperma, Gebelik Oranı, Tohumlama Zamanı

ABSTRACT

The Effect of Insemination Time with Sex-Sorted Semen after Onset of Estrus on Conception Rate in Dairy Heifers

The aim of this study was to determine the insemination time after to obtain the optimum conception rate with sex-sorted semen in dairy heifers. The study was carried out with nulliparous thirteen months or over aged Holstein heifers (n=299). Heifers were included in the study after estrus induction (single dose PGF_{2α}) and natural estrus. Estrous detection was followed by the activity-rumination (SCR Dataflow II) system. Heifers were randomly divided into three groups after estrous detection. Heifers inseminated with sex-sorted semen from three different bulls between 12-16 hours, 16,1-20 hours and 20,1-24 hours after the onset of estrus in Group1 (n = 100), Group2 (n = 100) and Group3 (n = 99), respectively. At 30 ± 3 and 60 ± 3 days, pregnancy examination was performed using ultrasonography. Temperature-Humidity Index (THI) was used to evaluate the heat stress. Statistical evaluations were performed using SPSS package program. In the first pregnancy examination, conception rates were 49.0% (49/100); 49.0% (49/100) and 58.6% (58/99) in groups. While there was no statistical difference between the groups, there was about 10% difference in Group3 compared to other groups. Conception rates were 49.0% (49/100) in Group1; 47.0% (47/100) in Group2; 55.6% (55/99) in Group3 in the second pregnancy examination. When the sperm of the bull's C where compared, conception rate was higher in Bull C (65.6%) than other two bulls (Bull A 41.4%; Bull B 49.5%). It was determined that the conception rate didn't change if the THI was over 72 (50.0%) and below (52.5%). As a result, it was determined that there was a difference in fertility between the bulls. Although the insemination with sex-sorted semen between 20,1 and 24 hours after the initiation of estrus (Group3) increased the conception rate about 10%, there was no statistical difference between the groups in dairy heifers.

Key words: Heifers, Sexed Semen, Conception Rate, Timing of Insemination

1. GİRİŞ

Hem dünyada hem de ülkemizde hayvancılık işletmelerinin karşılaştığı en büyük problemlerden birisi, sürüden gönüllü veya gönülsüz/zorunlu çıkarılan hayvanların yerine konulacak olan damızlık hayvan teminidir (sürü yenileme). Bu sorun büyümek isteyen işletmelerde daha da önem arz etmektedir. Özellikle sütçü işletmelerde sürüye damızlık olarak katılacak düveler, işletmelere yem giderinden sonra ikinci en büyük maliyeti oluşturmaktadır. Ülkemizde kendi damızlık ihtiyacımızın karşılanmasındaki sıkıntıdan dolayı son zamanlarda bu ihtiyaç, yurtdışından damızlık düve ithal edilerek karşılanmaya çalışılmaktadır. Bu çözüm yolu ülke hayvancılığının geleceği açısından tehlikeli bir duruma yol açarak hayvancılık sektörünün dışa bağımlılığını giderek artıracaktır. Dolayısıyla işletmelerin hızlı ve etkili bir şekilde dişi buzağı sayısını artırması bu bağımlılığı azaltma yollarından birisidir (Baran, 2016).

Son zamanlarda gelişen teknolojiyle birlikte spermada cinsiyet ayrıştırılması yapılabilmekte ve bu sayede istenilen cinsiyette yavrular elde edilebilmektedir. Spermada cinsiyet, flow sitometri yöntemi ile X ve Y kromozomun DNA yoğunluk farkına göre ayrıştırılmaktadır. Cinsiyeti belirlenmiş sperma (CBS) ile tohumlama sonrası elde edilen gebeliklerden doğan buzağılardan %90'dan fazlası dişi olmaktadır (Seidel, 2007). Sütçü işletmeler için dişi buzağılar ekonomik olarak önemli olmasının yanı sıra işletmenin geleceği bu buzağılara bağlıdır. Dolayısıyla bu teknoloji sayesinde CBS özellikle genetik kapasitesi yüksek damızlıklardan dişi buzağı elde etme fırsatı sunmasının yanında dişi gen kaynağını çoğaltarak işletmenin kendi kapasitesini kendi artırabilmesi, yeni hayvan girişiyle gelen hastalıkların önüne geçilmesi gibi birçok avantajı beraberinde getirmektedir (De Vries ve ark., 2008; Hohenboken, 1999; Holden ve Butler, 2018; Seidel ve Garner, 2002). CBS'nin maliyetinin yüksek olması ve gebelik oranlarının konvansiyonel spermaya göre düşük olması tüm bu avantajları beraberinde getiren teknolojinin kullanımını kısıtlamaktadır (McCulloch ve ark., 2013). Maliyetin artmasına ayrıştırmaya giren spermaların düşük oranının ticarileşebilmesi neden olurken, birçok

araştırmacı CBS ile elde edilen gebelik oranını konvansiyonel spermayla karşılaştırdığında daha düşük saptamış ve sebeplerini araştırarak bu düşük gebelik oranını artırmaya çalışmışlardır (Kurykin ve ark., 2007; Mellado ve ark., 2014; Noonan ve ark., 2016; S Filho ve ark., 2010).

Düvelerin gebelik oranları ineklere göre daha yüksek olduğu için CBS'nin düvelerde kullanımı daha yaygın olmakta ve daha karlı bulunmaktadır (Norman ve ark., 2010). Buna rağmen düvelerde de CBS kullanımı sonrasında konvansiyonel spermaya göre elde edilen gebelik oranları düşük tespit edilmiştir (Mallory ve ark., 2013; Noonan ve ark., 2016). CBS ile tohumlamayı takiben gebelik oranlarının düşük olmasının sebepleri arasında; flow sitometri yönteminde spermanın ayrıştırma sürecinde sperm fonksiyonlarının değiştiği, spermada kapasitasyon benzeri değişikliklerin olduğu ve kapasitasyonun başlaması gösterilmektedir (Schenk ve ark., 2009; Vazquez ve ark., 2003). Aynı zamanda CBS'nin dişi genital kanalda yaşama ömrü kısaltmakta ve fertilizasyon yeteneği de azalmaktadır (Kurykin, 2017; Mocé ve ark., 2006; Peippo ve ark., 2009). Dolayısıyla CBS ile tohumlama zamanı kritik öneme sahiptir (Colazo ve Mapletoft, 2017; Hall ve ark., 2017). CBS'nin ayrıştırma teknolojisinde yapılan yenilikler ve standardizasyonlar sonrası (SexedULTRA teknolojisi) CBS ile elde edilen gebelik oranlarının arttığı ve konvansiyonel sperma ile aradaki gebelik oranı farkının azaldığı bildirilmesine rağmen (Lenz ve ark., 2016; Vishwanath, 2014), güncel çalışmalarda gebelik oranlarının artırılmasında özellikle tohumlama zamanının önemi vurgulanmaya devam etmektedir (Crites ve ark., 2018; Vishwanath ve Moreno, 2018). Bununla birlikte CBS'nin östrus tespiti sonrasında kullanılması önerilmesine rağmen tohumlama zamanının fertilité üzerine etkisini gösteren çalışmalar sınırlı kalmaktadır (Bombardelli ve ark., 2016; S Filho ve ark., 2010). Dolayısıyla sütçü düvelerde ayrıştırma teknolojisindeki revizyon ve standardizasyon sonrasında ayrıştırılmış CBS ile östrus tespitini takiben tohumlama zamanını araştıran çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

Sunulan tezin amacı Holstein düvelerde yeni teknoloji sonrası ayrıştırılmış CBS ile östrus başlangıcından sonraki farklı saatlerde tohumlamanın gebelik oranı üzerine etkisi araştırmaktır. Çalışma sonucunda CBS ile ideal tohumlama zamanının belirlenmesi ve dolayısıyla optimum gebelik oranının ortaya konması hedeflenmiştir.

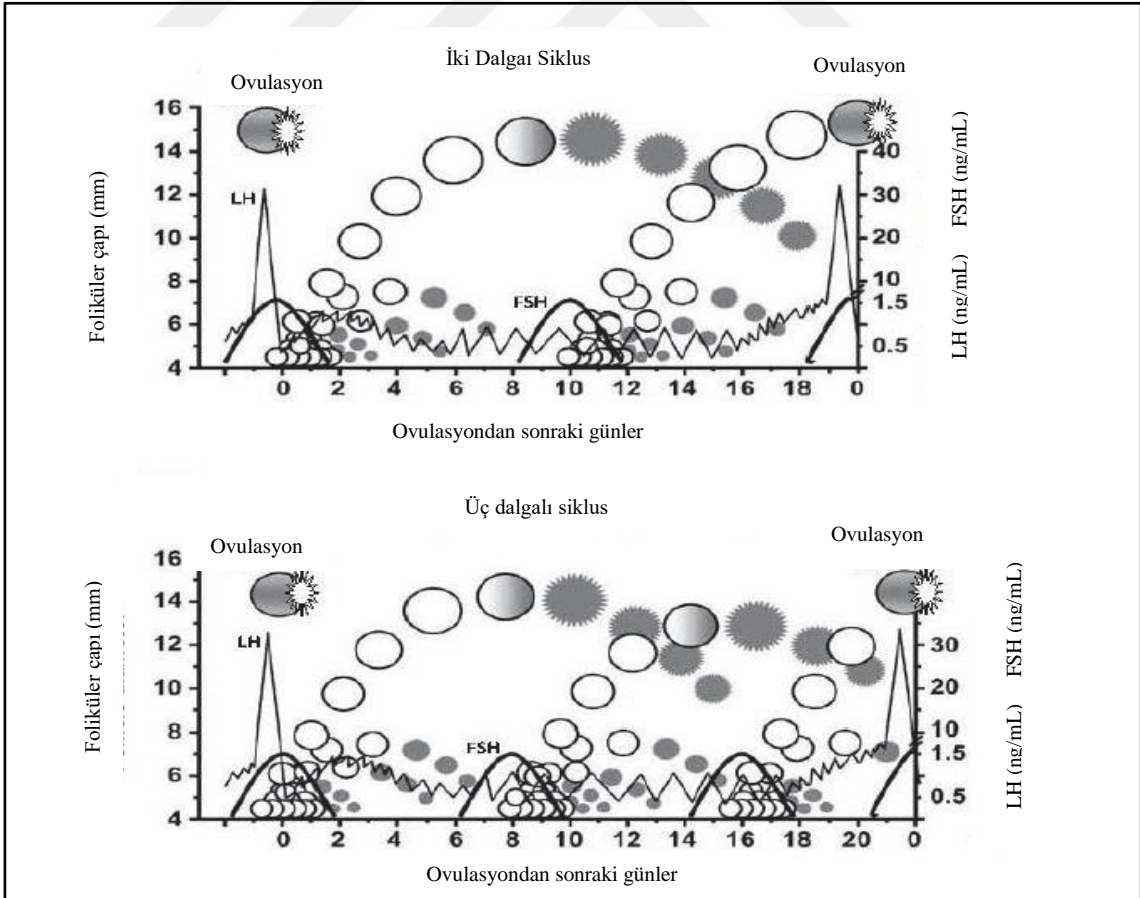
2. GENEL BİLGİLER

2.1. İneklerde Seksüel Siklus

Ultrasonografinin kullanımı yaygınlaşmadan önce; sığırlarda follikül gelişimini incelemek amacıyla gonadotropik ve steroid hormonların konsantrasyon ölçümleri, kesime sevk edilmiş hayvanların ovaryumlarındaki foliküllerin değerlendirilmesi, foliküler gelişimin laparotomi sonrasında gözlemlenmesi ve rektal palpasyonla foliküler gelişimin belirlenmesi gibi doğrudan veya dolaylı birkaç yöntem kullanılmıştır (Fortune ve ark., 1988; Hanzen ve ark., 2000). Yapılan bu çalışmalar sonrasında ineklerdeki foliküler dalgaların süresi ve sayısı ile ilgili farklı iddialar ortaya atılmıştır. Bazı araştırmacılar ineklerde üç ardışık foliküler gelişimin olduğunu ve ilk ikisinin regrese olup üçüncüsünün ovulasyonla sonuçlandığını savunmuştur (Ireland ve Roche, 1987). Diğer taraftan bazı araştırmacılar ise iki ardışık foliküler gelişimin varlığını iddia etmiştir (Rajakoski, 1960; Swanson ve ark., 1972). Bununla birlikte foliküler gelişimin devam eden bir süreç olduğunu belirten çalışmalar bulunmaktadır (Donaldson ve Hansel, 1968; Spicer ve Echternkamp, 1986). Transrektal ultrasonografinin gelişmesiyle birlikte foliküler dalga ve foliküler gelişim ayrıntılı bir şekilde ortaya konmuş ve ineklerdeki foliküler gelişimin farklı ve sürekli bir döngü olduğu ortaya konmuştur (Fortune ve ark., 1988; Ginther, 2016; Pierson ve Ginther, 1988).

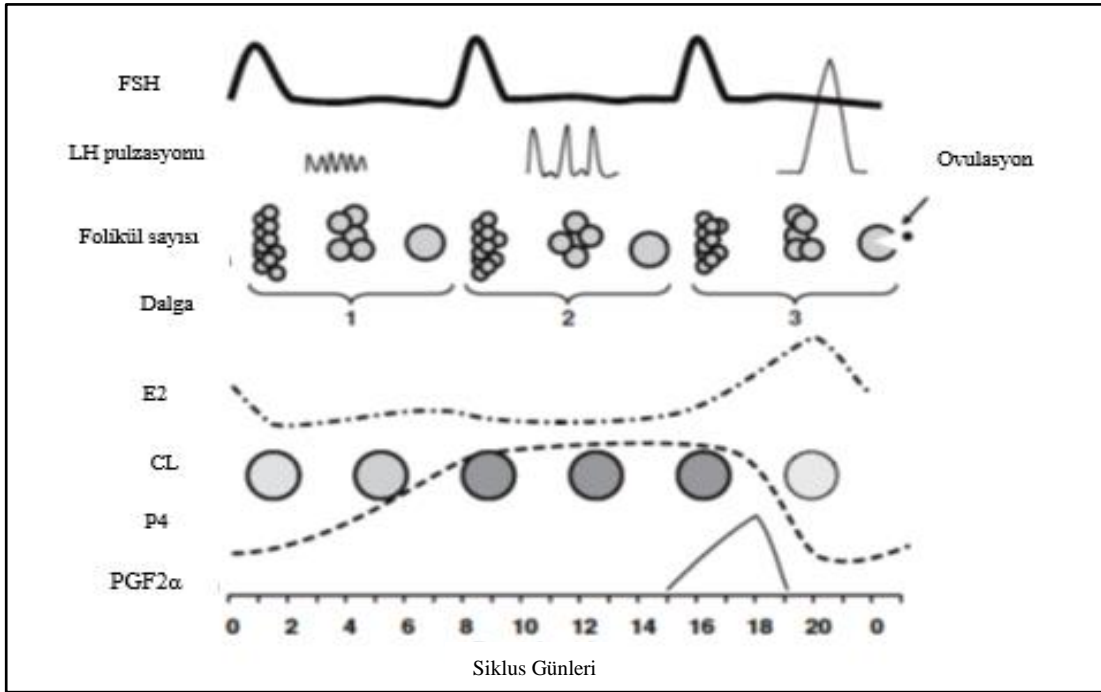
İneklerde östrus siklusu boyunca folikül gelişim dalga modeli ile (Şekil 1) açıklanmaktadır (Ginther ve ark., 1989). İneklerin çoğunda (%95) bir siklusta iki veya üç foliküler dalga görülürken bir veya dört dalgalı siklus %5 oranında görülmektedir (De Rensis ve Peters, 1999). Bazı çalışmalarda siklusun (>%80) iki dalgalı olduğu belirlenirken (Ginther ve ark., 1989; Rajamahendran ve Taylor, 1990), diğer çalışmalarda ise siklusun üç foliküler dalgadan oluştuğu saptanmıştır (Celik ve ark., 2005; Sirois ve Fortune, 1988). İlk foliküler dalga, ovulasyon günü (0. gün) ortaya çıkar dolayısıyla ilk dalganın çıkış zamanı bakımından iki veya üç foliküler dalgalı siklus arasında fark yoktur. İki foliküler dalgalı siklusta, ikinci dalga siklusun 9-10. günde başlarken; üç foliküler

dalgalı sıklısta ikinci dalga 8-9. günde, üçüncü dalga ise 15-16. günde başlamaktadır (De Rensis ve Peters, 1999; Mapletoft ve ark., 2002). Sığırlarda foliküler dalga ve gelişim, ırk, yaş, laktasyon sayısı gibi bazı faktörler tarafından etkilenmektedir. Örneğin *Bos taurus* ineklerde yaş ve ırkın foliküler dalga üzerine etkili olmadığı tespit edilmemesine rağmen (Adams ve ark., 2008); *Bos indicus* ineklerde laktasyon sayısının foliküler dalga sayısını etkilediği ortaya konulmuştur (Figueiredo ve ark., 1997). Nelore ırkı düvelerin %65'inde siklus boyunca üç foliküler dalga görülürken, ineklerin %83'ünde iki foliküler dalga saptanmıştır (Figueiredo ve ark., 1997). Bununla birlikte Holstein ırkı düveler ve inekler arasında foliküler dalga sayısı bakımından fark bulunmamıştır (Sartori ve ark., 2004; Wolfenson ve ark., 2004). Nelore ve Holstein ırkı arasındaki farklılığın *Bos indicus* ve *Bos taurus* arasındaki genetik farklılıktan, çevresel ve beslenme faktörlerinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Boland ve ark., 2001).



Şekil 1. İneklerde iki ve üç foliküler dalgalı sıklısta FSH ve LH hormon döngüsü ve ovaryum foliküler dinamiği (Adams ve ark., 2008)

Östrus siklusu, hipotalamus (GnRH; gonadotropin salınım hormonu), ön hipofiz bezi (FSH; folikül stimüle edici hormon, LH; lüteinleştirici hormon), ovaryumlar (progesteron, östradiol, inhibin) ve uterus ($PGF_{2\alpha}$) arasındaki karşılıklı hormon etkileşimleri tarafından kontrol edilmektedir (Şekil 2). Bu hormonlar östrus siklusunu pozitif veya negatif geri bildirim mekanizmalarıyla yönetirler. Sütçü düvelerde östrus siklusu ortalama 20 gün, sütçü ineklerde ise 21 gün sürmekle birlikte 18-24 gün aralığındadır. Östrus siklus süresi, siklus boyunca şekillenen foliküler dalga sayısına göre belirlenmektedir (Rathbone ve ark., 1998). Holstein ırkı düvelerde iki ovulasyon arası süre $22,0 \pm 0,4$ gün belirlenirken, ineklerde bu süre $22,9 \pm 0,7$ gün tespit edilmiştir (Sartori ve ark., 2004). Yine aynı ırkta yapılan başka bir çalışmada ise düvelerdeki östrus siklusu ($22,0 \pm 0,4$ gün) ineklerden ($24,6 \pm 0,6$ gün) 2,6 gün daha kısa tespit edilmiştir (Wolfenson ve ark., 2004).



Şekil 2. İneklerde östrus siklusunun hormonal kontrolü (Garnsworthy ve ark., 2008)

2.1.1. Foliküler Gelişim

Folikülogenezis, primordiyal foliküllerden oluşan havuzdan bir grup folikülün gelişmesini takiben, bir folikülün seçilerek büyümesi ve graff (olgun, preovulatör) folikül oluşumuna kadar geçen süreç olarak tanımlanmaktadır (Spicer ve Echtenkamp, 1986). Bir grup (4-6 adet) folikülün aynı anda gelişmeye başlaması foliküler gelişim dalgası (foliküler dalga) olarak tanımlanır. Bu foliküllere aday veya yaşıtlı foliküller denir. Gelişimin ileri aşamalarında aday folikül grubundan bir tanesi gelişerek seçilmiş folikül haline gelir. Diğerlerinin gelişimi durur (subordinat folikül) ve takiben regrese olurlar (ilk atrezia). Seçilmiş folikülün gelişimi hızlanarak dominant folikül olur (deviasyon). Siklusun dönemine göre (anovulatör dalga ise) dominant folikül regrese olur (ikinci atrezia), ovulasyon dalga ise graaf folikülü haline dönüşüp ovulasyona gider (Stevenson ve Phatak 2004).

Fötal gelişim boyunca folikül havuzunda belirli sayıda primordiyal folikül vardır. İneğin reproduktif yaşamı boyunca folikül gelişimi sürekli devam ettiğinden ovulasyon şansı bulamayan çoğu folikül atreziye olmaktadır (Fortune, 1993; Webb ve ark., 2004). Gelişen çoğu folikül atreziye olduğundan sadece birkaç folikül (<0,1) ovulasyon şansı yakalayabilir (Webb ve ark., 2003). Ruminantlarda primordiyal folikül aşamasından ovulasyon folikül aşamasına geçiş süreci yaklaşık 4-6 ay sürmekte, bu zamanın çoğu (3-4 ay) pre-antral gelişim aşamasında geçmektedir (Campbell ve ark., 2000; Webb ve ark., 2004). Antral folikül gelişiminin büyüme evresi ise iki aşamada ele alınmaktadır. Öncelikle 300 µm'deki antrum (boşluk) oluşumundan 3-5 mm çapında küçük folikül evresini kapsayan yavaş bir büyüme evresi olan ilk evredir. Bu evre 30 günden daha fazla zaman almaktadır. Beş-yedi gün süren ikinci hızlı büyüme evresi; foliküler dalganın ortaya çıkışını, foliküler büyümeyi, dominant folikülün seçilmesini, değişken dominantlık aşamasını ve bu aşamaları takiben ovulasyon veya regresyon aşamasını kapsamaktadır. Bu ikinci evre bir folikül dalgası olarak tanımlanmaktadır (Lussier ve ark., 1987). Bununla birlikte foliküler gelişim süreci 3 aşamada değerlendirilmektedir. Bu süreç; a) gonadotropik uyarımla gelişen pre-antral foliküllerin büyümeye devam etmesi (recruitment: ön seçim), b) foliküllerin büyümeye devam etmesi için ovulasyona ulaşma potansiyeli olan bir folikülün belirlenmesi (seleksiyon) ve bu folikülün atrezia olmasının

engellenmesi (ilk atreziadan kurtulması), c) seçilmiş folikülün gelişiminin hızlanmasıyla dominant folikül olması ve sonrasında siklusun dönemine göre ovulasyon dalgası ise graaf folikülün ovulasyonu aşamalarını kapsamaktadır (Lucy ve ark., 1992). FSH konsantrasyonlarındaki artışla sırasıyla gelişen ve atreziye uğrayan dalgalar şekillenir ve son dalga siklusun dönemine ve hormonal duruma göre ovulasyonla sonuçlanır (Aerts ve Bols, 2010). Her dalgada ortalama 4 mm çapında 3-5 adet folikül, 6-8 mm çapına kadar gelişir. Bir folikülün seçilmesinin ardından büyümeye devam etmesi siklusun dönemine göre ya atreziye ya da son dalgada ise ovulasyonla sonuçlanır (Webb ve ark., 2003). Foliküler gelişim bir dönem gonadotropin hormonlarından bağımsız devam ederken bir sonraki dönemde gonadotropin bağımlı hale gelir (Webb ve ark., 2004). Her dalgada foliküler gelişim boyunca 1-2 gün süren bir FSH artışı olur (Webb ve ark., 2003). FSH bağımlılığı, grup halindeki 5-20 adet folikülün 4-5 mm çapına eşit veya büyük olduğunda ortaya çıkar (Driancourt, 2001; Forde ve ark., 2011). Bu durum, folikül dalgasının 3. gününe kadar foliküllerin granuloza hücrelerindeki FSH reseptörlerinin (FSH-R) varlığı ile foliküllerin FSH bağımlılığının başlangıcını işaret etmektedir (Evans ve Fortune, 1997). Foliküller büyüdükçe; östradiol 17β , insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), aktivin, folistatin ve inhibin sentezleme yeteneğine sahip olurlar. Bu sayede foliküllerin çap olarak dominantlığı artık yerini fonksiyonel dominantlığa bırakır. Foliküler gelişim boyunca folistatin aktivine bağlanır, aktivin / inhibin dengesinin inhibin lehine değişmesine neden olur, FSH aynı zamanda IGF bağlayıcı proteinlerin (IGFBP) üretimini azaltır. IGF ve FSH, aromataz aktivitesi ile östradiol- 17β üretimini artırır. İnhibin ve östradiol- 17β konsantrasyonlarında artış, FSH konsantrasyonunu düşürerek foliküler gelişim sürecini sonlandırmaktadır. Normal olarak sadece 8 mm çapında bir folikül granuloza hücrelerinde LH reseptörleri sentezleyebilir. Bu ilk folikül, değişen hormonal ortamda LH yardımıyla gelişmeye devam eder ve dominant folikül haline gelir (Driancourt, 2001). Tüm foliküller dominantlık için uygun olmasına rağmen, dominant folikül ve subordinat foliküller arasında fark bulunmaktadır. Seçilen dominant folikül FSH'dan bağımsızdır ve dominant folikül seleksiyon aşamasında en yakın rakibi olan subordinat folikülün/foliküllerin büyümesini önler (Ginther ve ark., 1999; Ginther ve ark., 2000). Deviasyon zamanı; ardışık muayeneler sonucunda dominant folikül ile subordinat

folikülün maksimum çapları arasındaki (büyüme hızlarında) en büyük fark olarak tanımlanır. Deviasyon ve seçim aslında eş anlamlıdır. Deviasyonun başlangıcında dominant folikülün çapı ortalama 8,5 mm ve en büyük subordinat folikülün çapı ortalama 7,2 mm'dir (Ginther ve ark., 1996). İnekler her ne kadar tek ovulasyon yapan türler olsa da nadiren iki veya daha fazla folikül dominant olabilir ve bu olaya eş dominantlık olarak adlandırılmaktadır (Acosta ve ark., 2005; Beg ve ark., 2003; Kulick ve ark., 2001; Lopez ve ark., 2005). Eş dominant foliküllerin geliştiği foliküler dalgalarda 4 mm'den büyük folikül sayısı fazladır ancak folikülün çıkışından deviasyona kadar geçen süre ve deviasyon başlangıcındaki iki folikülün çapları benzerdir. Eş dominant foliküller genellikle çoklu ovulasyon ile, bazen de tekli ovulasyon ile sonuçlanabilir (Acosta ve ark., 2005). Eş dominantlıkta, birinci dominant folikül 8,5 mm çapa ulaşmasıyla birlikte üçüncü en büyük folikülün büyümesi azaldığında ilk deviasyon şekillenir. Eş dominant foliküller arasında ikinci deviasyon, ilk deviasyondan 36-50 saat sonra şekillenmektedir (Beg ve ark., 2003). Seçim bitiminde, bir folikül daha fazla oranda büyüme oranına sahip olması nedeniyle geriye kalan subordinat foliküllere göre deviasyona uğramaktadır (Ireland ve ark., 2000). FSH, aday dominant folikülde IGFBP-4 ve IGFBP-5'in proteaz aktivitesini uyarır ve foliküler sıvı içinde daha fazla serbest IGF-I konsantrasyonu artışına neden olur. Aynı zamanda IGF-I, hücre büyümesini ve östradiol sentezini de uyarır (Ireland ve ark., 2000; Lucy, 2007a; Rivera ve Fortune, 2003). Dominant folikülün steroidojenik aktivitesini etkileyen IGFBP metabolizması subordinat foliküle göre farklıdır (Canty ve ark., 2006). Dominant folikülde, subordinat foliküle göre IGF-I / IGFBP oranı daha fazladır. Bu oransal değişime bağlı olarak foliküler büyüme ve atrezi süreci düzenlenir (Ireland ve ark., 2000). IGF-I ve FSH, östradiol sentezini uyarmak için bu folikülde sinerjik olarak hareket ederler (Lucy, 2007a). Bu sinerjik etki, dominant hale gelecek olan folikülün sıvısında, subordinat foliküller ile karşılaştırıldığında, iki kat daha fazla östradiol ve on kat daha az IGFBP-4'ün üretimine neden olur (Mihm ve ark., 2000).

Granuloza hücrelerindeki LH-R'nin artışı, FSH'den LH'ye bağımlılık geçişine neden olur ve dominant folikülün LH salınımına bağlı olarak farklılaşmasını ve büyümesini sağlamaktadır (Fortune ve ark., 2001). Dominant folikül FSH hormonunun ana baskılayıcısıdır (Ginther ve ark., 1997). LH reseptörlerindeki artan ekspresyona ek

olarak FSH sekresyonundaki azalmadan sonra dominantlık ve devam eden foliküler büyüme steroidojenik enzimlerin üretiminin artmasıyla olmaktadır. Östradiol granuloza ve teka hücrelerinde daha fazla LH-R'nin sahip olmasını sağlar (Ireland ve ark., 2000). Dominant follikülün başlıca fonksiyonları oosit beslenmesi ve hormon sentezidir (Lucy, 2007a). Teka hücrelerinde üretilen androjenlerin seviyesi LH, inhibin ve IGF'ye bağlı olarak artmaktadır. Dominantlık aşaması süresince, dominant folikül büyümeye devam ederken, oositin fertilize olabilmesi için hem nükleer hem de sitoplazmik olgunlaşması gerekmektedir (Driancourt, 2001). Büyüyen dominant folikülden östradiol üretimi ve salınımı artar ve östradiol hipotalamustan GnRH ve dolayısıyla hipofizden LH salınımını tetikler (Fortune, 1994). Bu olay foliküler gelişim üzerine hem lokal etkiye hem de hipotalamus-ön hipofiz üzerine pozitif geri bildirim ile LH üretiminde artışa neden olur. Bu artış hayvanda psişik değişikliklere neden olur ve davranışsal östrusu uyarır. Aynı zamanda artan LH dalgası sonucunda ovulasyon şekillenir (Aerts ve Bols, 2010).

Östrus siklusu, ovaryum üzerindeki dominant yapının östradiol veya progesteron gibi hormonlarının varlığına bağlı olarak foliküler ve luteal faz olmak üzere iki önemli bölümden ve toplamda dört evreden oluşmaktadır. Foliküler faz proöstrus ve östrus, luteal faz metöstrus ve diöstrus evresinden oluşmaktadır. Foliküler fazda ovaryum üzerindeki primer yapı östradiol üreten dominant foliküldür ve bu faz siklus uzunluğunun %20'si kadardır. Siklus uzunluğunun %80'i kadar olan luteal fazda ise dominant yapı progesteron üreten korpus luteumdur. Bu faz ovulasyon zamanı ile korpus luteumun regresyonu arasındaki süreyi kapsamaktadır (Senger, 2003).

2.1.2. Foliküler Faz

Foliküler faz, korpus luteumun luteolizisini takiben progesteron hormonundan östradiol hormonunun baskınlığına geçişin 4 ile 6 günlük dönemini kapsar ve bu dönem östrus siklusunun proöstrus ve östrus dönemleri olarak adlandırılır. Proöstrus evresi; korpus luteumun hem fonksiyonel (progesteron üretiminde azalma) hem de yapısal (luteal dokuların dejenerasyonu ve hücre ölümü) olarak regresyonu ile başlar. Preovulatör dominant folikül tarafından östradiolün sentezindeki önemli artış, çiftleşmeyi kabule neden olmaktadır (McCracken ve ark., 1999; Wettemann ve ark., 1972). Luteolizis

başlangıcından ovulasyondan önceki güne kadar serum östradiol konsantrasyonu yaklaşık 3 kat artar (~2,5 pg/mL–7,9 pg/mL). Ovulasyon öncesinde maksimum serum östradiol konsantrasyonu sütçü düvelerde (11,3 pg/mL) sütçü ineklerden (7,9 pg/mL) daha yüksek saptanmıştır (Sartori ve ark., 2004). Laktasyondaki ineklerde graaf folikül çapı düvelerdeki folikül çapından daha büyük olmasına rağmen kandaki östradiol miktarı düşüktür (Lucy, 2007b). Kanda eş zamanlı olarak östradiol konsantrasyonunun artışı ve progesteron konsantrasyonunun düşmesi östrusun davranışsal belirtilerinin ortaya çıkmasına neden olur. Siklusun östrus evresi; seksüel belirtilerin (östrusun iç ve dış belirtilerinin) başlamasından graaf folikülün ovulasyonuna kadar geçen süreyi kapsamaktadır (Peter ve ark., 2009). Östrus foliküler fazın ikinci evresidir, seksüel kabul veya dişinin erkeği kabul ettiği dönem olarak adlandırılmaktadır. Preovulatör folikülden salınan östradiol hormonunun kandaki konsantrasyonu arttıkça hareket ve aktivitenin artması, böğürme, koklama, sinirlilik, çara akıntısı, atlama davranışı, atlamaya izin verme, vulva dudaklarında ödem, iştahta ve süt veriminde azalma gibi fizyolojik değişimler daha da artmaktadır (Nebel, 2003; Senger, 2003). Östrus süresi genellikle 10-18 bildirilmesine rağmen yüksek süt veriminin bu sürenin azalmasına sebep olabildiği (Wiltbank ve ark., 2012), aynı zamanda atlama başına toplam sürenin kısaldığı, serum östradiol konsantrasyonunun daha düşük bulunduğu saptanmıştır (Cerri ve ark., 2011; Lopez ve ark., 2004). Yapılan başka bir çalışmada düvelerdeki östrus süresi (12-14 saat) ineklerden (8,1 saat) daha uzun saptanmıştır (Souza ve ark., 2007).

2.1.3. Luteal Faz

Luteal faz, graaf folikülün ovulasyonu ile başlayıp korpus luteumun önemli konsantrasyonda progesteron hormonu salgıladığı, metöstrus ve diöstrus evrelerinin olduğu 14-18 gün süren dönemdir (Peter ve ark., 2009). Dominant folikülün büyümeye devam etmesi ve kanda artan östradiol GnRH salınım frekansını artışına neden olarak LH salınımı uyarılır (Fortune, 1994). LH preovulatör folikülün teka ve granuloza hücrelerinde lüteinizasyonu uyaran ana luteotrofik hormondur (Alila ve Hansel, 1984). Preovulatör LH dalgası preovulatör folikülün teka interna ve granuloza hücrelerinde ovulasyon sonrası hücrel farklılaşmayı (küçük ve büyük hücrelere) artıran bir dizi morfolojik ve

biyokimyasal değişikliklere neden olur. Bu süreç luteinizasyon olarak adlandırılmaktadır (Berisha ve Schams, 2005). Luteinizasyon, östradiol üretiminin azalması ve progesteron üretiminin artması ile karakterizedir. Bunun nedeni, P450c17 ve P450aromataz gibi progesteronun östradiole dönüştürülmesinden sorumlu olan enzimlerin üretiminin durdurulmasıdır (Juengel ve Niswender, 1999). Luteal doku büyümesi ve gelişmesi yeni kan damarlarının gelişmesine (anjyogenezis) bağlıdır (Berisha ve Schams, 2005). Ovaryum kan akışı ovulasyondan kısa bir süre sonra azalır, fakat anjiogenezis ile birlikte 2-5 gün içerisinde CL büyüme hızına paralel olarak aşamalı bir şekilde artmaktadır (Acosta ve ark. 2003).

Luteal fazın ilk evresi olan metöstrus dönemi, (3-4 gün) kollabe olan ovulatör folikülden (korpus hemorajikum) fonksiyonel CL geçiş aşamasını kapsamaktadır (Forde ve ark., 2011). Yeni şekillenen CL'un progesteron üretme kapasitesi, steroidojenik hücrelerin sayısı ve vaskülarizasyonun derecesine bağlıdır (Ferreira-Dias ve Skarzynski 2008). CL, farklı mekanizmalar tarafından düzenlenen iki belirgin steroidojenik hücre tipine sahiptir (Diaz ve ark., 2002). CL steroidojenik özelliklere sahip, progesteron üreten küçük ve büyük luteal hücrelerden oluşmaktadır (Smith ve ark., 1994). Büyük luteal hücreler granuloza hücrelerinden köken alırlar, LH uyarımından bağımsız olarak progesteron üretirler, östradiol 17β ile prostaglandin $F2\alpha$ ($PGF_{2\alpha}$) reseptörleri taşırlar ve kandaki progesteronun %80'ini üretirler. Küçük luteal hücreler teka hücrelerinden köken alırlar, LH reseptörleri taşırlar ve büyük luteal hücrelerden daha az miktarda östradiol 17β ve $PGF_{2\alpha}$ reseptörlerini taşırlar. Küçük luteal hücrelerin progesteron üretimi LH tarafından stimüle edilir. Büyük luteal hücrelerin progesteron üretimi LH'dan bağımsızdır. Progesteron; kolesterolü progesterona dönüştüren, steroidojenik akut regülatör protein kolesterol sitokrom P450 yan zincirini kıran enzim ve 3-beta-hidroksisteroid dehidrojenaz gibi enzimlerin ekspresyonunu uyarılması sonucu üretilir (Kotwica ve ark., 2004). Aynı enzimlerin ekspresyonunu arttıran diğer bir faktör de prostaglandin E_2 (PGE_2)'dir (Rekawiecki ve ark., 2005). Luteal hücrelerdeki progesteron konsantrasyonlarının artması onları apoptozdan korur, ancak steroidogenezin bozulması ve luteal hücrelerin progesteron üretme yeteneğinin azalması apoptozu uyarır (Liszewska ve ark. 2005). LH,

dolaşımdaki lipoproteinlerin pregnenolon vasıtasıyla progesterona dönüştürülmesine neden olur (Diaz ve ark., 2002).

İneklerde LH konsantrasyonu östrus başlangıcından 3-10 saat sonra pike ulaşmakta ve LH pik zamanından 21-30 saat sonra ovulasyon şekillenmektedir (Rajamahendran ve ark., 1989). Yapılan başka çalışmada ise östrus başlangıcından 25-35 saat sonra, östrus bitiminden 10-14 saat sonra ovulasyon şekillendiği bildirilmiştir (McMillan ve ark., 1998). Plazmada artan progesteron konsantrasyonu, uterusu gebeliğe hazırlar ve takiben gebeliğin doğuma kadar devamlılığını sağlar (Peter ve ark., 2009). Metaöstrustan diöstrusa geçiş, ovulasyondan sonraki 4. günde progesteronun hızlı bir şekilde artması ile belirginleşir. Diöstrus sırasında plazmada progesteron konsantrasyonları ovulasyondan sonra 4. günden 8. güne kadar 3 kat (1,5-5,5 ng/ml) artış gösterir. Östrus siklusunun 16. gününde yaklaşık 7 ng/mL'de maksimum değere ulaşır (Stabenfeldt ve ark., 1969). Sütçü düvelerin serum progesteron konsantrasyonları (7,3 ng/mL) sütçü ineklerden (5,6 ng/mL) daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Wiltbank ve ark., 2006). Bu farklılığın, süt ineklerinde artan kuru madde tüketimine bağlı iç organlara kan akışının artmasını takiben hepatik katabolizmanın artmasından kaynaklanır (Sangsritavong ve ark., 2002). Diöstrus sırasında hipofiz ön lobundan FSH'nin periyodik olarak salınmasıyla tekrarlayan foliküler dalgalar oluşur. Bununla birlikte, foliküler dalgalar gelişse dahi luteal faz boyunca gelişen dominant folikül ovule olamaz, çünkü progesteron negatif bir geri bildirimle LH salınımını baskılar. Böylece daha büyük amplitüdü (genişliği) olan LH salınsa da LH pulzasyon sıklığındaki azalma preovulatör LH pikini engeller (Rahe ve ark., 1980). Erken luteal fazda amplitüd ve frekansı yüksek olan 24 saatte yaklaşık 20-30 LH pulzasyonu görülürken, orta luteal fazda bu sayı amplitüdü (genişliği) yüksek fakat frekansı düşük olan 6-8 pulzasyon aralığına gerilemektedir. Bu iki yetersiz amplitüd ve frekans (genişliği ve sıklığı) final olgunlaşma ve graaf folikülün sonraki ovulasyonu için yetersiz kalmaktadır (Chenault ve ark., 1976; Rahe ve ark., 1980).

Gebelik şekillenmediğinde, CL'nin fonksiyonel ve yapısal gerilemesi, düvelerde 16 gün civarında başlar (Ginther ve ark., 2007) ve PGF_{2α}'nın uterustan aralıklı olarak salınımı, uterus veni ile ovaryum arteri arasındaki ters akım sistemi yoluyla CL'ye ulaşır

(Thorburn ve ark., 1973). Prostaglandin $F_{2\alpha}$, CL'nin ömrünü düzenleyen hormondur. Endometriyumda 12. güne kadar östradiol ve oksitosin reseptörlerinin sayısal azlığı $PGF_{2\alpha}$ sekresyonu üzerine bir inhibitör etki yapmaktadır. Bu dönemi östradiol ve oksitosin reseptörlerinin artışı izler ve bu durum endometriyumdan $PGF_{2\alpha}$ 'nın salınması için önemlidir (Meyer ve ark., 1988; Schams ve Berisha, 2004). Endometriyal oksitosin reseptörlerinin sentezinin uyarılmasının ardından oksitosin uterustan $PGF_{2\alpha}$ salınımını uyarır ve dolaşımdaki östradiol yoluyla östradiol reseptör aktivasyonunda bir artış olur. Daha sonra $PGF_{2\alpha}$ artışında pozitif geri bildirim için CL'den oksitosin salınımını uyarılır (Silvia ve ark., 1991). Luteolizis sırasında östradiol kaynağı ovaryumdaki foliküller, özellikle de ovulasyon folikül haline gelecek en büyük ve ileride dominant olacak foliküldür (Beg ve Ginther, 2006). Foliküler östradiol, sığırlarda uterustan $PGF_{2\alpha}$ salınımının zamanlamasını düzenlemektedir (Araujo ve ark., 2009). Endometriyumdan pulsatil olarak salınan $PGF_{2\alpha}$ östrus siklusunun 17-19. günleri arasında spontan luteolizise neden olmaktadır (Ginther ve ark., 2010). Uterusta oksitosin reseptör konsantrasyonu siklus boyunca artmasına rağmen özellikle siklusun 15. gününden 17. gününe kadar artış göstermektedir (Robinson ve ark., 1999). $PGF_{2\alpha}$; CL'nin lizisini kontrol ederek progesteron konsantrasyonunu düşürür, böylece yüksek progesteron konsantrasyonunun baskılayıcı etkisi ortadan kalkar. GnRH salınımındaki negatif baskının kalkmasıyla birlikte LH salınımı artarak dominant follikülün büyümesi ve buna bağlı olarak östradiol konsantrasyonunun artışı uyarılır.

Gebelik şekillendiğinde, konseptus luteolizisi engellemek için sinyal (interferon tau- $IFN\tau$) göndermektedir. Progesteron erken ve orta luteal fazda oksitosin reseptör ekspresyonunu baskılar (Robinson ve ark., 2001). $IFN\tau$ 'nın antilütolitik etkileri fizyolojik olarak konseptusun varlığını işaret etmektedir (Demmers ve ark., 2001). Embriyonun trofektoderm tabakası siklusun 16-18 günleri arasında yeterli miktarda $IFN\tau$ üretir ve oksitosin reseptörlerinde artış önlenir. Trofoblasttan $IFN\tau$ üretilmesi için embriyonun küresel şekilden filamentöz şekile uzamaya başlamış olması gerekmektedir. Embriyo hala küresel ise, östrus döngüsünün gününe bakılmaksızın $IFN\tau$ üretimi gerçekleşmez (Robinson ve ark., 2006). Hem ineklerde hem de düvelerde ovulasyon sonrası progesteron artışı ile embriyonik gelişim arasında güçlü pozitif bir ilişki bulunmaktadır. Progesteron,

blastosit büyümesini ve konseptus uzamasını düzenlemek için çoğunlukla konseptus üzerinde endometriyum yoluyla dolaylı bir etki yapmaktadır. Ovulasyon sonrası progesteron konsantrasyonundaki artış konseptusun uzamasını desteklerken erken luteal dönemdeki düşük progesteron konsantrasyonu embriyo gelişiminin ve IFN τ salınımının gecikmesine neden olur (Forde ve ark., 2001; Mann ve ark., 2001; Mann ve ark., 2006). Ovulasyon sonrası progesteron artışının gecikmesiyle tohumlama sonrası 16. gün kötü kaliteli embriyolar gelişmektedir. Bu embriyolar kaliteli embriyolar ile karşılaştırıldığında çok az IFN τ sentezlemekte veya hiç sentezleyememektedir. Küçük foliküllerin ovulasyonu sonucunda CL çapları küçük olmakta dolayısıyla luteal doku içeriği az olduğundan progesteron konsantrasyonunun düşük olması, fertilité düşüklüğünün nedenleri arasında kabul edilmektedir (Perry ve ark., 2005; Vasconcelos ve ark., 2001).

2.2. Düve ve İneklerin Seksüel Siklusu Arasındaki Farklılıklar

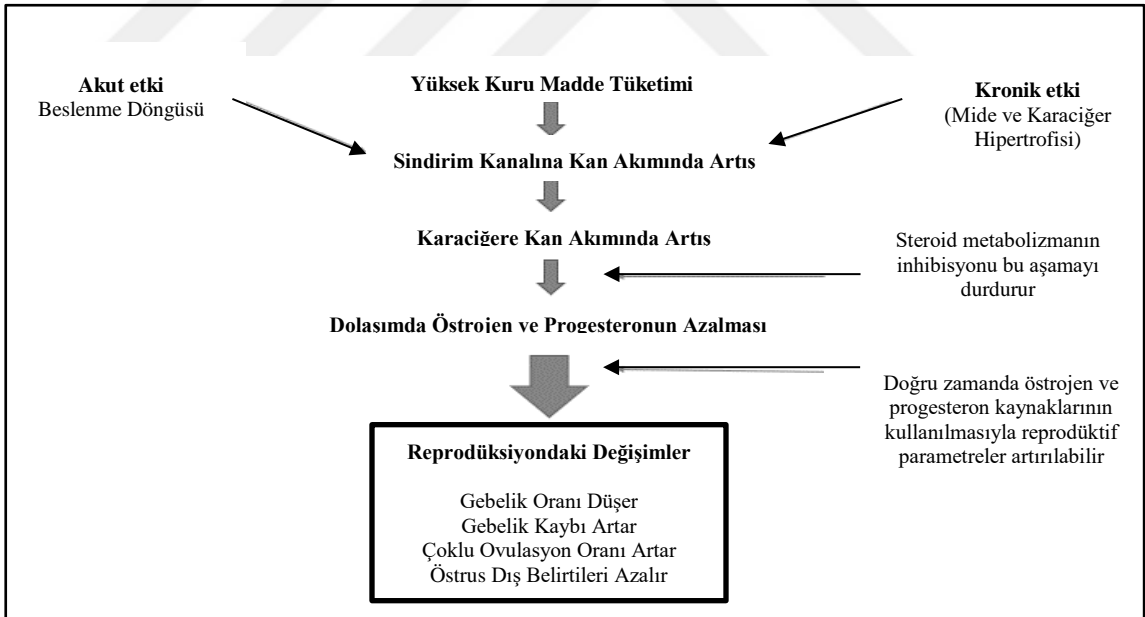
Düve ve inekler arasında östrus siklusu açısından en önemli fark östrus siklusu uzunluğudur. Holstein düveler ve inekler arasındaki siklus uzunluğu arasındaki fark değerlendirildiğinde, düvelerde siklusun 0,9 gün (Sartori ve ark., 2004) ile 2,6 gün daha kısa olduğu bildirilmiştir (Wolfenson ve ark., 2004). Bunun en önemli nedeni inekler ve düveler arasındaki folliküler dalga sayısı olarak gösterilmektedir. Örneğin Nelore ırkına ait çoğu düvelerin üç folikül dalga gösterirken, aynı ırk ineklerin genellikle iki foliküler dalgaya sahip olduğu görülmüştür (Figuereido ve ark., 1997). Siklus boyunca şekillenen foliküler dalga sayısındaki değişim hem alt türler arasında hem de inekler ile düveler arasında östrus siklusu uzunluğunda da belirleyici olduğu rapor edilmiştir (Rathbone ve ark., 1998; Sartori ve ark., 2004; Wolfenson ve ark., 2004). Diğer taraftan Holstein ırkı inek ve düveler arasında iki veya üç dalgalı siklus görülme oranı açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır (Pursley ve ark., 1997; Sirois ve Fortune, 1988; Wolfenson ve ark., 2004).

Diğer yandan, graaf folikülün büyüklüğü açısından inek ve düveler arasında ovulasyon olmayan dalgalarda fark bulunmazken, ovulasyonla sonuçlanan dalgalarda ineklerdeki graaf folikülün çapı (laktasyondaki ineklerde dominantlık süresi uzun olduğundan) düvelerden daha büyük tespit edilmiştir. Bununla birlikte ovulatör foliküllere

bakılmaksızın, laktasyondaki ineklerde östrusta ölçülen maksimum östradiol konsantrasyonları düvelerden daha düşük bulunmuştur. Düvelerin luteolizisten sonra ineklerden daha erken östradiol pikine ulaştığı bildirilmiştir (Ahmad ve ark., 1996; Inbar ve ark., 2001; Sartori ve ark. al., 2004). İneklerde östradiol düzeyinin düşük olmasının sebebi iki şekilde açıklanmaktadır. Birincisi, folikülün steroidojenik kapasitesinin düvelere göre daha düşük olması, diğer sebebi ise ineklerin östradiol metabolizmasının düvelere göre daha yüksek olmasıdır. Çünkü laktasyondaki ineklerin steroid metabolizması, laktasyonda olmayan ineklerden daha yüksek bulunmuştur (Sangsritavong ve ark., 2002; Vasconcelos ve ark., 2003). Laktasyon boyunca hepatic arteriyel kan akışının artışına bağlı olarak (laktasyondaki ineklerde 1,183 L/s; laktasyonda olmayan ineklerde 757 L/s) karaciğerdeki steroid metabolizmasının arttığı tespit edilmiştir. Bu tespit düşük östradiol seviyesinin nedeni olarak rapor edilmiştir (Sangsritavong ve ark., 2002). Laktasyondaki ineklerin karaciğer kan akımının (1561 ± 57 L/s), laktasyonda olmayan ineklerden (747 ± 47 L/s) daha yüksek tespit edilmesi karaciğer steroid metabolizmasının steroid hormonlar üzerindeki önemli bir etkisinin olduğunu ortaya koymuştur. Özetle; laktasyondaki ineklerde follikül ve CL'un steroidojenikal olarak daha az aktif olması (östrojen ve progesteron üretimi) ve yüksek süt veriminin steroid hormon metabolizmasını artırmış olması (hepatik kleransın artması), ki bu durum en sık karşılan realitedir, sirkülasyondaki steroid hormon konsantrasyonlarında belirleyicidir (Wiltbank ve ark., 2006).

Preovulatör dolaşımdaki östradiol konsantrasyonunun azalması, laktasyondaki ineklerde üreme fizyolojisinin değişmesine neden olmaktadır. Bu değişim, östrusun süresi ve belirtilerinin şiddetinin azalmasına neden olmaktadır (Nebel ve ark. 1997). Ayrıca serum östradiol ve inhibin seviyelerindeki düşüş, FSH salımına karşı östradiolün baskılayıcı etkisini azaltmaktadır (Mihm ve ark., 2002). Deviasyon zamanındaki FSH konsantrasyonundaki küçük artışlar subordinat folikülün ikinci büyük folikül olmasını sağlamakta ve preovulatör dominant folikülle beraber ovulasyon yaparak ovule olan folikül sayısını artırmaktadır (Kulick ve ark., 2001; Wolfenson ve ark. 2004). Dolayısıyla düvelerle karşılaştırıldığında laktasyondaki ineklerde çoklu ovulasyon oranı daha yüksektir (Fricke ve Wiltbank, 1999). Holstein düvelerde çoklu ovulasyon oranı %1-4

arasında iken ineklerde %15-28 arasında olduğu rapor edilmiştir. Hatta, bu oranın yüksek süt verimli ineklerde %40'a kadar çıktığı bildirilmiştir (Lopez-Gatius ve ark., 2005a; Mann ve ark., 2007; Wiltbank ve ark., 2000). Diğer yandan, ovulatör folikülün büyüklüğü ile luteal doku hacmi arasında pozitif bir korelasyon bulunmaktadır. Dolayısıyla laktasyondaki ineklerde luteal doku hacmi düvelerden daha fazla ölçülmüştür (Sartori ve ark., 2004; Vasconcelos ve ark. 2001). Laktasyondaki ineklerde daha büyük bir ovulatör follükülün ovulasyonu sonucu, CL hacmi daha büyük (luteal doku daha büyük) olmasına rağmen serum progesteron konsantrasyonu (5,6 vs. 14,9 ng/mL) düvelere göre ineklerde daha düşük tespit edilmiştir (Sartori ve ark., 2004; Wolfenson ve ark., 2004). Bu fark laktasyondaki ineklerde yüksek steroid metabolizması ile açıklanmaktadır (Wiltbank ve ark., 2006). Şekil 3'de laktasyondaki ineklerde fertilitenin daha düşük olmasına aracılık eden aşamalar gösterilmektedir (Mihm ve ark., 1994; Wiltbank ve ark., 2006).



Şekil 3. Yüksek verimli ineklerde reproduktif fizyolojide tespit edilen değişikliğin şeması (Wiltbank ve ark.,2006).

2.3. Östrusun Dış Belirtileri

2.3.1. Östrusun Primer Bulgusu

Bir ineğin östrusta olduğunu belirleyici olan en karakteristik dış bulgu, üzerine atlandığında ineğin hareketsiz durmasıdır (Roelofs ve ark., 2010). İnekler üzerine atlandığında östrustaki inek kaçmak için çaba harcamaz (Hurnik ve ark.,1975). Yapılan bir çalışmada östrustaki ineklerin davranışları incelendiğinde, östrustaki bir ineğin diğer ineklere en az 6 kez atlandığı, en az 3 kere durduğu bildirilmiştir (Esslemont ve Bryant, 1976). Başka bir çalışmada ineklerin her 53 dakikada bir 2,5 saniyelik durma davranışı gösterdiği tespit edilmiştir (Diskin, 2008). Diğer çalışmalarda da durma davranışının 2,3 ile 3,8 saniye sürdüğü rapor edilmiştir (At-Taras ve Spahr, 2001; Xu ve ark., 1998). Atlamaya karşı durma davranışı gösteren ineklerin oranı %8 (Kerbrat ve Disenhaus, 2004) ile %74 (Britt ve ark., 1986) arasında değiştiği tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada ise östrustaki ineklerin durma davranışını %50'den daha azının gösterdiği bildirilmiştir (Van Eerdenburg ve ark., 2002).

Östrus süresi, durma davranışına göre hesaplandığında ilk durma davranışı ile son durma arasındaki süre olarak hesaplanmıştır (Dobson ve ark., 2008). Bazı araştırmalarda ineklerde östrus süresi ortalama 8 ile 9 saat arası tespit edilirken (Dransfield ve ark., 1998; Xu ve ark., 1998), bazı sütçü işletmelerde ise östrus süresinin 6 saatten daha az olduğu saptanmıştır (Taras ve Spahr, 2001). Diğer yandan östrus süresi ile birlikte östrustaki durma davranışı, östrus tespitinde kilit rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda östrus takibi 30 dakika süreyle 8 kez, 10 dakika süreyle 5 kez yapıldığında, durma davranışı sırasıyla %58 ve %63 belirlenmiştir (Cutullic ve ark., 2009; Roelofs ve ark., 2005). Başka bir çalışmada, durma davranışı gösteren ineklerin oranı %21,5 bulunmuştur (Kerbrat ve Disenhaus, 2004). Tespit edilen bu oranlar östrustaki tüm ineklerin durma davranışı göstermediği anlamına gelmektedir (Van Eerdenburg ve ark., 2002). Dolayısıyla östrus tespitinin sadece durma davranışının saptanmasıyla mümkün olmadığı, östrus tespitini artırmak için sekonder bulguların değerlendirilmesi gerektiği belirtilmiştir (Dobson ve ark., 2008; Kerbrat ve Disenhaus, 2004).

2.3.2. Östrusun Sekonder Bulguları

Östrusun sekonder bulguları östrus tespitinde durma davranışı ile birlikte değerlendirilmesinin yanı sıra seksüel, sosyal ve agresif davranış olarak sınıflandırılmaktadır (Kerbrat ve Disenhaus, 2004). İnekler seksüel iletişim kurarken diğer ineklerin üzerine atlama, çenesini dayama, genital bölgeyi koklama ve yalama gibi davranışlar göstermektedir. Sosyal iletişim kurarken diğer ineği yalama (kafa, boyun, göğüs), başıyla veya çenesiyle diğer hayvanları okşama davranışları sergilemektedir. Agresif iletişim kurarken diğer ineklerle kafa kafaya tokuşmakta veya kafa atma davranışı göstermektedir (Kerbrat ve Disenhaus, 2004). Sekonder bulgulardan en sık karşılaşılan çene dayama (2-130 kez/gün) ve genital bölgeyi koklama/yalama (8-176/gün) olarak tespit edilmiştir. Bunların yanında östrusta agresif davranışlar iki katına çıkmaktadır (Hurnik ve ark., 1975). Tüm kavgaların %64'ünü kapsayan kafa kafaya tokuşma, östrusta en sık karşılaşılan agresif davranış olsa da diöstrusta da karşılaşılmaktadır (Castellanos ve ark., 1992; Hurnik ve ark., 1975). Bu bulgularla birlikte; huzursuzluk, sık sık böğürme, yem tüketiminde azalma, flehmen davranışı, kuyruğunu kaldırıp yana kıvrma gibi normal rutin davranışların dışındaki bulgular da gözlenmektedir (Diskin, 2008; Phillips ve Schofield, 1990; Van Vliet ve Van Eerdenburg, 1996). Bunlara ek olarak, aktivite davranışı (hareket) östrus yaklaştıkça önemli derecede artmaktadır ki bu davranış seksüel huzursuzluğun bir göstergesidir (Lopez-Gatius ve ark., 2005b, Roelofs ve ark., 2005a; Valenza ve ark., 2012; Van Eerdenburg ve ark., 1996). Östrus gününde inekler 2,3 ile 6 kat daha fazla aktivite göstermektedir (Lovendahl ve Chagunda, 2010; Redden ve ark., 1993; Schofield ve ark., 1991; Silper ve ark., 2015). Östrus döneminde davranışsal değişikliklerle birlikte fizyolojik değişiklikler de ortaya çıkmaktadır. Östradiol servikal bezlerin ödematöz, tonik olmasını sağlamakta, sekresyon artışıyla karakteristik bir mukus salgılanmasına neden olmaktadır. Ödem ve artan kan akışı vulvanın ödemleşmesine ve hiperemik hal almasına neden olur (Roelofs ve ark., 2010).

Van Eerdenburg ve ark., (1996) östrus sırasındaki primer ve sekonder bulguları değerlendiren skor sistemi geliştirmiştir (Tablo 1). Bu skorlama günde 12 kez 30'ar dakika gözlem yapılarak ortaya konmuştur. Atlama sonrası durma davranışı en yüksek puan olarak değerlendirilmiştir. 24 saat içinde 100 puanı geçen hayvanlar östrusta kabul

edilmektedir. Ancak günde 12 kez gözlem yapmak pratik olmamakla birlikte zaman alıcı olduğu bildirilmiştir (Van Eerdenburg ve ark., 1996).

Tablo 1. Eerdenburg skalasına göre östrus belirtilerinin puanlanması (Van Eerdenburg ve ark., 1996)

Östrus Belirtileri	Puan
Üzerine atlandığında harekersiz durma	100
Diğer ineklerin baş bölgesine atlama	45
Diğer ineklerin üzerine atlama	35
Çenesini diğer ineklerin sağırsına dayama	15
Üzerine atlandığında hareket etme	10
Diğer ineklerin ano-genital bölgesini koklama/yalama	10
Huzursuzluk	5
Çara	3
Koklama	3

2.4. Östrus Tespiti

Süt veriminin yıllara göre giderek artmasına rağmen fertilitenin azalmasındaki önemli sebepler arasında yüksek steroid mekanizmasına bağlı östrus süresinin ve östrus tespit oranının azalması gösterilmektedir (Lopez-Gatius, 2003; Opsomer, 2002). İneklerdekine benzer olarak düvelerde de östrus tespitindeki yetersizlik (yakalama oranının düşük olması) veya östrus tespitindeki hatalar (östrus tespit doğruluk oranının düşük olması), kaçırılan veya zamansız yapılan tohumlamaları takiben ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Skenandore ve Cardoso, 2017). Dolayısıyla sütçü sürülerde reproduktif başarının sağlanmasında östrus tespitinin önemi giderek artmaktadır (Diskin ve Sreenan, 2000). Yapılan bir araştırmada, östrus tespitindeki yetersizlik ve hataların Amerika süt endüstrisine maliyetinin yıllık 300 milyon dolardan fazla olduğu bildirilmiştir (Senger,1994). Dolayısıyla işletmenin karlılığını doğrudan etkileyen östrus tespitinin asıl amacı doğru zamanda tohumlama yapılmasına imkân sağlamasıdır (Foote, 1975). Bununla paralel olarak etkin bir östrus tespiti için çeşitli metotlar ortaya konmuştur (Diskin ve Sreenan, 2000).

2.5. Östrus Tespit Metotları

2.5.1. Gözlem Yoluyla Östrus Tespiti

Süt işletmelerinde östrus tespiti en çok gözlem yoluyla yapılmaktadır (Palmer ve ark., 2010). Östrustaki hayvanın üstüne atlanıldığında ineklerin durma davranışı göstermesi östrusun en karakteristik bulgusu olarak kabul edilmektedir (Orihuela, 2000). Geleneksel olarak yapılan gözlem metodu, durma davranışının saptanmasıyla doğru bir metot gibi görünmesine rağmen zaman alıcı bulunmakla birlikte östrusun kaçırılmaması için dikkatli bir gözlem gerekmektedir (Firk ve ark., 2002). Buna rağmen sürünün gözlemi çoğunlukla yemleme sırası ile sağım zamanı gibi yanlış zamanda ve yanlış yerde olmakla birlikte kısıtlı bir zamanda yapılmaktadır (Diskin, 2008). Modern süt işletmelerinde sürüyü sürekli gözlemleninin pratik olmadığı bildirilmiştir. Bununla birlikte östrus aktivitesinin %65'i (işletmenin personelin az olduğu) akşam 6 ile sabah 6 arasında olduğu dikkate alınmalıdır (Hurnik ve ark.,1975). Günde 2 veya 3 kez 30'ar dakika gözlem yapan araştırmacılar durma davranışı gösterenlerin ancak %53'ünü tespit ederken, %70 oranında östrus tespiti yapabilmıştır (Lyimo ve ark., 2000; Van Vliet ve Van Eerdenburg, 1996).

2.5.2. Kuyruk Boyama Yöntemi

Kuyruk boyama ile östrus tespiti ekonomik ve pratik bir yöntemdir. Bu yöntemde ilk kuyruk omurundan itibaren 20 cm uzunluğunda 5 cm genişliğinde posterior yönde tebeşir veya boya ile kuyruk boyanmaktadır. Kuyruktaki boyanın kısmen veya tamamen silinmesi ineğin durma davranışı gösterdiğini işaret etmektedir (Diskin, 2008). Yeni Zelanda'da yaklaşık 50 yıldır kullanılan bu yöntem ile östrus tespit oranı %90'dan fazla olduğu bildirilmiştir (Skenandore ve Cardoso, 2017). Kuyruk boyama yöntemi, rutin gözlem yöntemiyle karşılaştırıldığında östrus tespitinin arttığı (%81,5; %70,2) tespit edilmiştir. Gözlem yöntemi ile beraber östrus tespiti yapıldığında %98,4 oranında östrus tespiti saptanmış ve östrus tespiti yapılanların %2,4'ünün yanlış tespit olduğu bildirilmiştir (Xu ve ark., 1998). Ancak kuyruk boyama ile östrus tespitinin en önemli dezavantajı, ineğin östrusta olmamasına rağmen boyanın silinmesidir. İnekler arasındaki sosyal ilişkiler kuyruktaki boyanın silinmesi nedeniyle östrus tespitinde yanıltıcı olmaktadır (Skenandore ve Cardoso, 2017).

2.5.3. Yapıştırma Bant (Kamar®)

İneğin sakrum bölgesine veya kuyruğunun üstüne yapıştırılan basınç duyarlı dedektörün adına Kamar® denilmiştir. Kamar®, beyaz bir tüpün içinde kırmızı boyanın olduğu bir araçtır. Östrus anında atlamayla birlikte 3 saniyeden fazla basınç altında kaldığında tüp patlamakta ve içindeki kırmızı boya ile yapıştırılan aracın rengi değişmektedir (Esslemont ve ark., 1985). Bu sayede östrus tespiti oranı %90'a kadar artmıştır (Williamson ve ark., 1972). Arayıcı boğa kullanıldığında östrus tespiti %71,4 iken Kamar® ve arayıcı boğa birlikte kullanıldığında östrus tespiti %100 olarak saptanmıştır (Huang ve ark., 1987). Mai ve ark., (2002) ise Kamar® kullanarak östrusların %82,6'sını tespit etmişlerdir.

2.5.4. Elektronik Atlama Dedektörleri

Elektronik atlama dedektörleri basınçla aktiveyi ölçmekte ve gözlem gerekmeksizin kızgınlığı saptamaktadır. Bu radyotelemetrik cihazlar durma sırasında belirli bir sürede basıncı ölçerek kaç kere durma refleksi gerçekleştiğini (Örneğin; 4 saat içinde 3 durma refleksi) ölçmektedir. Sonrasında elde edilen veriler bilgisayara ulaşmaktadır. Veriler sayesinde östrus başlangıcı, atlama sayısı ve süresi verildiğinden tohumlama için uygun zaman belirlenebilmektedir. Elektronik atlama dedektörleri ile östrus tespit oranı %86,8 saptanmıştır (At-Taras ve Spahr, 2001). Hata oranı düşük (%2) bulunmuştur (Rorie ve ark., 2002). Sürekli gözlemlene ve kızgın hayvanların hızlı tanımlanmasıyla östrus tespitinde avantaj sağlamaktadır. Gözlem yöntemi ile karşılaştırıldığında atlama dedektörleriyle daha fazla oranda (%51'e karşın %91) östrus tespit edilmiştir (Peralta ve ark., 2005). Ancak başka bir çalışmada dedektörün atlamaların %42'sini kaydetmediği ve gözlem ile karşılaştırıldığında östrus süresini %24 daha düşük tespit ettiği rapor edilmiştir (Cavalieri ve ark. 2003). Bu yöntem ile sadece durma davranışı dikkate alındığı için sekonder östrus bulguları değerlendirilmemektedir (Dobson ve ark., 2008). Dolayısıyla her atlama davranışı sonrasında sistem uyarılmadığından yanlış negatif veya çevresel nedenlerle sistemin uyarılması sonucu yanlış pozitif tespitler söz konusu olabilmektedir (At-Taras ve Spahr, 2001).

2.5.5. Pedometre

Östrustaki ineklerde aktivitenin östrusta olmayanlara göre 2-4 kat arttığı tespit edilmiştir (Kiddy, 1977). Aktivite artışı östrustan 72-16 saat öncesi aşamalı olarak artmaktadır (Arney ve ark., 1994). En önemli artış östrus başlamadan 4 saat önce tespit edilmiştir (Nebel ve ark., 2000). İnek bacağına takılan pedometreler, artan yürüme aktivitesinin bir göstergesi olarak birim zaman başına alınan adımların sayısını kaydetmektedir (Arney ve ark., 1994; Brehme ve ark., 2006; López-Gatius ve ark., 2005). Pedometre, adım sayılarını düzenlemek için inekleri karşılaştırmalı olarak değerlendirerek bir algoritma düzenlemekte ve adım sayısını günlük ritim olarak göstermektedir (Liu ve Spahr, 1993; Roelofs ve ark., 2005b). Kullanıcılar aktivite eşik değerini kendileri belirleyebilmektedir (Reith ve Hoy, 2017). Depoladığı verileri sağımhane girişinde günde iki kez veya ahırdaki alıcılara otomatik sensörler aracılığıyla bir veya iki saatlik olarak aktarır (Roelofs ve ark., 2005a). Bu sayede bireysel olarak hayvanların reproduktif durumu incelenmektedir (Fricke ve ark., 2014a). Pedometreler aracılığıyla yapılan östrus tespiti gözlem yoluyla yapılandan daha etkili (%74; %58) olduğu bildirilmiştir (Liu ve Spahr, 1993). Östrus tespiti elektronik olarak yapıldığından tespit etme oranı ve doğruluk oranı araştırıldığında, östrus tespit oranı %60-100 arasında değişmekle birlikte doğruluk oranı %80-90 oranında tespit edilirken (Firk ve ark.,2002; Senger, 1994), bazı çalışmalar kızgınlığı %100 oranda doğru tespit ettiğini bildirmiştir (Arney ve ark., 1994; Schofield ve ark., 1991). Ancak doğruluk oranı teknik problemlerden ve aktivite artışının şiddetindeki farklılıktan dolayı azalabilmektedir. Dolayısıyla aktivite ne kadar çok artarsa (4 kat) ve ne kadar uzun sürerse (yaklaşık 4 saat), östrus tespiti ve doğruluk oranı o kadar yüksek olmaktadır (Rorie ve ark., 2002). Bununla beraber sürü içerisinde yönetimsel kararlar (grup değişimi) da aktivite artışına neden olmaktadır ki her aktivite artışı östrusla alakalı değildir. Dolayısıyla östrus tespitindeki hata oranı %17-55 gibi geniş bir aralıkta olabileceği bildirilmektedir (Firk ve ark., 2002). Östrus tespitinde belirtilen hata oranına rağmen hayvanların yaşamış olduğu hastalıklar da aktivite değerini değiştirdiğinden hastalıklar pedometre ile monitorize edilebilmektedir (Roelofs ve ark., 2005). Ayrıca gözleme gerek kalmaksızın östrus tespiti günde 24 saat boyunca yapılabildiğinden avantajlı bir yöntem olduğu kabul edilmektedir (Firk ve ark., 2002).

2.5.6. Aktivite-Ruminasyon Takip Sistemi

Pedometrelerden farklı olarak diğer aktivite belirleme sisteminde östrus takibi boyun kolyeleri ile tespit edilmektedir (Müller ve Schader, 2003; Valenza ve ark., 2012). Bu sistem yürüme ve atlama davranışları sırasında ineğin baş ve boynun aşağı yukarı doğru hareketlerini temel alarak ölçüm yapmaktadır (Elischer ve ark., 2013; Lovendahl ve Chagunda, 2010). Pedometre ile aktivite-ruminasyon takip sisteminin karşılaştırıldığında; pedometre alınan adımların sayısını ölçerken, aktivite-ruminasyon takip sistemi genel hareketliliği tahmin ederek üç boyutlu olarak ölçüm yapmaktadır (Fricke ve ark., 2014b). Bu sistem ile her gün 1 veya 2 saatlik olarak aktarılan verilerin ortalaması alınmakta ve sonuçlar genel aktivite indeksi olarak gösterilmektedir. Östrustaki inek aktivite eşiğini aştıktan sonra bilgi otomatik olarak sürü yönetim yazılımına aktarılmaktadır (Lovendahl ve Chagunda, 2010; Valenza ve ark., 2012). Aktivite-ruminasyon takip verileri pedometre ile aynı şekilde günlük ritim şeklinde depolanmaktadır (Lovendahl ve Chagunda, 2010). Yapılan bir çalışmada östrus tespit oranı açısından aktivite-ruminasyon takip sistemi ile östrus dedektörleri (%71; %60) arasında fark tespit edilmemiştir (Valenza ve ark.,2012). Ancak östrus tespiti için etkili ve aynı zamanda fertilitiyi artırmak için kullanılan aktivite-ruminasyon takip teknolojisi, diğer aktivite ölçerden farklı olarak ruminasyon hakkında da bilgi vermektedir (Kamphuis ve ark., 2012; Valenza ve ark., 2012).

İnekler günün üçte birini ruminasyonla geçirmektedir (Reith ve ark., 2014; Reith ve Hoy, 2017). Ruminasyonu izlemek için mikrofon tabanlı sensörler, regürgitasyon ve ruminasyonun karakteristik seslerini tanımlamak için ineğin sol çenesinin arkasında bir tasmanaya yerleştirilmektedir (Pahl ve ark., 2015). Östrustaki ineklerde artan aktivite ve huzursuzlukla bağlantılı olarak beslenme davranışının değiştiği bildirilmiştir (Van Vliet ve Van Eerdenburg, 1996). Yapılan çalışmalarda tohumlama gününde beslenme süresi ve ruminasyon süresinde bir azalma tespit edilmiştir (Maltz ve ark., 1997; Pahl ve ark., 2015). Bazı çalışmalarda tohumlama gününde (%19,6) ruminasyon düşerken, bazı çalışmalarda ruminasyondaki düşme tohumlama gününden bir gün önce (%19,8) tespit edilmiştir. Dolayısıyla aktivite artışı ile ruminasyonun düşmesi değerlendirilerek östrus tespiti yapılmaktadır (Pahl ve ark., 2015; Reith ve ark., 2014).

2.5.7. Hormonal Ölçümler

Östrus anında progesterone konsantrasyonu bazal seviyede iken östradiol konsantrasyonu ise pik seviyeye ulaşır. Bu hormonlar sütte ve kan plazmasında ölçülerek östrus tespitinde kullanılmaktadır. Progesteron konsantrasyonu CL regresyonuyla azalmaya başlamaktadır. Progesteron konsantrasyonu östrus öncesi 3 gün ve östrusta en düşük seviyede kalmakla birlikte östrustan sonraki 3. günden itibaren artmaya başlamaktadır. Sütte progesteron konsantrasyonu otomatik sağım sistem aracılığıyla ölçüldüğünde değer 4ng/ml'nin altına düştüğünde sistemin östrus uyarısı verdiği bildirilmiştir (Friggens ve Chagunda, 2005). Başka bir çalışmada östrusta sütteki progesteron konsantrasyonu 10 ng/ml'den 3ng/ml'nin altına, plazmada ise 6ng/ml'den 0,1 ng/ml'ye düştüğü bildirilmiştir (Claycomb ve Delwiche, 1998; Firk ve ark., 2002). Bununla birlikte plazmada östradiol konsantrasyonu sütteki düzeyinden daha yüksek ölçülmüştür (Monk ve ark., 1975). İnekler arasında östradiol konsantrasyonu açısından bireysel farklılık bulunmaktadır çünkü her ineğin fizyolojik pik değeri farklı tespit edilmiştir (Lopez ve ark., 2002). Progesteron konsantrasyonun aksine östradiol hormonunun östrustaki artışı kısa süreli olmaktadır (Roelofs ve ark., 2010). Östradiol konsantrasyonu kısa bir süreli artış göstermesinden dolayı yükseldiği anı yakalamak zor olmaktadır. Dolayısıyla östrus veya ovulasyon zamanını kesin tespit edebilmek için sürekli ölçüm gereklidir (Lovendahl ve Friggens, 2008). Sürekli örnek almak hem maliyetli olmakta hem de ekstra iş gücü gerektirmektedir (Firk ve ark., 2002). Bu dezavantajları elimine edebilmek için biyokimyasal biyosensörler geliştirilmiştir. Biyosensör ile %99,2 oranında östrus tespiti yapılmış ve östrus ile progesterone konsantrasyonu arasında %93,7 oranında korelasyon saptanmıştır (Friggens ve Chagunda, 2005; Friggens ve ark., 2008). Başka bir çalışmada ise inekler arasındaki bireysel farklılıktan dolayı biyosensör ile ölçülen progesteron konsantrasyonunda %26 oranında yanlış östrus tespiti saptanmıştır (Delwiche ve ark., 2001).

2.5.8. Vajinal Mukus Direnci Elektriksel İletkenlik

Östrus siklusu boyunca oluşan hormonal değişiklikler reproduktif kanalın elektrik direncini etkilemektedir (Firk ve ark., 2002). Östrus sırasında östradiol konsantrasyonu arttıkça adrenokortikotropik hormon ve aldosteron konsantrasyonları da artmaktadır. Bu hormonların artmasıyla vajinal mukusta NaCl (sodyum klorid) düzeyi artmaktadır. Vajinal mukusta artan NaCl konsantrasyonu vaginanın elektriksel direncini düşürmektedir (Fehring, 1997). Çünkü vajinal mukus, elektrolit içermektedir. İçerdiği elektrolitler mukusun iyonizasyonuna neden olup elektriksel direnci değiştirmektedir (Ahmed ve ark., 2017). Elektriksel direnç en yüksek luteal fazda ölçülmektedir. Foliküler faz boyunca azalmaktadır ve en düşük östrus başlangıcı ve LH piki sırasında ölçülmüştür (Leidl ve Stolla, 1976). Vajinal mukus direnci düşük iken tohumlama yapılanlarda yüksek olanlara göre daha yüksek gebelik oranı elde edildiği bildirilmiştir (Leidl ve Stolla, 1976). Vajinal mukus direnci östrusta ölçüldüğünde 30-40 ohm gibi düşük değerlerin hayvanın östrusta olduğunu ifade ettiği bildirilmiştir. Fakat her östrusta vajinal mukus direncinin değiştiği tespit edilmiştir (Rorie ve ark., 2002). Vajinal direnç östrus siklusu boyunca değişse de kist, yangı (vaginitis, servisit) gibi diğer faktörler de sonucu etkilemektedir. Bununla birlikte vajinal mukus direncindeki değişimi saptayabilmek için sürekli ölçüm gerekmektedir. Ayrıca sürekli ölçüm yapılması, reproduktif kanalda irritasyona ve yangıya neden olmaktadır (Firk ve ark., 2002). Hayvanın vücut sıcaklığı, probun yerleştirildiği pozisyon ve rasyondaki mineral dengesi bile elektrik direncindeki sonuçları etkilemektedir. Dolayısıyla elde edilen sonuçları birçok faktörün etkilemesi ve sürekli ölçüm gerektirmesi nedeniyle östrus tespit yöntemi olarak pratik değildir ve sonuçları güvenilir olmamaktadır (Firk ve ark., 2002; Zuluaga ve ark., 2007).

2.5.9. Süt Verimi Ölçümü

Östrusta ineğin huzursuzluğu artarken yem tüketimi azalmaktadır. Dolayısıyla süt veriminin %2-6 oranında azaldığı bildirilmiştir (Firk ve ark., 2002; King, 1977). Yapılan başka bir çalışmada ise östrusta süt veriminin %8,2 oranında azaldığı tespit edilmiştir (Roth, 1987). Ancak süt verimi östrus başında azalmasına rağmen bir sonraki sağımda süt verimi artmaktadır (Britt ve ark., 1986). Bu da östrustaki süt verimindeki düşmeyi ineğin

bir sonraki sağımda kompanze ettiğini göstermektedir (Schofield ve ark., 1991). Tüm ineklerin östrusları değerlendirildiğinde ineklerin %33'ünde süt verimi düşmektedir. Süt veriminin östrusta düşmesi östrus tespitinde yardımcı olsa da çevresel faktörlere ve hastalıklara da bağlı düşmektedir (Schofield ve ark., 1991).

2.5.10. Vücut Sıcaklığı Ölçümü

Vücut sıcaklığı süten, rektumdan manuel olarak veya implant aracılığıyla ölçülebilmektedir. İneklerde normal vücut sıcaklığı ortalama 38,6 °C olarak rapor edilmiştir. Vücut sıcaklığı östrustan birkaç gün önce düşmekle birlikte minimum sıcaklık 2 gün önce tespit edilmiştir. Östrusla birlikte vücut sıcaklığı 0,1-0,5 °C arttığı rapor edilmiştir (Firk ve ark., 2002). Östrus boyunca ölçülen sıcaklıkların ortalaması ile östrus anında ölçülen sıcaklık karşılaştırıldığında 0,1-0,4 artış saptanmıştır (Roth ve ark., 1987). Her 21 günde bir östrus gününde vücut sıcaklığı 1,3 °C artmakta fakat çevresel sıcaklığın değişimiyle birlikte vücut sıcaklığını değişkenlik göstermektedir. Ayrıca vücut sıcaklığı, lokal veya sistemik yangıya bağlı olarak da değişmektedir. Bu yüzden vücut sıcaklığı değişimi ile östrus tespiti yanlış pozitif sonuç verebilmekte ve pratik kabul edilmemektedir (Firk ve ark., 2002; Piccione ve ark., 2003).

Östrus tespiti için manuel olarak vücut sıcaklığın ölçülmesi saha şartlarında zaman alıcı ve pratik olmayan bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Firk ve ark., 2002). Bu yüzden rektuma yerleştirilen implant sayesinde sürekli olarak vücut sıcaklığı ölçülmektedir. Ancak implant aracılığıyla ölçülen sıcaklık manuel olarak ölçülen sıcaklıktan 1,1-1,6 °C yüksek saptanmıştır (Brehme ve ark., 2001).

2.5.11. Arayıcı Boğa

Östrus tespitinde sürünün içinde kullanılan arayıcı boğalar; östrus belirtileri şiddetli olmadığı zamanlarda, insanların gözlemlerle tespit edemediği östrusların saptanmasında öne çıkmaktadır. Boğaların insanlardan östrus belirtilerini daha doğru tespit ettiği bildirilmiştir (Holmann ve ark., 1987). Vazektomize boğalar, androjenize boğalar ve inekler (testosteron veya östradiol uygulanmış) veya foliküler kistli inekler östrus tespiti için kullanılmaktadır (Van Eerdenburg ve ark., 2002). Vazektomize boğalar

agresif olabilmektedir dolayısıyla diğerk inekler ve personel için sürünün içinde bulunması riskli kabul edilmektedir. Bununla beraber veneral hastalıkların yayılmasında rol oynarlar (Ball ve Peters, 2004). Androjenize boğalar da veneral hastalıkların yayılmasına neden olmakta ve vazektomize boğalardan daha agresif olabilmektedir. Veneral hastalıkların yayılması söz konusu olduğu için östrus tespitinde kullanılacak boğalara penektomi, penisin deviasyonu, ereksiyonu engellemek için prepsiyuma araçların takılması gibi cerrahi operasyonlar uygulanmaktadır. Dolayısıyla çiftleşme olmadığından veneral hastalıklar yayılma ihtimali ortadan kaldırılmaktadır. Ancak hayvan refahı açısından bu operasyonlar etik kabul edilmemektedir. Boğalardan başka, östrus takibi için kullanılan foliküler kistli hayvanlar nimfomanik davranışlar sergilediğinden östrustaki inekleri daha kolay saptadığı bildirilmiştir (Ball ve Peters, 2004).

2.5.12. Kayıt Tutma

İyi bir reprodüktif yönetim için bireysel hayvan kaydı gereklidir. Tüm hayvanların kaydının sürekli yapılabilmesi için kulak numaraları veya boyun kolyeleri bulunmaktadır. Kayıt işleminin doğru yapılabilmesi için hayvanın numarasının belirli bir uzaklıktan okunabilmesi gerekir. Reprodüktif kayıtlar; hayvanın numarası, doğurma tarihi, bir önceki östrus tarihi, tohumlama tarihi, boğa adı, tohumlayıcı adı, gebelik teşhis tarihi ve muhtemel doğum tarihi gibi benzeri bilgilerden oluşmaktadır (Diskin, 2000). Bir önceki östrus kaydı, ineğin bir sonraki kızgınlığını tahmin etmeye ve daha dikkatli gözlemlemeye imkân sağlamaktadır. Östrusta olduğu şüphelenilen hayvanın ortalama 21 gün önce östrus kaydının olup olmadığı incelenebilmektedir. Dolayısıyla kayıt ile östrus takibi için 21 günlük bir takvim kullanılmaktadır (Ball ve Peters, 2004).

2.6. Cinsiyeti Belirlenmiş Spermanın Tarihçesi

Erkek cinsiyetin tarih sürecinde her zaman dişiye göre ön planda olması nedeniyle eski zamanlardan beri cinsiyetin belirlenmesi konusu insanoğlunun ilgisini çekmiştir. Cinsiyetin belirlenmesi konusundaki bu ilgi ve merak, birçok girişimin ve iddianın ortaya atılmasına neden olmuştur. Cinsiyeti kontrol etme girişimleri ilk olarak eski Yunan filozofu Demokritus tarafından milattan önce 460-370 yıllarında yapılmıştır ve filozof sağ testisten doğanların erkek, sol testisten doğanların dişi yavru olduğunu ileri sürmüştür. Bu iddiadan yola çıkarak istenilen cinsiyette çocuk elde edebilmek için istenilmeyen testisin kastrasyonunun yapılması gerektiği yönünde tavsiyeler ve iddialar bulunmaktadır. Cinsiyetin belirlenmesi konusundaki diğer bir varsayım da cinsiyetin uterus tarafından belirlendiği ve erkeklerin sağ kornudan, dişilerin ise sol kornudan doğduğu iddia edilmiştir. Bununla birlikte Hipokrat esler ilk sperma tanımını milattan önce 460-377 yılları arasında yapmış ve cinsiyet üzerinde spermanın önemli bir etkisi olduğuna inanmıştır. Hipokrat eslere göre eğer sperma iki cinsiyet için de üretiliyorsa, güçlü olan spermalardan erkekler, zayıf spermalardan kızlar doğmaktadır. İlerleyen yıllarda, Anton Van Leeuwenhoek 1677 yılında mikroskop sayesinde spermatozayı tanımlamıştır. Fakat bu zamanda dişi ve erkek spermanın belirlenmesi mümkün olmamıştır. Zaman içerisinde gelişen bilim ve teknolojiyle; sperma cinsiyetinin belirlenmesi ancak 20. yüzyılda yapılabilmektedir (Kline ve Rath, 2006).

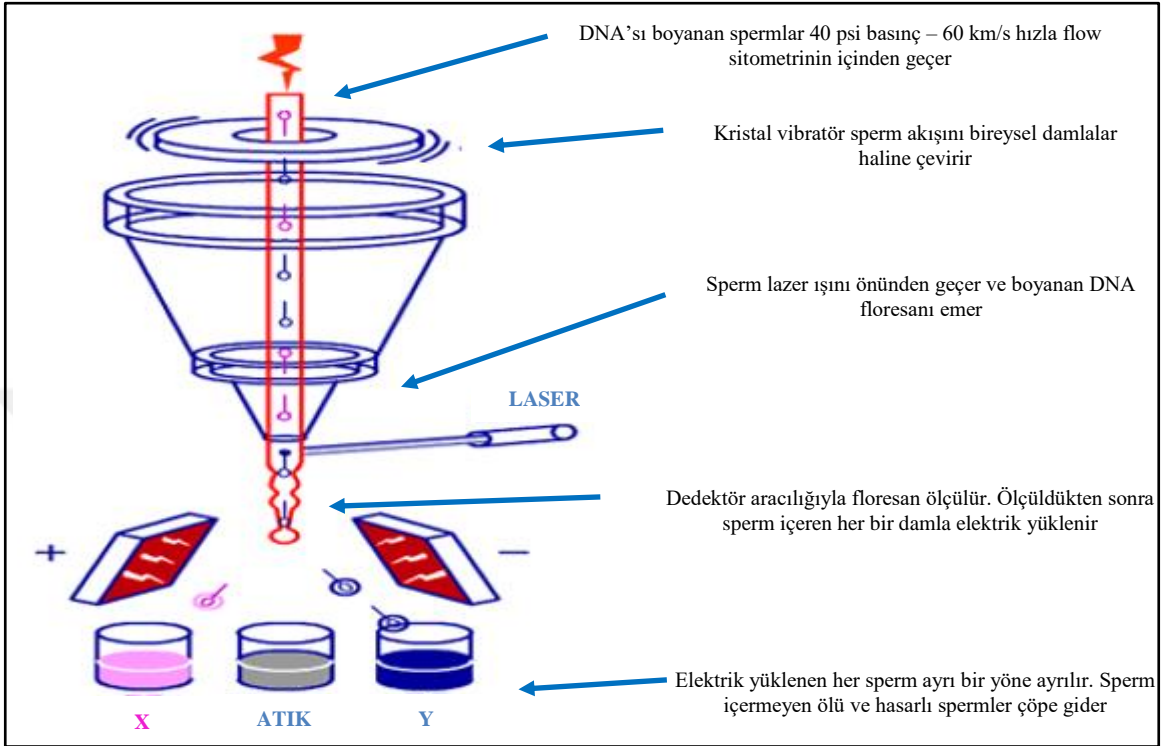
Yirminci yüzyılın başlarında genetik alanındaki gelişmelerle, cinsiyet kromozomlarının ayrıştırılması yapılabilmek hale gelmiş ve cinsiyet kromozomlarının ilk mikroskopik ayrıştırılması Guyer (1910) tarafından yapılmıştır. Yapılan birçok araştırma sonrasında, spermin özel kromatin yapılarından dolayı memeli cinsiyetlerinin kontrol edilebileceğini belirlenmiştir (Seidel ve Garner, 2002). Sonraki yıllarda birçok araştırmacı cinsiyeti belirlemek amacıyla spermanın; yoğunluk farklılığı, ağırlık ve elektrik akımı, farklı protein içeriği, immünolojik özellikler ve kromozom hacmi gibi değişik özelliklerini kullanmışlardır (Blecher ve ark., 1999; Engelmann ve ark., 1988; Ericsson ve ark., 1973; Hendriksen ve ark., 1999; Kaneko ve ark., 1984; Van Munster ve ark., 1999).

DNA farklılığına dayanan X ve Y kromozomlarını belirleme konusunda ana buluşu Johnson ve ark. (1989) flow sitometri tekniğini kullanarak yapmıştır. X

kromozomunun Y kromozomundan baş, boyun ve kuyruğundaki genişlik ve çevresel uzunluğun fazla olmasını ve kütleli olarak daha fazla DNA içermesini kullanan bu teknik son yıllarda en güvenilir sperma ayırıştırma yöntemi olarak kabul edilmektedir (Blondin ve ark., 2009; Van Munster ve ark., 1999; Welch ve Johnson, 1999). Flow sitometri tekniği ile ilk onaylı cinsiyeti belirleme çalışması tavşanlarda yapılmıştır. Araştırma sonrasında Y kromozumlu sperma ile tohumlananlarda %81 erkek (17/21), X kromozumlu sperma ile tohumlananlarda %94 dişi (15/16) yavru elde edilmiştir (Johnson ve ark., 1989).

1990lı yıllarda ayırıştırma teknolojisini patentini XY şirketi almasıyla tekniğin daha hızlı ve güvenilir bir şekilde X ve Y kromozomunu ayırıştırabilmesi ve cinsiyeti belirlenmiş spermanın hazırlanması için çalışmalar yapılmıştır (Schenk ve ark., 1999). Cinsiyeti belirlenmiş boğa spermasının optimizasyonu ve ticari üretimi 2003 yılında Sexing Technologies şirketinin patenti almasıyla başlamıştır (De Vries ve Nebel, 2009). Sonrasında Avrupa ve dünyadaki diğer ülkelerde yaygın şekilde kullanılmaya başlamıştır. Amerika'da gelişen süt işletmelerinin damızlık ihtiyacının karşılanması için bu teknoloji diğer ülkelere göre daha yaygın kullanılmaktadır (De Vries ve ark., 2008; Ettema ve ark., 2007; Rath ve ark., 2009). Bu teknoloji sadece ineklerde ticarileşebilmesine rağmen diğer türlerde de çalışmalar devam etmektedir (Arruda ve ark., 2012)

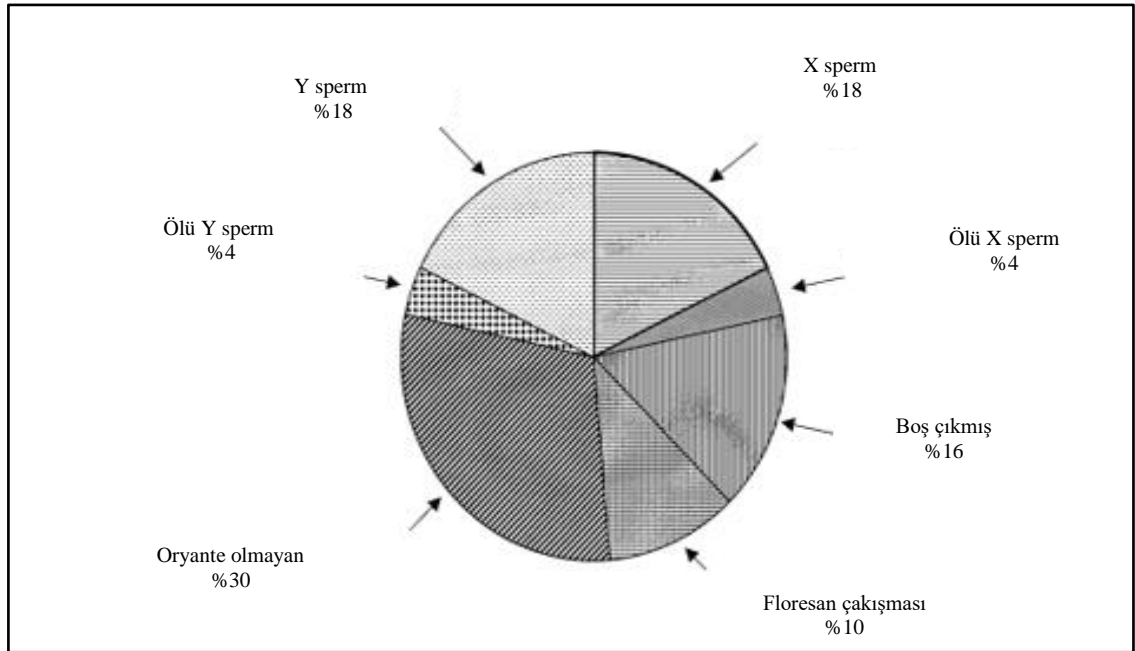
2.7. Flow Sitometrik Yöntem



Şekil 4. Flow sitometrik yöntem diagramı (Vishwanath, 2014)

Flow sitometrik yöntemde (Şekil 4) ilk aşama, spermanın çok düşük konsantrasyonlara kadar sulandırılmasıdır (Jain, 2011). Sonrasında sperma spesifik DNA bağlayıcı boya olan Hoechst 33342 (40-6-diamino-2-phenylindole -DAPI) ile boyanır (Garner, 2006). Bu boya sperm hücre membranına penetre olur ve DNA'ya bağlanır. Boyanan bu spermier 40psi basınç ve 60 km/s hızla makineye yönlendirilir. Sonrasında bir lazer, DNA'ya zarar vermeden floresana neden olmak için doğru dalga boyundaki ışığı gönderir. Spermier absorbe ettikleri boya miktarına göre floresan gösterirler. Boğa spermierdeki X kromozomu Y kromozomundan yaklaşık %4 daha fazla DNA içerdiğinden daha parlak bir floresan verir. İnsan gözü ve beyni %4 lük floresan ayırımı yapamaz. Dolayısıyla yayılan floresandaki fark cihazda bulunan fotomultiplikator ile ölçülür ve sistemdeki bilgisayar tarafından analiz edilir. Ancak tüm spermier fotomultiplikator tarafından tanımlanamayabilir. Vibratör yardımıyla cihazın boşalma deliğinden (nozzle) yaklaşık saniyede 70.000–80.000 damlacık geçer. Damlacıkların yaklaşık üçte biri sperm taşırken, üçte ikisi boştur, çok az bir kısmı iki veya daha fazla sperm içerir. Eğer damlacık X

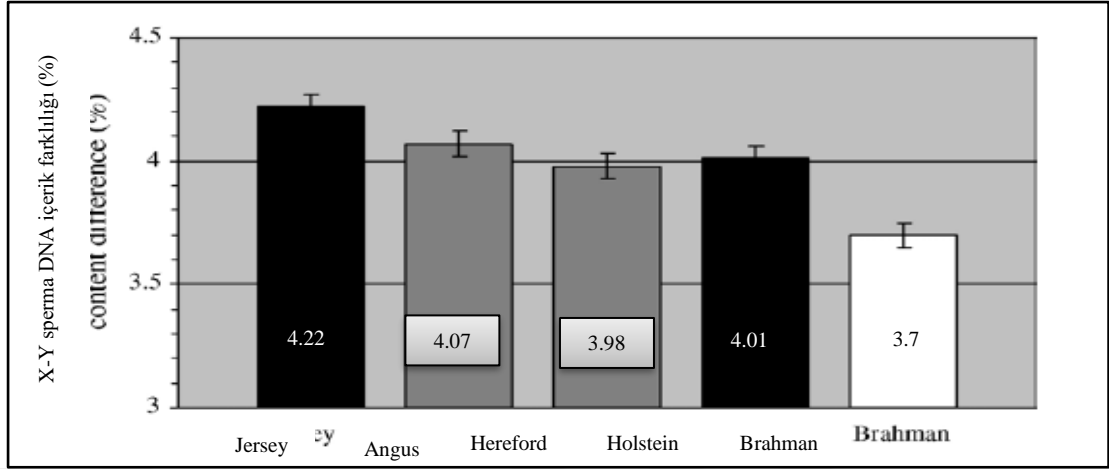
kromozomlu sperm içeriyorsa pozitif elektrikle yüklenirken, Y kromozomlu sperm içeren damlacık ise negatif elektrik yüklenir (Seidel, 2007). Sperm içermeyen, çok sperm taşıyan, hasarlı veya DNA içeriği ayrılamayan damlacıklar elektriksel yük ile yüklenmez. Flow sitometri deliğinden damlacıklar düşerken pozitif yüklenenler bir tarafa, negatif yüklenenler bir tarafa ayrılır. Zıt elektrik yüklüleri birbirini çektiği için pozitif yüklü olanlar (X spermler) alanın negatif tarafına geçerken, negatif yüklü olanlar (Y spermler) alanın pozitif tarafına geçer (Seidel, 2007). Aynı zamanda bu metot ile hasarlı veya ölü spermalara mutajenik olmayan gıda boyası (propidium iodide) eklenir. Hasarlı hücre membranına sahip sperm boyanır fakat sağlıklı hücre membranına sahip olanlarda bu boya yoktur. Hasarlı veya ölü spermelerdeki gıda boyaları Hoechst 33342 floresanını söndürür dolayısıyla zayıf floresan verenler çöpe ayrıştırılmaktadır (Johnson ve Welch 1999). Şekil 5’de sunulduğu üzere ayrıştırma sonucunda yaklaşık %20’si X spermler, %20’si ise Y spermler olarak ayrılır. Geriye kalan %60 hasarlı veya herhangi bir sebepten dolayı spermelerin cinsiyeti belirlenemez (Garner ve Seidel, 2003). Sonuç olarak ayrıştırma işlemi sonunda spermeler 3 farklı tüpe ayrıştırılmaktadır (Seidel, 2007).



Şekil 5. Boğa spermasının Hoechst 33342 ile boyandıktan sonra ayrıştırma sürecinde meydana gelen kayıplar (Garner ve Seidel, 2003)

Bu metot ile üretilen sperm dikkate alındığında, cihazdan saniyede toplam 20.000 spermatozoa geçer ve her bir cinsiyet için yaklaşık 4.000 spermatozoa eşzamanlı olarak ayrılabilir. Bu da standart 20 milyon spermatozoa taşıyan bir payet için sürecin 1 saat 7 dakika sürmesi anlamına gelmektedir. Geniş kapsamlı bir hesaplama yapıldığında bir makine yılda yaklaşık 63.000 payet üretebilmektedir (Albert De Vries ve Ray Nebel, 2009). Yavaş üretim hızı olması ve pazarlanabilir kısmının yaklaşık %15'i olduğu düşünüldüğünde CBS'nin ticarileşebilmesi ancak payet başına düşük sayıda (yaklaşık 2 milyon) spermatozoa koyulmasıyla mümkün olduğu bildirilmektedir (Albert De Vries ve Ray Nebel, 2009). Sonuç olarak ayırıştırma işleminin yavaş olması ve elde edilen spermatozoa sayısının az olmasına rağmen bu metot ile cinsiyeti belirlenen spermatozoaların ayırıştırmasının yanı sıra, hasarlı ve ölü spermatozoalar da ayıklanmaktadır (Garner ve Seidel, 2002; Seidel, 2007).

Bununla birlikte boğa sperm hücreleri (spermatozoa) en yüksek ayırıştırma katsayısına sahiptir. Bu basit yaklaşım, insan sperm ile karşılaştırıldığında boğa spermının neredeyse yaklaşık dört kat daha kolay ayrışacağını göstermektedir. Ancak bir türün tüm bireylerinin spermleri aynı oranda ayrışmamaktadır. Bireylerin arasındaki fark ayırıştırma sırasında sperm boyanma oranı farklılığından kaynaklanabilmektedir. DNA içeriğinin doğru saptanabilmesi için her türün hatta bir türün içindeki ırklar için boyama sürecinin optimizasyonu gerekmektedir (Hollinshead ve ark., 2004). Örneğin; sığır ırkları arasında da DNA içeriği farklıdır (Garner ve ark., 1983). Avrupa ırkları (*Bos taurus*) ve Asya ırkları (*Bos indicus*) arasında X-Y kromozomları arasındaki fark aynı oranda değildir. (Garner ve ark., 2006). Jersey boğalarından elde edilen spermlerin, Holstein ya da Hereford boğa spermlerine göre X-Y kromozomları arasında daha büyük DNA farkı olduğu Şekil 6'da gösterilmektedir (Garner ve ark., 1983). Sonuç olarak, boğa sperm hücrelerinde cinsiyetinin ayırıştırma etkinliği diğer türlerden farklı olduğu gibi farklı boğalara ait sperm ayrıştırma etkinliğinin de farklı olduğu bildirilmiştir (Garner, 2006).



Şekil 6. Avrupa ırkı (*Bos taurus*) ve Asya orjinli Brahman sığıra (*Bos indicus*) ait sperm çekirdekleri arasındaki X – Y kromozomları arasındaki DNA farklılıkları yukarıda sütunlarda gösterilmiştir. Brahman boğasının spermindeki X-Y kromozomları arasındaki DNA farkı Avrupa ırklarındakinden daha küçük bulunmuştur (Garner ve ark., 1983).

2.8. Cinsiyeti Belirlenmiş Spermmanın Önemi

Bin yılı aşkın süredir insanlar, hayvanlarının doğurduğu yavrunun cinsiyetini kontrol etmeye çalışmaktadır (Seidel, 2003). Günümüzde özellikle bu konunun öneminin artmasının sebebi hayvancılık yapan işletmelerde cinsiyetin en önemli genetik özellik kabul edilmesidir (Ghavi Hossein-Zadeh ve ark., 2010; Taylor ve ark., 2018). Özellikle sütçü sığır işletmeleri için bu durum daha fazla önem arz etmektedir çünkü işletmelerin en önemli problemlerinden birisi sürünün devamlılığını sağlayacak damızlık dişi sayısının yetersiz kalmasıdır (Hohenboken, 1999). Aynı zamanda damızlık dişi sayısının yetersiz kalması işletmedeki genetik ilerlemeyi engellemektedir (Weigel, 2004). Süt sığırı yetiştiriciliğinde sürünün geleceğini doğan dişi buzağular belirlemektedir. Dolayısıyla CBS damızlık yetiştirilmesi konusunda hem büyük işletmelere hem de aile tipi hayvancılık yapanlara birçok avantaj sağlamaktadır (Holden ve Butler, 2018). Bu avantajlardan en önemlisi, genetik kapasitesi yüksek boğaların sperması ile elde edilen dişi buzağuların işletmede sürü dışı kalmış ineklerin yerine konmasını sağlamasıdır. Böylelikle, işletmelerde genetik ilerlemenin önü açılmış olacaktır. CBS sayesinde genetik ilerlemenin %15 arttığı bildirilmiştir (Hohenboken, 1999; Karakaya ve ark., 2018). Ancak genetik ilerlemenin artması için, sürüye katılacak hayvanlar düvelerden oluşmalıdır ve genetik merit değeri yüksek boğalar kullanılmalıdır (Butler ve ark., 2014). Diğer yandan,

CBS ortalama %90 oranında dişi buzağı doğmasına imkân sağladığından, reproduktif verimliliği artıran yardımcı üreme teknolojisi olarak kabul edilmektedir (Chang ve ark., 2017; Norman ve ark., 2010). Bu teknoloji sayesinde progeny testi için gereken hayvan sayısı azalmaktadır. Dolayısıyla sürüye katılacak düvelerin üretimi için az sayıda genetik olarak daha kaliteli olan ineklerin seçilebilmesi mümkün olmaktadır (Hohenboken, 1999; Seidel ve Garner, 2002). Aynı zamanda CBS, kaliteli damızlıkların işletme içinde tutulmasını sağlarken, sürü dışı edilecek hayvanlar kolaylıkla işletmeden çıkarılmasına imkân sağlamaktadır (De Vries ve ark., 2008). Bununla birlikte damızlık dişiler işletmede yetiştirileceğinden sürüye dışarıdan hayvan girişi engellenmekte ve biyogüvenliğin sağlanmasında en büyük katkıyı sağlamaktadır (Holden ve Butler, 2018; Seidel, 2003). Büyümek isteyen işletmeler daha hızlı ve güvenli şekilde sürüyü genişletirken, kapasitesi dolu işletmelere de düve satışı imkânı sağlamaktadır (Hohenboken, 1999). Bunların yanı sıra sürünün düşük verimli ineklerinden besi için erkek hayvan doğması planlanabilme imkânı sunarken, yüksek verimli ineklerden damızlık hayvan yetiştirilmesine fırsat sunmaktadır (Hietala ve ark., 2014). Ülkemizde de CBS ile tohumlanan gebe düveler daha yüksek fiyattan alıcı bulabilmektedir (Baran, 2016). Yapılan ekonomik analizler sonucunda da konvansiyonel sperma ile karşılaştırıldığında CBS'nin daha kârlı olduğu bildirilmiştir (Butler ve ark., 2014; De Vries ve ark., 2008).

2.9. Cinsiyeti Belirlenmiş Sperma ile Tohumlama Sonrası Gebelik Oranları

İşletmelerdeki CBS ile elde edilen gebelik oranı karlılığı etkileyen ana faktörlerden birisidir (Holden ve Butler, 2018; Karakaya ve ark., 2018). Dolayısıyla konvansiyonel sperma ile CBS'nin gebelik oranlarının karşılaştırıldığı birçok çalışma bulunmaktadır. Yapılan birçok çalışmada CBS ile elde edilen gebelik oranlarının düşük olduğu ortaya konmuştur (DeJarnette ve ark., 2009; Garner ve Seidel, 2008). Holstein düvelerdeki tohumlama verilerinin değerlendirildiği bir çalışmada CBS ile gebelik oranı %27 ile %70 arasında değişirken ortalama %45 tespit edilmiştir. Aynı çalışmada konvansiyonel sperma ile %34 ile %83 arasında değişmekle birlikte ortalama %56 gebelik oranı saptanmıştır (DeJarnette ve ark., 2009). Güncel bir çalışmada ise Holstein düvelerde östrus takibi sonrası konvansiyonel sperma ile %59,1; CBS ile %48,6 gebelik oranı tespit

edilmiştir (Miura ve Izumi, 2018). Yapılan bir derlemede (Kurykin, 2017) farklı ülkelerde etçi ve sütçü düvelerde tohumlama protokolü dikkate alınmaksızın gebelik oranları değerlendirildiğinde, CBS ile %31-60 arasında (konvansiyonel spermanın %54-89'u kadar) gebelik oranı kaydedilmiştir (Tablo 2). Aynı derlemede ineklerde CBS ile %21-25 arasında (konvansiyonel spermanın %45-64'ü kadar) gebelik oranı elde edildiği (Tablo 3) bildirilmiştir. Bununla birlikte farklı boğalara ait spermaların ayrıştırma sürecinden etkilenme düzeyleri farklıdır (Karakaya ve ark., 2014). Dolayısıyla farklı boğaların sperması kullanıldığında, saha çalışmaları verilerinden CBS ile beklenen gebelik oranının tahmin etmek zor olmaktadır (Frijters ve ark., 2009). Bunlara ek olarak, araştırmacılar CBS ile elde edilen gebelik oranlarının işletmeden işletmeye değiştiğini bildirmiştir (DeJarnette ve ark., 2008; Garner ve Seidel, 2008). İyi yönetilen bir işletmede konvansiyonel spermadan elde edilen gebelik oranlarının %70-80'i kadarı CBS ile elde edilirken, kötü yönetilen işletmelerde konvansiyonel spermanın %50-60'ı oranında cinsiyeti belirlenmiş sperma ile gebelik oranı elde edilebileceği rapor edilmiştir (Kurykin, 2017). Ancak literatür çalışmalarının çoğunda konvansiyonel spermadan elde edilen gebelik oranlarının ortalama %70-80'i kadar CBS ile gebelik elde edildiği sunulmuştur (DeJarnette ve ark., 2009; Garner, 2006; Seidel ve Schenk, 2008).

Tablo 2. Farklı coğrafi bölgelerdeki etçi ve sütçü düvelerde cinsiyeti belirlenmiş sperma ve konvansiyonel sperma ile yapılan çalışmalardaki gebelik oranları (Kurykin, 2017)

ÜLKE	IRKLAR	SPERM TÜRÜ		REFERANSLAR
		CBS	KS	
Amerika	Holstein, Angus	%43,0	%62,0	Seidel ve ark., 1999
İsviçre	BrownSwiss, Red Holstein	%33,9	%59,3	Bodmer ve ark., 2005
Estonya	Holstein	%43,0	%68,0	Kurykin ve ark., 2007
İtalya	Holstein-Friesian	%51,5	-	Cerchiaro ve ark., 2007
Amerika	Holstein	%43,0	%62,0	Seidel ve Schenk 2008
Amerika	Red Angus	%53,0	%67,0	Seidel ve Schenk 2008
Amerika	Black Angus	%47,0	%72,0	Seidel ve Schenk 2008
Danimarka	Holstein	%49,3	%61,9	Borchersen ve Peacock 2009
Danimarka	Jersey	%46,6	%53,9	Borchersen ve Peacock 2009
Danimarka	Danish Red	%60,2	%65,4	Borchersen ve Peacock 2009
Arjantin	Holstein	%34,3	-	Brogliatti ve ark., 2009
Amerika	Holstein	%43,9	%60,7	DeJarnette ve ark., 2010
Amerika	Holstein	%39,0	%56,0	Norman ve ark., 2010
Amerika	Holstein	%38,2	%51,9	Chebel ve ark., 2010
Çin	Holstein	%48,1	%53,6	An ve ark., 2010
Brezilya	Nelore	%41,5	%61,7	Dominguez ve ark., 2011
Paraguay	Nelore	%36,2	%61,4	Dominguez ve ark., 2011
Brezilya	Jersey	%31,4	%51,8	Sales ve ark., 2011
Avusturalya	Holstein	%31,6	%39,6	Healy ve ark., 2013
Amerika	Holstein	%38,0	%68,0	Mallory ve ark., 2013
Amerika	Jersey	%37,6	-	Lucena ve ark., 2014
Avusturalya	Holstein	%40,3	%56,0	Noonan ve ark., 2016

CBS: Cinsiyeti Belirlenmiş sperma; KS: Konvansiyonel sperma

Tablo 3. Farklı coğrafi bölgelerdeki etçi ve sütçü ineklerde cinsiyeti belirlenmiş sperma ve konvansiyonel sperma ile yapılan çalışmalarda gebelik oranları (Kurykin, 2017)

ÜLKE	IRKLAR	SPERM TÜRÜ		REFERANSLAR
		CBS	KS	
Amerika	Angus	%23,0	%67,0	Doyle ve ark., 1999
İsviçre	Brown Swiss, Red Holstein	%23,8	%26,6	Bodmer ve ark., 2005
Finlandiya	Holstein-Friesian	%21,0	%46,0	Andersson ve ark., 2006
Amerika	Angus	%57,0	%76,0	Seidel, Schenk 2008
Amerika	Holstein	%40,5	%55,6	Schenk ve ark., 2009
Amerika	Jersey	%37,0	-	DeJarnette ve ark., 2009
Amerika	Holstein	%23,0	%31,0	DeJarnette ve ark., 2010
Amerika	Holstein	%25,0	%30,0	Norman ve ark., 2010
Brezilya	Nelore	%41,8	%51,8	Sales ve ark., 2011
Paraguay	Nelore	%39,1	%52,3	Dominguez ve ark., 2011
Brezilya	Nelore	%45,9	%54,7	Sà Filho ve ark., 2012
Brezilya	Holstein x Gir	%23,2	-	Sà Filho ve ark., 2013
Türkiye	Holstein	%25,7	%39,0	Karakaya ve ark., 2014
Amerika	Jersey	%43,1	-	Lucena ve ark., 2014
Brezilya	Nelore, Angus	%30,0	-	Pellegrino ve ark., 2016

CBS: Cinsiyeti Belirlenmiş sperma; KS: Konvansiyonel sperma

2.10. Cinsiyeti Belirlenmiş Spermada Gebelik Oranlarını Etkileyen Faktörler

CBS'nin yaygınlaşmasını kısıtlayan başlıca faktörler; spermanın maliyetinin yüksek olması ve gebelik oranlarının düşük olmasıdır (Boro ve ark., 2016; Carvalho ve ark., 2014; Garner ve Seidel, 2003; Karakaya ve ark., 2014; McCulloch ve ark., 2013). CBS teknolojisi karlı olarak bildirilmesinin yanında bu karlılığın işletmelerin reproduktif verimine bağlı olduğu bildirilmiştir (Remmik ve ark., 2016). Bununla birlikte bir işletmenin kendi düvelerini yetiştirerek büyümeyi sağlayabilmesinin ancak fertilitenin iyi olmasıyla mümkündür (López-Gatius, 2012). Bu sebeple, en çok merak edilen hem de bu teknolojinin kullanımını sınırlayan en önemli konu düşük gebelik oranlarıdır (Schenk ve ark., 2009). Çünkü düşük gebelik oranları gebelik başına maliyeti direkt olarak artırmaktadır (Cooke ve ark., 2014; Hohenboken, 1999; Thomas ve ark., 2017).

Gebelik oranlarının düşük olmasının nedenleri; spermanın ayırıştırma sürecinden etkilenmesi, düşük dozdaki sperma sayısı, çözdürme sonrası motilitenin düşmesi, işletmelerdeki etkin yönetilemeyen östrus tespiti, tohumlama zamanı, besleme ve sağlık programları gibi faktörler olarak belirtilmektedir (Bodmer ve ark., 2005; Hollinshead ve

ark., 2003; Karakaya ve ark., 2014). Dolayısıyla yapılan birçok çalışmada sperm ayırıştırma süreci, sperm dozu, tohumlanacak hayvan, tohum sayısı, boğa etkisi, tohumlama yeri, tohumlama zamanı, tohumlama protokolü gibi faktörler değerlendirilerek gebelik oranı artırılmaya çalışılmıştır (Colazo ve ark., 2018; DeJarnette ve ark., 2009; Frijters ve ark., 2009; Karakaya ve ark., 2018; Kurykin ve ark., 2007; Mellado ve ark., 2014; Noonan ve ark., 2016; Sá Filho ve ark. 2010). CBS ile yapılan çalışmalarda gebelik oranını etkileyen faktörler aşağıda belirtilmektedir.

2.10.1. Flow Sitometri ile Ayırıştırma Süreci

CBS ile elde edilen gebelik oranının düşük olmasının nedeni ayırıştırma işleminden sonra spermatozoa kalitesi ve canlılığının olumsuz etkilenmesidir (Bodmer ve ark., 2005). Konuyu araştıran birçok araştırmacı spermanın ayırıştırma sürecinde spermelerin DNA boyasıyla boyanması, spermin sulandırması, yüksek basınca ve lazer ışıklarına maruz kalması vb. aşamaların spermin kalitesini etkilediğini tespit etmiştir (Garner, 2006; Schenk ve ark., 2009; Seidel ve Garner, 2002; Vazquez ve ark., 2003). Yapılan bir çalışmada Holstein düvelerde ayırıştırma sürecindeki 40 psi basınçla ayırıştırılan CBS ile % 42,3 gebelik oranı elde edilirken, 50 psi basınçla sperma ile % 34,1 gebelik oranı tespit edilmiştir (Schenk ve ark., 2009). Aynı zamanda ayırıştırma süreci sonrasında spermelerde kapasitasyon benzeri değişiklikler olduğu spermanın fertilizasyon ömrünün azaldığı bildirilmektedir (Mocé ve ark., 2006).

2.10.2. Sperma Konsantrasyonu

Ticari olarak CBS payetteki dozu ortalama 2×10^6 'dır. Konvansiyonel sperma ile karşılaştırıldığında ($10-20 \times 10^6$) CBS'nin payetteki konsantrasyonu oldukça düşük kalmaktadır (Frijters ve ark., 2009; Seidel, 2003; Thomas ve ark., 2014). Flow sitometri yöntemiyle CBS'nin ayırıştırma hızı yavaş olmakta ve %75'inden fazlası zayıf olmaktadır. Dolayısıyla ekonomik olarak payet başına ortalama 2 milyon CBS koyulmaktadır (Seidel, 2014). Bu sebeple CBS ile payetteki sperm konsantrasyonunun az olması elde edilen gebeliklerin düşük olmasının nedeni olarak gösterilmektedir (DeJarnette ve ark., 2009; Frijters ve ark., 2009). Konvansiyonel sperma ile karşılaştırıldığında cinsiyeti belirlenmiş

sperma ile gebelik oranları daha düşük tespit edilmiştir (Bodmer ve ark., 2005; Macedo ve ark., 2013; Mallory ve ark., 2013). Dolayısıyla düşük olan bu gebelik sonuçlarının tespit edilmesiyle bazı çalışmalarda payetteki sperma konsantrasyonunun artırılmasıyla gebelik oranlarının artırılması amaçlanmıştır (DeJarnette ve ark., 2010, DeJarnette ve ark., 2011; Schenk ve ark., 2009). Farklı dozlarda ($2,1 \times 10^6$; $3,5 \times 10^6$; 5×10^6) CBS ile gebelik oranları karşılaştırıldığında hem düvelerde hem de ineklerde sperma konsantrasyonunun artırılmasıyla gebelik oranında artış saptanmamıştır (DeJarnette ve ark., 2008; DeJarnette ve ark., 2010). Doz daha da artırılarak yapılan çalışmada, ineklerde CBS konsantrasyonunun 5 kat artırılmasıyla ($2,1 \times 10^6$ ile 10×10^6) gebelik oranında artış sağlanmazken (Schenk ve ark., 2009), düvelerde CBS konsantrasyonunun 5 kat artırılmasıyla gebelik oranı artışı saptanmıştır (DeJarnette ve ark., 2011). CBS beş kat artırıldığında ($2,1 \times 10^6$ ile 10×10^6) gebelik oranında artış (%6) saptansa da maliyet artışından dolayı artırılan dozun ekonomik olmadığı bildirilmiştir (DeJarnette ve ark., 2011; Hall ve ark., 2017; Macedo ve ark., 2013). CBS'nin düşük dozunun gebelik oranının düşük olmasının tek başına sorumlusu olmadığı vurgulanmaktadır (Garner ve Seidel, 2003). Dolayısıyla konsantrasyonunun artırılmasıyla düşük gebelik oranının kompanze edilememektedir (Frijters ve ark., 2009).

2.10.3. Düve veya İneklerde Kullanımı

CBS'nin ineklerdeki kullanım oranı çok düşük olmasına rağmen düvelerde kullanımı yaygındır. Bunun en önemli sebebi düvelerde CBS ile de konvansiyonel sperma ile edilene benzer biçimde gebelik oranlarının ineklere oranla daha yüksek saptanmasıdır (DeJarnette ve ark., 2009; Karakaya ve ark., 2018; Norman ve ark., 2010). Örneğin yapılan bir çalışmada CBS ile ineklerde %17,1; düvelerde %42,1 gebelik oranı rapor edilmiştir (Mellado ve ark., 2014). Bununla birlikte birçok araştırmanın sonuçlarının değerlendirildiği güncel bir derlemede CBS ile düvelerde %31-60 arasında, ineklerde ise %21-25 arasında gebelik elde edildiği bildirilmiştir (Kurykin, 2017). Ayrıca düve ve ineklerin CBS ile tohumlanması sonrasında Holstein düvelerde %45 ve Jersey düvelerde %50 gebelik saptanırken bu oran aynı ırklardaki ineklerde (Holstein ineklerde %27 ve Jersey ineklerde %37) daha düşük belirlenmiştir (DeJarnette ve ark., 2009).

İnek ve düvelerde CBS'nin kullanım oranlarını değerlendirmek amacıyla Amerika'da 2006, 2007, 2008 ve 2015 yıllarında yapılan tüm tohumlamaların incelendiği bir araştırmada, CBS'nin düvelerde kullanımı her geçen yıl katlanarak arttığı saptanmıştır (sırasıyla %1,4; %9,5; %17,8; %31). Ancak ineklerde CBS kullanımındaki artış (%0,1; %0,2; %0,4) düvelerdeki kadar olmamıştır (Norman ve ark., 2010; Hutchison ve Bickhart, 2016). Ayrıca CBS'nin işletmeler arasındaki kullanım oranının farklılık gösterdiği ve hayvan sayısı 501-1000 arasında olan büyük işletmelerde %49, 51-100 arasında olan orta işletmelerde %21 oranında olduğu bildirilmektedir (Hutchison ve Norman, 2009).

CBS'nin düvelerde yaygın kullanılmasının diğer bir nedeni de güç doğum oranının düvelerde ineklere göre daha yüksek olmasıdır (Norman ve ark., 2010). Düvelerde dişi buzağı doğumlarında %3,8 oranında güç doğum görülürken erkek buzağı doğumlarında bu oran %8,0-8,8 arasında tespit edilmiştir. Konvansiyonel sperma kullanıldığında güç doğum düvelerde %6, ineklerde %2,5 saptanırken; CBS kullanıldığında düvelerde %4,3; ineklerde %0,9 tespit edilmiştir (Norman ve ark., 2010).

Bilindiği üzere ikiz doğumlar güç doğum oranını artırmaktadır. CBS ile tohumlama sonrası ikiz doğumlarda %4,4 güç doğum görülürken, konvansiyonel sperma ile tohumlama sonrası ikiz doğumlarda %6,5 güç doğum saptanmıştır. Güç doğum şekillendiğinde erkek buzağılarda dişi buzağılardan %57 daha fazla ölüm şekillendiği bildirilmiştir (Dematawena ve Berger, 1997).

Yapılan bir çalışmada her iki sperma türü karşılaştırıldığında; CBS ile tohumlamalardan elde edilen ikizliklerin %60'ı dişi-dişi, %30'u dişi-erkek, %10'u erkek-erkek tespit edilirken, konvansiyonel sperma ile elde edilen ikizliklerin %29'u dişi-dişi, %46'sı dişi-erkek, %25'i erkek-erkek saptanmıştır (Healy ve ark., 2013). Düvelerin erkek buzağı doğumlarına göre dişi buzağı doğurduklarında güç doğum oranı daha az (1,37 ve 1,68) görülmekle birlikte dişi buzağıların doğuma yardım etmeden daha kolay (%75,6 ve %61,5) doğduğu saptanmıştır (Chebel ve ark., 2010). CBS ile düvelerde %28 ineklerde %64 oranında güç doğumun azaldığı bildirilmiştir (Norman ve ark., 2010).

2.10.4. Tohumlama Sayısı

CBS'nin düvelerde kullanılması birçok çalışmada önerilmesine ek olarak düvelerin sadece ilk tohumlamasında kullanılması tavsiye eden çalışmalar bulunmaktadır (DeJarnette ve ark., 2009; Healy ve ark., 2013; Seidel, 2007). Amerika'daki verilere göre 2008 yılında düvelerde kullanılan CBS'nin %80,5'i birinci tohumlamada kullanılmıştır (Norman ve ark., 2010). Yapılan bir çalışmada birinci tohumlamada %47, ikinci tohumlamada %39, üçüncü tohumlamada %32 gebelik oranı tespit edilmiştir (DeJarnette ve ark., 2009). Başka bir araştırmada birinci tohumlamada %41, ikinci tohumlamada %34, üçüncü tohumlamada %31 gebelik oranı saptanmıştır (Norman ve ark., 2010). Aynı yıl düvelerde yapılan diğer çalışmada da birinci tohumlama %55,3 ikinci tohumlamada %46,1 üçüncü tohumlamada %34,8 gebelik oranı bildirilmiştir (S Filho ve ark., 2010). Düvelerin sadece birinci tohumlamasında kullanılması gebelik oranını artırma stratejisi olarak bildirilmektedir (Healy ve ark., 2013; Seidel, 2007).

2.10.5. Tohumlama Protokolü

Sütçü işletmelerde karlılığı etkileyen en önemli faktör reproduksiyondur. Başarılı bir reproduksiyondan bahsedebilmek için östrusların tespit edilmesi ve yapılan tohumlamadan optimum gebelik elde edilmesi gerekmektedir (Firk ve ark., 2002; DeVries, 2006). Ancak birçok işletmede östrus tespit oranı istenilen düzeyin altında kalmakta hatta bu oran %50'den daha düşük olmaktadır (Senger, 1994). Düveler daha belirgin ve daha uzun östrus gösterdiği için östrus tespit oranı ineklerden daha yüksektir (Nebel ve ark., 1997). Düvelerde yaygın olan reproduktif yönetim, kızgınlığın tespitinden sonra tohumlama yapılmasıdır (Stevenson ve ark., 2008). Reproduktif başarıyı artırmak için östrusları belirli bir zamana toplulaştıran östrus ve ovulasyon senkronizasyon metotları yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Lima ve ark., 2011; Stevenson ve ark., 2008; Wiltbank ve Pursley, 2014). Düvelerde doğal östrusun yanında yaygın şekilde kullanılan östrus senkronizasyonu yöntemi, PGF_{2} ile östrusun indüklenmesidir. Bu amaçla hem doğal prostaglandin (dinoprost) hem de sentetik prostaglandin (cloprostenol) kullanılmaktadır. Farklı prostaglandin türlerinin karşılaştırdığı çalışmalarda; östrusun oluşma zamanı, tohumlanan hayvanların oranı, ortalama tohumlama, gebelik oranları

açısından herhangi bir fark elde edilmemiştir (Martineau, 2003; Répási ve ark., 2005). Düvelerde zaman ayarlı protokollerin kullanım oranı ineklere göre daha azdır. Çünkü östrus takibi sonrası daha yüksek gebelik elde edilmektedir (Jordan ve ark., 2002; Pursley ve ark., 1997; Rivera ve ark., 2004). Daha sonra düvelerde 5 günlük zaman ayarlı protokolün uygulanmasıyla östrus takibi sonrası elde edilene benzer gebelik oranlarına bazı çalışmalarda ulaşılabilmektedir (Kuhn ve ark., 2006; Rabaglino ve ark., 2010)

CBS için doğru zamanda tohumlamanın yapılması, östrus tespitinin doğru bir şekilde yapılması gerekir. Aksi takdirde CBS ile (kısmi kapasitasyon başladığı ve yaşam süresi kısaldığı için) yanlış zamanda yapılan tohumlama fertilizasyon oranını aynı zamanda gebelik oranını düşürecektir (Bodmer ve ark., 2005; Vazquez ve ark., 2003). Dolayısıyla ovulasyon senkronizasyonu yerine östrus senkronizasyonu CBS için önerilmektedir (An ve ark., 2010).

Holstein düvelerde konvansiyonel sperma ile tohumlamalarda elde edilen gebelik oranlarında, östrus gösterenler ile göstermeyenler arasında fark görülmezken, CBS ile östrus gösterenlerde tohumlamada gebelik oranı daha yüksek saptanmıştır (Mallory ve ark., 2013). Ancak Holstein düvelerde östrus gösterenlerde göstermeyenlerin konvansiyonel sperma kullanıldığında gebelik oranı 1,5 katı CBS kullanıldığında 3,4 katı kadarı olduğu tespit edilmiştir (Noonan ve ark., 2016). Bununla birlikte bazı çalışmalarda CBS ile tohumlama sonrası östrus gösterenlerle karşılaştırıldığında östrus göstermeyenlerin gebelik oranları çarpıcı şekilde düşük saptanmıştır (Funston, 2012; Sá Filho ve ark., 2013; Thomas ve ark., 2014). Güncel çalışmalarda da zaman ayarlı tohumlama protokolü uygulanmasına rağmen östrusla tohumlamanın önemi devam etmekte ve tohumlama anında östrus gösterenlerde gebelik oranının daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Colazo ve ark., 2018; Hall ve ark., 2017).

Bununla birlikte östrus belirtilerinin şiddetine göre (vulvadaki ödem, vaginal mukus, vaginada kızarıklık ve serviksteki gevşeme) konvansiyonel ve CBS ile elde edilen gebelik oranları değişmektedir. Holstein düvelerde yapılan çalışmalarda östrus bulguları güçlü olduğunda gebelik oranı daha yüksek tespit edilmiştir (Kurykin ve ark., 2007, Kurykin ve ark., 2016). Tohumlama anında östrus bulgularının değerlendirilmesinin yanında tohumlama öncesinde östrus şiddetinin gebelik oranı üzerine etkisini belirlemek

için östrus takip sistemlerinin de kullanılabilceği belirtilmiştir (Madureira ve ark., 2015; Silper ve ark., 2015). Konvansiyonel sperma ile yapılan çalışmada östrus sırasında yüksek indekse (maksimum östrus indeksi) sahip ineklerde gebelik oranı yüksek (%42,9 ve %28,9) saptanmıştır (Madureira ve ark., 2015). Fakat CBS ile yapılan bir çalışmada maksimum östrus indeksinin gebelik oranını etkilemediği bildirilmiştir (Bombardelli ve ark., 2016).

2.10.6. Boğanın Fertilitesi

CBS ile gebelik oranını etkileyen diğer önemli faktör ise boğa etkisidir. Spermin ayrıştırılmasında fertilitate bazı boğalarda azalırken, bazı boğalarda değişmemektedir (Macedo ve ark., 2013). Tohumlama öncesinde taze spermada işleme, dondurma, depolama, çözdürme gibi birçok aşama gerçekleştiği için boğanın fertilitelerini değerlendirmek zor olmaktadır. Spermanın kullanımına ilişkin birçok ana kriter konulmasına rağmen in vitro bulgular ile in vivo bulgular farklı olabilmektedir (Abdel-Azim, 2010). Dolayısıyla spermanın ayrıştırılma sonrasındaki fertilitate etkisini tohumlama öncesinden değerlendirmek zor olmaktadır. Bununla birlikte çalışmalardaki hayvan sayısı düşük olduğunda boğanın fertilitelerini değerlendirmenin güç olduğu dolayısıyla boğanın fertilitelerini değerlendirebilmek için boğa başına en az 200-300 tohumlama yapılması gerektiği ifade edilmiştir (Amann ve DeJarnette, 2012). Bunun nedeni olarak her bir boğanın sperması ayrıştırma sürecinde farklı derecelerde etkilenmesi olarak gösterilmesidir (Frijters ve ark., 2009; Hall ve ark., 2017).

İneklerde CBS ile yapılan bir çalışmada boğalar arasında fertilitate %11,6-46,1 aralığında tespit edilmiştir (Sá Filho ve ark., 2013). Düvelerde ise cinsiyeti belirlenmiş ve konvansiyonel sperma birlikte değerlendirilerek gebelik oranı %27,3 ile %44,2 arasında tespit edilmiştir (Sales ve ark., 2011). Güncel bir çalışmada farklı boğalara ait CBS ile tohumlama yapıldığında, boğaların yarısından azında %50'nin üzerinde gebelik oranı elde edildiği saptanmıştır (Hall ve ark., 2017). Gebelik sonuçlarının yüksek olduğu bilinen boğaya ait CBS'yi kullanmak fertilitateyi artıracak bir strateji olarak tavsiye edilmektedir (Frijters ve ark., 2009).

2.10.7. Tohumlama Yeri

CBS'nin ayrıştırma sürecinden olumsuz etkilendiği için dışı genital kanalda yaşam süresi kısalmakta ve sperm dozu konvansiyonel spermaya göre düşük kalmaktadır. Yapılan çalışmalarda tohumlama öncesi muhtemel ovulasyonun olacağı ovaryum ultrasonografi veya rektal muayeneye belirlenmektedir. Sonrasında ovulasyon bölgesine yakın (derin intrauterin) yapılan tohumlama ile CBS'nin yol aldığı uterus bölümü azaltılmaya çalışılmaktadır (Chang ve ark., 2017; Kurykin ve ark., 2007). Bazı araştırmacılar muhtemel ovulasyonun olacağı taraftaki kornu uteriye veya uterotubal bölge gibi farklı tohumlama yerlerine yapılan tohumlamanın gebelik oranına etkisini araştırmıştır (Macedo ve ark., 2013). Uterotubal bölgeye yapılan tohumlama spermanın uterustaki mukusla geriye boşalmasına engel olduğu bildirilmiştir (López-Gatius, 2000). Tohumlama yeri bakımından kornu uteriye yapılan tohumlamalar korpus uteriye yapılan tohumlamalara göre alternatif olsa da, gebelik oranlarının değişmediğini rapor eden çalışmalar bulunmaktadır (Seidel ve Schenk, 2008; Verberckmoes ve ark., 2005).

Holstein düvelerde CBS ile korpus uteriye, kornunun ortasına ve uterotubal bölgeye tohumlama yaparak gebelik oranlarını karşılaştırılan çalışmada fark bulunmamıştır (Kurykin ve ark., 2007, Kurykin ve ark., 2016). Başka bir çalışmada Holstein düvelerde CBS ile kornu uteri veya korpus uteriye yapılan tohumlama sonrası gebelik oranları fark tespit edilmemiştir (Ingenhoff ve ark., 2017). Aynı zamanda yapılan bazı çalışmalarda derin kornu uteriye yapılan tohumlamalarda sahada kullanılan tohumlama kateterinden farklı olarak özel tohumlama kateterleri kullanılmıştır (Meirelles ve ark., 2012; Verberckmoes ve ark., 2005). Bu nedenle intrakornual tohumlama yapılırken uterus duvarında perforasyon ve kornu uteriye tutma çabaları esnasında graaf folikülü patlama riski bulunmaktadır (Kurykin ve ark., 2006).

2.10.8. Folikül Çapı

Tohumlama anında graaf folikül çapı fertilitiyi etkileyen faktörler arasında yer aldığı bildirilmektedir (Perry ve ark., 2005). Graaf folikülün çapı östrus davranışını indükleyen östrojen seviyesini etkilemekle birlikte korpus luteumun yapısı ve fonksiyonu için foliküler hücreleri hazırlamasıyla fertilitiyi etkilemektedir (Perry ve ark., 2005;

Vasconcelos ve ark., 2013). Bununla birlikte korpus luteumun yapısının ve serum progesteron konsantrasyonunun graaf folikülün çapıyla ilişkili olduğu, tüm bu karşılıklı etkileşimlerin embriyonik gelişimi ve embriyonun yaşama gücünü etkilediği bazı araştırmacılar tarafından ileri sürülmektedir (Keskin ve ark., 2016; Lopes ve ark., 2007; Lynch ve ark., 2010; Vasconcelos ve ark., 2013;). Yapılan bir çok çalışmada tohumlama anındaki graaf folikülün çapının gebelik oranı üzerine etkisi araştırılmıştır (Pereira ve ark., 2013; Wiltbank ve ark., 2011). Bazı çalışmalar tohumlama anındaki büyük çaptaki graaf folikülün gebelik oranını artırdığını rapor etmiştir (Perry ve ark., 2005; Perry ve ark., 2007; Vasconcelos ve ark., 2001). Graaf folikülün çapı arttıkça östradiol ve progesteron konsantrasyonu artmaktadır (Lopes ve ark., 2007; Vasconcelos ve ark., 2001). Aynı zamanda yüksek östradiol seviyesinin reproduktif kanalda sperm/oosit taşınmasını artırdığı bildirilmiştir (Hawk, 1983; Keskin ve ark., 2016; Perry ve Perry, 2008). Diğer taraftan bazı çalışmalarda ise büyük çaptaki foliküllerde, folikülün dominantlık süresinin uzadığı, buna bağlı oositin yaşlandığı ve fertilitenin düştüğü tespit edilmiştir. Dolayısıyla tohumlama anındaki küçük çaptaki folikülle fertilitenin daha yüksek olduğunu ileri süren çalışmalar da vardır (Bleach ve ark., 2004; Lynch ve ark., 2010; Townson ve ark., 2018; Vasconcelos ve ark., 1999; Wiltbank ve ark., 2011). Bununla birlikte foliküler çapın gebelik oranlarını etkilemediğini bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (Hillegass ve ark., 2008). Konvansiyonel sperma ile yapılan tohumlamalarda gebelik oranını etkileyen bir faktör olarak graaf folikülün çapı değerlendirilmesine rağmen CBS ile yapılan çalışmalarda bu faktörün değerlendirildiği sınırlı çalışma bulunmaktadır (Chang ve ark., 2017; Filho ve ark., 2012; Ingenhoff ve ark., 2017). Etçi ineklerde tohumlama anında 9 mm çapından büyük ve küçük graaf foliküle sahip olan ineklerin konvansiyonel sperma ile tohumlanması sonrası elde edilen gebelik oranları sırasıyla %58,9 ve %49,5 iken CBS ile tohumlama sonrası ise %56,8 ve %31,2 tespit edilmiştir (Filho ve ark., 2012). Holstein düvelerde CBS ile yapılan çalışmada 18-22 mm çapa sahip graaf folikülü olan düvelerde 17mm'den küçük ve 23 mm'den büyük graaf foliküle sahip düvelere göre gebelik oranı daha yüksek (%37,4; %29,2) saptanmıştır (Ingenhoff ve ark., 2017).

2.10.9. Embriyonik ölüm

CBS ayırıştırma sürecinden etkilendiği için düşük gebelik oranlarının sebebinin artan embriyo ölümü olabileceği araştırılmıştır (Bodmer ve ark., 2005; Jevgeni Kurykin, 2017; Karakaya ve ark., 2014; Seidel ve Garner, 2002). Toplanan ve transfer edilebilir embriyo sayısı açısından karşılaştırıldığında konvansiyonel sperma ile elde edilen embriyo oranları CBS'den daha yüksek olmuştur (Peippo ve ark., 2009; Sartori ve ark., 2004; Schenk ve ark., 2006). Fertilize olan embriyo sayısının azalması ve dejenere embriyo sayısının artması hem fertilizasyon hem de sperma hasarına bağlı embriyo gelişimiyle ilişkilendirilmiştir (Sartori ve ark., 2004; Schenk ve ark., 2006). Spermanın ayırıştırma sürecinden etkilenmesinin yanında superovulasyon protokollerinde de tohumlama zamanının hatalı olması embriyo üretiminin düşük olmasını etkileyen bir faktör olarak gösterilmektedir (An ve ark., 2010; Kurykin, 2017). Süperovulasyon protokolü uygulanmış düvelerde sabit zamanda tek sefer tohumlama yapıldığında, aslında CBS ile doğru zamanda tohumlama yapılmadığı belirtilmiştir (Schenk ve ark., 2006). Tablo 4'de belirtildiği üzere, yapılan bir derlemede CBS ile tohumlama sonrası embriyonik ölüm oranı birçok çalışmada sayısal artış gösterse de istatistiki anlamlılık saptanmamıştır (Kurykin, 2017).

Tablo 4. Etçi ve sütçü ırklarda CBS ile tohumlamayı takiben embriyonik ve fetal ölümler (Kurykin, 2017)

IRKLAR	SPERMA TÜRÜ		REFERANSLAR
	CBS	KS	
Angus ve Holstein düve	%8,8	%6,2	Seidel ve ark., 1999
Brown Swiss ve Red Holstein düve	%11,1	%0,0	Bodmer ve ark., 2005
Brown Swiss ve Red Holstein inek	%17,2	%5,5	Bodmer ve ark., 2005
Holstein-Friesian inek	%3,1	%5,8	Andersson ve ark., 2006
Angus inek	%2,0	%5,0	Seidel, Schenk 2008
Holstein inek	%9,5	%5,5	Schenk ve ark., 2009
Holstein, Jersey ve Danish Red düve	%4,5	%2,3	Borchersen, Peacock 2009
Holstein düve	%10,6	%7,4	Chebel ve ark., 2010
Holstein düve	%6,1	%6,5	Healy ve ark., 2013
Holstein-Friesian inek	%19,1	%4,8	Karakaya ve ark., 2014
Toplam	%9,2	%4,9	

CBS: Cinsiyeti Belirlenmiş Sperma; KS: Konvansiyonel sperma

CBS ile tohumlamanın embriyonik ölüm oranı üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmalarda 30. gün ve 60. gün arasında gebelik kaybının CBS ile arttığını tespit eden çalışmalar bulunsa da (Bodmer ve ark., 2005; Karakaya ve ark., 2014; Seidel ve ark., 1999), istatistiki farkı değerlendirebilmek için daha büyük popülasyonu kapsayan hayvanlar üzerinde çalışmaların yapılması gerektiği bildirilmiştir (Seidel ve Garner, 2002).

2.10.10. Sıcaklık stresi

Sıcak aylarda ortaya çıkan sıcaklık stresi direkt veya indirekt olarak ineklerin beslenme, reproduktif, fizyolojik, sağlık ve davranışsal parametrelerini etkilemektedir. İneklerin yatma davranışının değişmesinin yanında östrustaki ineklerin atlama ve durma davranışının azaldığı bildirilmiştir (Allen ve ark., 2015; Cook ve ark., 2007; Schüller ve ark., 2017). Dolayısıyla sıcaklık stresi altında östrus tespit oranının azaldığı bildirilmektedir (Peralta ve ark., 2005). Bununla birlikte sıcaklık stresinin ana etkisi folikül gelişimi, sperma ile oosit canlılığı, embriyo gelişimi ve yaşama gücü ve hormon konsantrasyonları üzerine olmaktadır (De Rensis ve Scaramuzzi, 2003). Sıcaklık stresiyle birlikte östrusta folikülün dominantlığı baskılanmasıyla folikül çapının azaldığı, östradiol, LH ve takiben şekillenen CL'dan salgılanan progesteron konsantrasyonlarının düştüğü bildirilmiştir (Wilson ve ark., 1998; Wolfenson ve ark., 2000). Bunun yanı sıra sıcaklık stresi spermanın ve oositin canlılığını etkilemektedir (Ravagnolo ve Misztal, 2002). Sıcaklık stresinin etkilediği ineklerde etkilenmeyenlere göre gebelik oranı %10-30 daha düşük tespit edilmektedir (Cavestany ve Foote, 1985; De Rensis ve Scaramuzzi, 2003). Sıcaklık stresinin etkisini değerlendirmek için yaygın olarak Sıcaklık Nem İndeksi (SNİ) kullanılmaktadır (Cook ve ark., 2007; Healy ve ark., 2013; Ravagnolo ve ark., 2000; Schüller ve Heuwieser, 2016; West, 2003). SNİ eşik değerinin hesaplanması sıcaklık stresi sonrasında ineklerdeki fizyolojik değişim hakkında objektif bir fikir vermektedir (Schüller ve Heuwieser, 2016). SNİ hesaplaması için hayvanların barındığı ahırlardaki SNİ verilerinin yanı sıra en yakın meteorolojik istasyon verileri kullanılmaktadır (Schüller ve ark., 2014). Sıcaklık stresinden sağlıklı hayvanların etkilenmemesi için SNİ değerinin 68 ve altında olması istenmektedir. SNİ değeri 68 ile 74 aralığında olduğunda sıcaklık stresi

etkisini göstermektedir (De Rensis ve ark., 2015). Yapılan farklı çalışmalarda gebelik oranına etki eden sıcaklık stresinin başladığı SNİ eşik değeri 72 olarak belirlenmiştir (Garcia-Ispuerto ve ark., 2018; Morton ve ark., 2007; Schüller ve ark., 2014).

CBS ile sıcaklık stresinin etkisini değerlendiren çalışmalar sınırlı kalmaktadır (Chang ve ark., 2017; Healy ve ark., 2013; Karakaya ve ark., 2014; Mellado ve ark., 2014). Holstein düvelerde CBS ile yapılan bir çalışmada sıcak aylarda SNİ değerindeki her 10 birim artışın gebelik oranında yaklaşık %10 azalmaya neden olduğu rapor edilmiştir (Healy ve ark., 2013). Holstein düvelerde yapılan başka bir çalışmada ise sıcak aylarda cinsiyeti belirlenmiş ve konvansiyonel sperma ile benzer gebelik oranları elde edilmiştir (Mellado ve ark., 2014). Diğer bir çalışmada düvelerde sıcak ve soğuk sezon karşılaştırıldığında sıcaklık stresi altında gebelik oranlarında azalma saptanmazken (Chang ve ark., 2017), ineklerde sıcak sezonda hem CBS hem de konvansiyonel sperma ile tohumlama sonrası gebelik oranlarının azaldığı bildirilmiştir (Karakaya ve ark., 2014).

2.10.11. Tohumlayıcı etkisi

Tohumlayıcının gebelik oranı üzerine etkisi aynı zamanda tohumlayıcının bilgi, beceri ve deneyimine bağlı olduğu bildirilmektedir (Chebel ve ark., 2010; Healy ve ark., 2013; Ingenhoff ve ark., 2017; Seidel ve Schenk, 2008). Örneğin, tecrübe farkı olan iki tohumlayıcının karşılaştırıldığı bir çalışmada tecrübeli tohumlayıcının gebelik oranı diğerine göre daha yüksek (39,6 ile 32,6) tespit edilmiştir (Vartia ve ark., 2017). Çalışmaların bazılarında tohumlayıcı etkisi, spermanın tohumlama öncesi doğru hazırlanması ve tohumlamadaki tüm sürece etkisi işletme faktörü olarak değerlendirilmiştir (DeJarnette ve ark., 2011; Kurykin ve ark., 2016). Tohumlayıcı etkisinin önemli olduğu bir nokta da inek veya düvelerin yanlış zamanda tohumlanmasıdır. Örneğin yapılan bir çalışmada yapılan tohumlamaların %14,5'inde progesteron konsantrasyonunun 10 ng/ml üzerinde olduğu ve tüm tohumlamaya çağrılan hayvanların %44'ünün gebe olduğunu tespit edilmiştir (Sturman ve ark., 2000). Finlandiya'da tohumlayıcı teknisyenler ile fertilité uzmanlarının yaptığı tohumlamalar karşılaştırıldığında, grup farketmeksizin ineklerin %7,7'sinin progesteron konsantrasyonu 10 ng/ml üzerinde olmasına rağmen tohumlamaya çağrıldığı bildirilmiştir (Vartia ve ark.,

2017). CBS ile gebelik oranına etki eden birçok faktörü değerlendirerek sürülerdeki gebelik oranlarının farklılığına dikkat çeken araştırmacılar bu farklılığın tohumlayıcı etkisinden de kaynaklanabileceğini bildirmiştir (Abdel-Azim, 2010).

2.10.12. Tohumlama Zamanı

Tohumlama sonrası fertilizasyon ve dolayısıyla gebelik elde edebilmek için dişi genital kanalda spermayı ve oositi doğru zamanda bir araya getirmek gerekir. Bu da ancak doğru tohumlama zamanı ile mümkündür (Roelofs ve ark., 2006). Ovulasyon östrus başladıktan 24-32 saat sonra şekillenmektedir (Ijaz ve ark., 1994; Walker ve ark., 1996). Oositi fertilize edecek sperma dişi genital kanalda yaklaşık 24-30 saat canlı kalırken, oositin yaşam ömrü sadece 6-12 saat olarak tespit edilmiştir (Roche, 2006). Kısacası spermanın yaşam ömrü uzun ancak oositin yaşam ömrünün kısadır. Optimum gebelik elde edebilmek için bu süreleri dikkate alarak tohumlama zamanı belirlenmelidir (Hockey ve ark., 2010). Dolayısıyla tohumlama zamanı gebelik oranını etkileyen en önemli faktörlerden birisidir (Carvalho ve ark., 2014; Roelofs ve ark., 2006;).

Konvansiyonel sperma ile ideal tohumlama zamanının ortaya konduğu çalışmalardan bu yana 75 yıl geçmiştir. İdeal tohumlama zamanı östrus takibi sonrası davranışsal östrusun bitmesinden birkaç saat önce olarak belirtilmiştir (Trimberger ve Davis, 1943). Bu çalışmalar sonrasında tohumlama zamanının belirlenmesinde sabah akşam kuralı geliştirilmiştir (Trimberger, 1948). Östrus takip sistemi ile yapılan kapsamlı bir çalışma sonrası en yüksek gebelik oranının ilk durma davranışı sonrası 4-12. saatler arasında elde edildiği bildirilmiştir (Dransfield ve ark., 1998). Konvansiyonel sperma ile östrus başlangıcından 12 saat sonra veya ovulasyondan 12-24 saat önce tohumlamayı öneren benzer çalışmalar bulunmaktadır. Fertilizasyon kaybının tüm fertilitate kaybı içinde yüzdesi düşük görünmesine rağmen, doğru zamanda yapılmayan tohumlamanın erken embriyonik ölümleri artırdığı ve fertilitateyi azalttığı bildirilmiştir (Carvalho ve ark., 2014; Dalton ve ark., 2001; Roelofs ve ark., 2006). Dolayısıyla ovulasyon zamanının tahmin edilerek doğru tohumlama zamanının belirlenmesi ile gebelik oranının artırılacağı belirtilmiştir (Hockey ve ark., 2010). Yapılan bir çalışmada primipar ineklerde östrus başlangıcından 13-16 saat sonra, multipar ineklerde östrus başlangıcından 12 saate kadar

tohumlama yapıldığında en yüksek gebelik oranı elde edilmiştir (Stevenson ve ark., 2014). Başka bir çalışmada ise östrus başlangıcından 5-17 saat aralığının optimal tohumlama zamanı olduğu bildirilmiştir (Roelofs ve ark., 2015).

CBS'nin ayırıştırma sürecindeki fiziksel ve kimyasal stres spermaya zarar verdiği (özellikle akrozom membranında), kısmi olarak kapasitasyonu başlattığı ve spermanın kapasitasyonunu hızlandırdığı bildirilmiştir (Garner, 2006; Lu ve Seidel, 2004; Schenk ve ark., 2009; Vazquez ve ark., 2003). Bununla birlikte ayırıştırma sürecinin genital kanalda spermanın yaşam süresini kısalttığı rapor edilmiştir (Maxwell ve ark., 2004; Mocé ve ark., 2006; Peippo ve ark., 2009). Spermanın yaşam süresi kısaltıldığı için doğru zamanda tohumlama yapılmadığında gebelik oranının düşmesi beklenmektedir (Bodmer ve ark., 2005; Peippo ve ark., 2009). Dolayısıyla konvansiyonel sperma ile yapılan çalışmalarda belirtilmiş olan ovulasyon zamanına göre tohumlama yapılması, CBS kullanımında daha kritik bir önem taşımaktadır (Schenk ve ark., 2009).

Nelore ırkı ineklerde zaman ayarlı tohumlama protokolünde (0. gün 3mg progesteron kulak implantı ve 5mg östradiol valerat, 9. gün kulak implantı çıkarılıp 400 IU eCG, 11.gün 100 µg GnRH) progesteron kaynağı çıkarıldıktan sonra 36. saatte yapılan tohumlamada %5,8; 48. saatte tohumlananlarda %20,8; 60. saatte tohumlananlarda %30,9 gebelik oranı tespit edilmiştir. Bununla birlikte tohumlama saati ile ovulasyona kadar geçen zamanın 0-12 saat aralığında olanlarda %37,9; 12-24 saat kalanlarda %19,4; 24 saatten fazla olanlarda %5,8 gebelik oranı bildirilmiştir (Sales ve ark., 2011). Aynı çalışmada Jersey düvelerde zaman ayarlı protokolünde (0. gün 1g progesteron ve 2 mg östradiol benzoat, 8. gün progesteron kaynağı çıkarılıp 0,25 mg PGF_{2α} ve 300IU eCG, 9.gün 1 mg östradiol benzoat) progesteron kaynağı çıkarıldıktan CBS tohumlama saatinin 6 saat (54 ve 60) ötelenmesiyle gebelik oranının arttığı (%16,2 ve %31,4) saptanırken konvansiyonel sperma ile tohumlananlarda (%50,5 ve %51,8) bu artış görülmemiştir (Sales ve ark., 2011). Melez ineklerde zaman ayarlı tohumlama protokolü sonrası östrus göstermeyen ineklerde tohumlama saatinin 20 saat ötelenmesi gebelik oranında artışa (%3 ve %36) neden olmuştur (Thomas ve ark., 2014). Holstein ve melezlerinde CBS ile progesteron kaynağı çıkarıldıktan 50 saat sonrası yapılan tohumlamalarda gebelik oranı artmasına rağmen konvansiyonel sperma ile tohumlama zamanının ötelenmesi gebelik

oranını değiştirmemiştir (Noonan ve ark., 2016). Yapılan bir çalışmada tohumlama ile ovulasyon arası sürenin özellikle zaman ayarlı protokol uygulandığında gebelik oranını etkilediği bulunmuştur. CBS ile tohumlamadan 12 saat içinde ovulasyon yapanlardaki gebelik oranı, 24-36 saat arasında ovulasyon yapanlardan daha yüksek bildirilmiştir (Colazo ve Mapletoft, 2017). Angus Hereford melezi etçi ineklerde zaman ayarlı tohumlama protokolü ile tohumlama zamanı 8 saat ertelendiğinde östrus gösterenlerin oranı artmasına rağmen gebelik oranı (%35,4 ve %34,8) artmamıştır (Hall ve ark., 2017).

Angus düvelerde zaman ayarlı protokolde (0. gün 100µg ve 1,38 g progesteron, 7. gün progesteron kaynağı çıkarılıp 25 mg PGF_{2α}) progesteron kaynağı çıkarıldıktan 55-56 saatler arasında yapılan tohumlamada gebelik oranı %34,0 saptanırken, 67-68. saatler arasında yapılan tohumlamada gebelik oranı %46,0 tespit edilmiştir. Angus düvelerde yapılan başka bir çalışmada tohumlama zamanı değerlendirildiğinde östrus başlangıcından 0-12 saat arasında tohumlananlarda gebelik oranı %25,0; 18-24 saat arasında tohumlananlarda gebelik oranı %55,0 bildirilmiştir (Schenk ve ark., 2009). Jersey düvelerde östrus başlangıcından 12-16 saat sonra yerine 16-24 saat aralığında tohumlama yapıldığında gebelik oranının arttığı tespit edilmiştir (Sá Filho ve ark., 2010). Jersey ineklerde yapılan bir retrospektif çalışmada 3 saatten az sürede, 4-12; 13-22; 23-41. saatler arasında ve 42. saatten sonra tohumlama yapıldığında; gebelik sonuçları sırasıyla %20,0; %30,6; %44,3; %48,9; %40,0 bulunmuştur. Çalışma sonucunda Jersey ineklerde CBS ile östrus başladıktan sonraki 23-41. saatlerde yapılan tohumlamada gebelik oranının arttığı tespit edilmiştir (Bombardelli ve ark., 2016).

Tohumlama zamanının önemini ilişkin, cinsiyeti belirlenmiş ve konvansiyonel sperma arasında fizyolojik heterojenite bulunmaktadır. Konvansiyonel spermada farklı alt grupların olduğu ve tohumlama sonrası spermaların farklı zamanlarda fertilizasyona hazır oldukları bildirilmiştir. Bir ejakulatın sperma popülasyonundaki bu çeşitlilik tohumlama zamanından ovulasyon zamanı ve fertilizasyon zamanına kadar esneklik sağlamaktadır (Rodrguez-Martnez, 2006). Fakat sperma içerisindeki alt grup heterojenitesi CBS için değişmektedir. Bu sperma popülasyonundaki heterojenitenin değişimi fertilitenin azalmasına neden olacağı belirtilmiştir. Aynı zamanda östrus başlangıcından sonra tohumlama zamanının geciktirildiğinde gebelik oranındaki değişimler, CBS'deki

heterojenitenin konvansiyonel spermadaki ile aynı olmadığını kanıtı olarak gösterilmiştir (Vishwanath ve Moreno, 2018).

CBS'nin ayırıştırma sürecinde yaşam süresi azalmaktadır. CBS ile farklı ırklarda yapılan çalışmalarda geç tohumlama ile gebelik oranının arttığı birçok araştırmada tespit edilmiştir (Bombardelli ve ark., 2016; Maxwell ve ark., 2004; Sá Filho ve ark., 2010; Sales ve ark., 2011). Gebelik oranını artırmak için fertilizasyon anında canlı sperm sayısını artırmak gerektiği dolayısıyla fertilizasyon oranını artırmak için tohumlama zamanının ötelenmesinin kritik bir karar olduğu bildirilmiştir (Saacke, 2008). Konvansiyonel sperma için ayarlanan optimal tohumlama zamanı CBS için optimal zaman olmadığı vurgulanmaktadır (Thomas ve ark., 2014). Kapasitasyon için CBS daha az zamana ihtiyaç duymaktadır dolayısıyla geç tohumlananlarda gebelik oranı daha yüksek tespit edilmiştir (Sales ve ark., 2011).

2.11. Cinsiyeti Belirlenmiş Sperma ve Konvansiyonel Sperma ile Tohumlama Sonrası Doğan Buzağların Karşılaştırılması

Flow sitometri, spermanın cinsiyetinin ayırıştırılmasında en güvenilir yöntem olarak bildirilmesine rağmen (Seidel, 2007), ayırıştırma sürecinde CBS'nin DNA'sında hasar şekillendiği bildirilmiştir (Vazquez ve ark., 2003). Dolayısıyla CBS ile gebelik oranlarının düşük olmasında bu hasarın etkisinin olabileceği bildirilmiş ve iki muhtemel sebep ileri sürülmüştür. Birincisinde ayırıştırma sürecindeki hasar spermanın DNA'sında olup abortus ve konjenital anomalilere neden olduğu için reproduktif parametreler düşmektedir. İkincisi ise hasarın spermanın fonksiyonlarında olduğu ve yaşama ömrünün azalmasına bağlı reproduktif parametreler azalmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda ayırıştırma sürecindeki hasarın spermanın DNA'sında değil, spermanın fonksiyonlarında meydana geldiği tespit edilmiştir (Vazquez ve ark., 2008). Buna rağmen ayırıştırma sürecinin spermaya verdiği hasar söz konusu olduğundan, CBS ile tohumlama sonrası doğan buzağlar araştırıldığında herhangi bir anomaliye rastlanılmamıştır (Seidel ve Garner, 2002). Aynı zamanda CBS ile konvansiyonel spermadan doğan buzağların doğum ağırlığı, doğum kolaylığı, buzağların yaşama gücü, neonatal ölüm oranı açısından herhangi bir fark bulunmamıştır (Tablo 5). Ancak buzağı cinsiyetine bağlı farklılık ortaya

konmuş; dişi buzağuların 2,4 kg daha düşük doğum ağırlığına sahip olduğu, dişi buzağularda güç doğum daha az (1,15 ve 1,30) görüldüğü tespit edilmiştir (Tubman ve ark., 2004).

Tablo 5. Cinsiyeti belirlenmiş sperma (CBS) ve konvansiyonel sperma (KS) ile tohumlamadan doğan yavruların karşılaştırılması (Tubman ve ark., 2004).

Parametreler	KS	CBS
Buzağı sayısı (n)	1158	787
Abort oranı (%)	4,5	5,0
Gebelik süresi (gün)	279	279
Neonatal ölüm (%)	3,5	4,0
Doğum kolaylığı skoru	1,2	1,2
Doğum ağırlığı (kg)	33,9	34,1
Sütten kesmede yaşama gücü (%)	91,7	91,5
Sütten kesme ağırlığı (kg)	239,0	241,0

2.12. Yeni Teknoloji İle Cinsiyeti Belirlenmiş Sperma ve Yapılan Çalışmalar

Cinsiyeti belirlenmiş sperma ile elde edilen gebelik oranlarının düşük olmasının sebebi en çok tartışılan konu olmuştur. Birçok çalışma gebelik oranlarının düşük olmasının sebebi olarak ayırıştırma sürecindeki fiziksel ve kimyasal etkilenmeyi işaret etmektedir (Garner, 2006; Schenk ve ark., 2009; Seidel ve Garner, 2002). Spermanın ayırıştırma ve dondurulmasını da kapsayan süreçte, CBS'nin hazırlanması 21 aşamadan oluşurken, konvansiyonel spermanın hazırlanması 3-4 aşamadan oluşmaktadır. Dolayısıyla CBS ayırıştırma sürecinde bir çok işleme maruz kalmaktadır (Vishwanath ve Moreno, 2018). Ancak güncel çalışmalarda, flow sitometri tekniğinde (XY teknolojisi) spermanın hazırlanması, toplanması ve dondurulması aşamaları revize ve standardize edildiği bildirilmiştir (Vishwanath ve Moreno, 2018). Özellikle spermanın ayırıştırma sürecinde sıcaklık ve pH'ın stabilize edildiği, oksidatif hasarın azaltıldığı rapor edilmiştir. Eski XY teknolojisiyle hazırlanmış CBS'nin ayırıştırma süreci güncellenmiş ve SexedULTRA™ teknolojisi olarak adlandırılmıştır (Gonzalez-Marín ve ark., 2018; Vishwanath ve Moreno, 2018). Bu yeni teknoloji, XY teknolojisi ile karşılaştırıldığında sperm motilitesinin ve akrozom bütünlüğünün arttığı bildirilmiştir (Gonzalez-Marín ve ark., 2016). Yeni teknolojiyle ayırıştırılmış CBS ile yapılan kapsamlı iki saha çalışmasında

XY teknolojisine göre gebelik oranında %4,5 ile %7,4 artış tespit edilmiştir (Vishwanath, 2014; Lenz ve ark., 2016). XY metoduyla ayrıştırılan CBS ile payetteki sperma konsantrasyonunu artırarak düşük gebelik oranını kompanze edemeyeceği geçmişteki araştırmalarda bildirilmiştir (DeJarnette ve ark., 2010; Schenk ve ark., 2009). Fakat ayrıştırma sürecinin standardize edilmesinin ardından, yeni teknolojiyle ayrıştırılan CBS'nin tohumlama dozu artırıldığında (4×10^6) CBS ve konvansiyonel sperma ile benzer gebelik oranı (SexedULTRA™ %66,7 ve konvansiyonel %66,5) tespit edilmiştir (Lenz ve ark., 2016). Elde edilen veriler doğrultusunda, sonraki süreçlerde ticari olarak payetler 4×10^6 konsantrasyonda CBS içermektedir. Cinsiyeti Belirlenmiş Sperma 2017 yılından itibaren piyasaya sperm dozunu da ifade eden SexedULTRA-4M™ adıyla sunulmuştur (Vishwanath ve Moreno, 2018). Yeni teknoloji ile zaman ayarlı protokol ile tohumlama sonrası östrus göstermeyenlerde konvansiyonel sperma ile CBS arasında ciddi bir fark (%62,8 ve %38,7) tespit edilirken, östrus gösterenlerde bu farkın (%63,8 ve %61,9) kapandığı bildirilmiştir (Crites ve ark., 2018). Aynı zamanda, östrus gösteren hayvanlarda doğru zamanda tohumlama yapıldığında CBS ile konvansiyonel sperma arasındaki fertilité açığı kapanabileceği bildirilmiştir (Crites ve ark., 2018; Vishwanath ve Moreno, 2018).

Sonuç olarak, CBS ile konvansiyonel sperma arasındaki gebelik oranları arasındaki farkın önemli sebeplerinden birisi ayrıştırma sürecinde spermada şekillenen hasar olduğu bildirilmiştir. Ayrıştırma sürecindeki yenilikle ve standardizasyonla bu fark azaltılmaya çalışılsa da ayrıştırma sürecinde spermanın yaşam ömrü kısalmaktadır ve optimum gebelik oranlarının elde edilebilmesi için tohumlama zamanı kritik öneme sahiptir. Yeni teknoloji ile ayrıştırılmış CBS ile yapılmış çalışmaların sınırlı olmasının yanı sıra araştırma konusu olan östrus takibi sonrası tohumlama saatinin gebelik oranı üzerine etkisinin araştırıldığı literatüre rastlanmamıştır. Sunulan bu çalışmada Holstein düvelerde SexedULTRA teknolojisi ile ayrıştırılmış CBS kullanarak östrusun farklı saatlerinde tohumlama sonrası optimum gebelik oranının elde edileceği tohumlama saatinin ortaya konması amaçlandı.

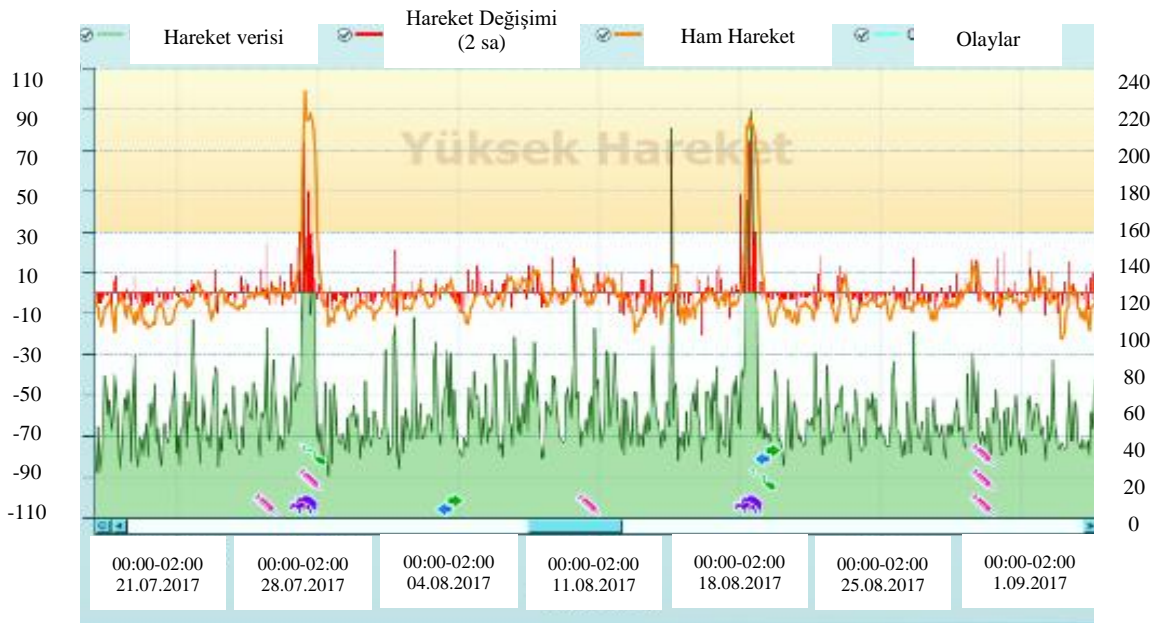
3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hayvan Materyali, Barındırma ve Besleme

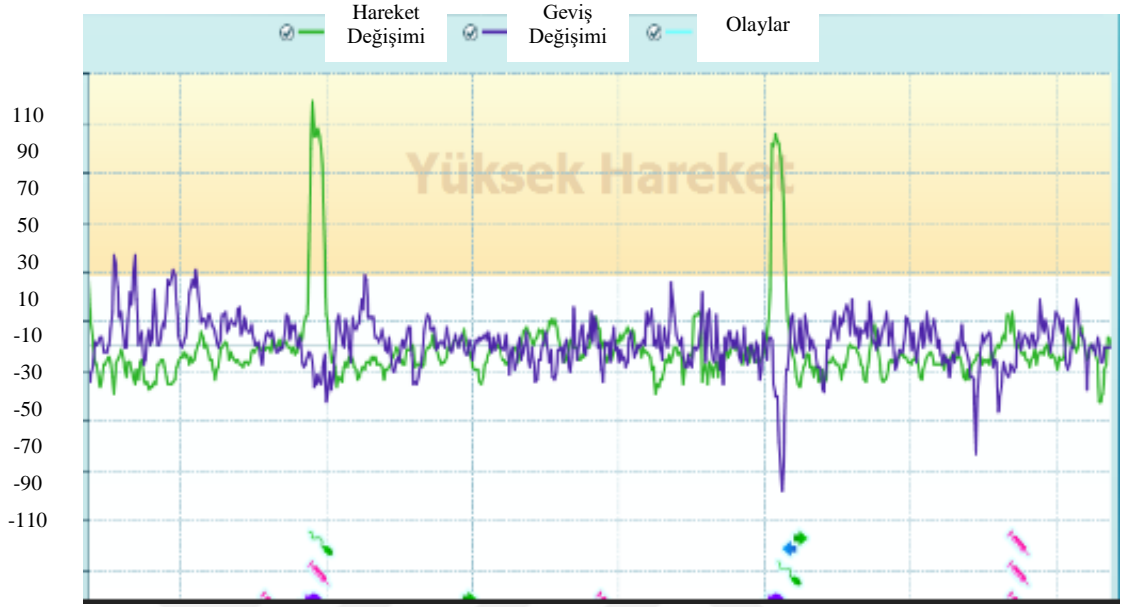
Bursa Uludağ Üniversitesi Etik Kurulunun 15.11.2016 tarihli toplantısı ve 2016-13/01 nolu kararı ile etik açıdan uygun olduğu belirlenen bu çalışma hastalıklardan arı (Brusella ve Tüberküloz) 1000 sağmallık sütü bir işletmede Mayıs 2017 ile Nisan 2018 tarihleri arasında yapıldı. Çalışmaya 299 adet herhangi bir sağlık problemi olmayan, 13 ay ve üzeri yaşta Holstein ırkı düve dahil edildi. Yaş gruplarına göre sınıflandırılmış düveler serbest dolaşım alanı olan bölmelerde barındırıldı. İşletmede düvelerin rasyonu National Research Council (NRC) programı ile hazırlandı. Düvelere hazırlanan rasyon günde 3 defa, su ise ad libitum verildi. Çalışmaya dahil edilen düvelerin (n=196) vücut ağırlıkları; cidago yüksekliği, sağrı yüksekliği, vücut uzunluğu ve göğüs çevresi ölçülerek ağırlıkları hesaplandı (Wangchuck ve ark., 2018). Sıcaklık stresinin etkisini sıcak ve serin dönemlerde karşılaştırmak amacıyla çalışmada tohumlamaların yapıldığı Haziran-Ağustos ayları arası sıcak dönem, Eylül- Mayıs ayları arası serin dönem olarak belirlendi. Aynı zamanda sıcaklık stresinin etkisini belirlemek için Sıcaklık-Nem İndeksi (SNİ) hesaplandı (Schüller ve ark., 2016). Meteoroloji Genel Müdürlüğü'nden çalışmanın yapıldığı zaman aralığındaki günlük ortalama sıcaklık ve nem değerleri alınarak SNİ belirlendi. SNİ'nin belirlenmesinde Schüller ve ark (2016)'nın bildirdiği hesaplama yöntemi kullanıldı. Tohumlama zamanında maksimum SNİ değeri 72'nin üzerinde olduğunda sıcaklık stresinin etkili olduğu kabul edildi (Garcia-Isperto ve ark., 2018; Schüller ve ark., 2016).

3.2. Östrus Takip Sistemi

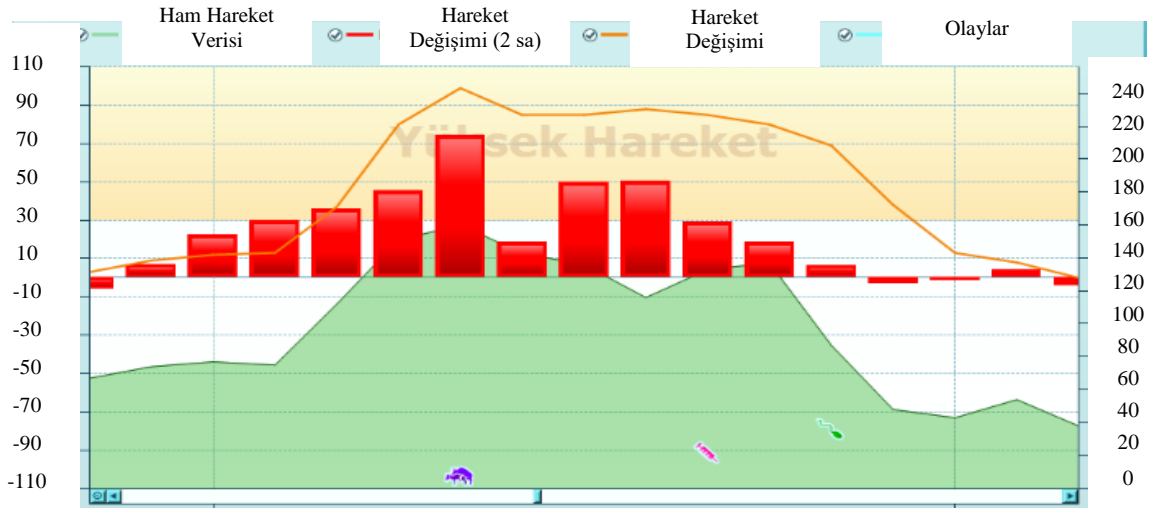
İşletmedeki düveler 13 aylık olduklarında aktivite-ruminasyon boyun kolyeleri (SCR Dataflow II, Netanya, İsrail) takıldı. Boyun kolyeleri takıldıktan sonra 7 gün içerisinde takip sisteminin kendi algoritmasını oluşturmasını takiben östrusla ilişkili veriler bilgisayar yardımıyla takip edildi (Şekil 7). Tüm düvelerin östrus grafikleri aktive artışı ile ruminasyonun düşmesi arasındaki negatif korelasyon belirlenerek doğrulandı (Şekil 8). Çalışmaya dahil edilen tüm düvelerin östrus başlangıç saati, östrus gösterme süresi, östrusta pike ulaştığı saati ve indeks değeri SCR Dataflow II östrus takip sistemi ile yapıldı. Östrus indeksi 0-100 arasında değişmekle birlikte 35-100 arası değer yüksek östrus indeksi olarak SCR sistemi tarafından değerlendirilmektedir. Aktivitenin 35 üzeri değerinde olduğu ilk saat östrusun başlangıç saati ve tekrar 35 altında olduğu ilk saat östrusun bitiş saati olarak kabul edilmektedir (Bombardelli ve ark., 2016). Şekil 9'da gösterildiği üzere östrus süresi boyunca pik indeksi, maksimum östrus indeksi olarak kabul edildi (Madureira ve ark., 2015). Düvelerin östrus boyunca maksimum östrus indeksinin 35-89 aralığı düşük, 90-100 aralığı yüksek olarak değerlendirildi (Madureira ve ark., 2015).



Şekil 7. SCR takip sisteminde bir düveye ait bireysel sayfada östrus grafikleri



Şekil 8. Östrustaki bir düvenin bireysel sayfasında aktivite ve ruminasyon arasındaki negatif korelasyon



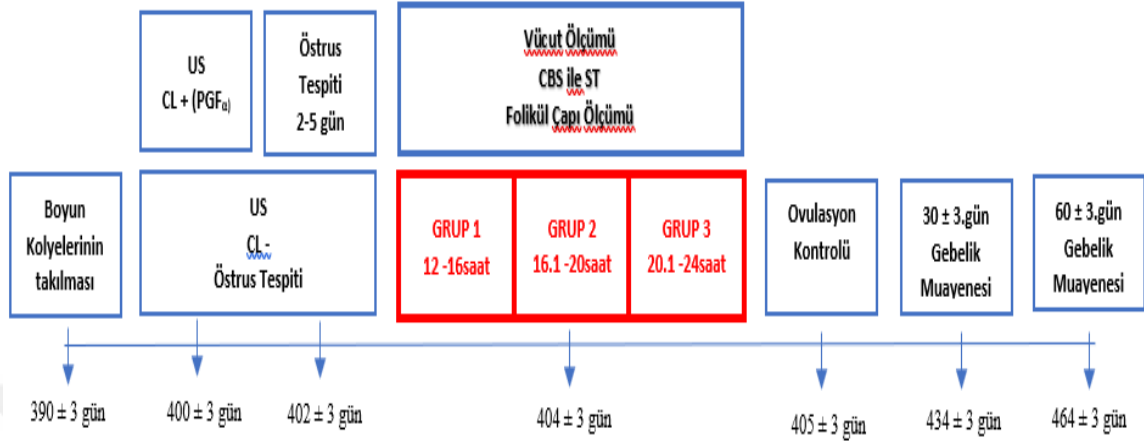
Şekil 9. SCR takip sisteminde östrus grafiğinde 2 saatlik verilerin ve maksimum östrus indeksinin görüntülenmesi

3.3. Deneme Grupları

Östrus gösterdikleri tespit edilen düveler tohumlamadan önce rastgele üç gruba ayrıldı. Grup1'deki düveler (n=100) östrus başlangıcından itibaren 12-16. saatler arasında, Grup2'deki düveler (n=100) östrus başlangıcından itibaren 16,1-20. saatler arasında, Grup3'deki düveler ise (n=99) östrus başlangıcından itibaren 20,1-24. saatler arasında tohumlandı. Çalışma dizaynı Şekil 10'da gösterilmektedir.

Çalışmanın materyalini doğal östrusu takiben tohumlanan düveler (n=127) ile haftalık muayenelerde korpus luteuma sahip olduğu belirlenen ve tek sefer PGF_{2α} (25 mg dinoprost trometamol, Enzaprost, CEVA, Türkiye) ile östrus induksiyonu sonrası tohumlanan düveler (n=172) deneme gruplarına homojenliği sağlamak amacıyla eşit sayıda dağıtmaya özen gösterildi.

Tohumlamada yeni teknoloji (SexedULTRA™) ile ayrıştırılmış 3 farklı boğaya (Sperma A, Sperma B, Sperma C) ait 0,25 ml payetlerde en az 4×10^6 konsantrasyonda (sırasıyla $6,4 \times 10^6$; $5,67 \times 10^6$; $6,12 \times 10^6$) spermatozoa içeren CBS (Sexing Technologies™, Teksas, Amerika) kullanıldı. Payetlerdeki motil spermatozoa sayısı sırasıyla $3,2 \times 10^6$; $2,27 \times 10^6$; $2,45 \times 10^6$ bulunmaktaydı. Deneme grupları arasında homojenliği sağlamak adına eşit sayıda dağıtımına özen gösterildi (Sperma A, B, C için, sırasıyla Grup 1'de n=34;34;32, Grup2'de n=31;33;36 Grup3'de n=34;34;31). Östrus başlangıcı belirlendikten sonra deneme gruplarına eşit şekilde dağılmasına özen gösterilerek 5 farklı tohumlayıcı tarafından (sırasıyla tohumlayıcı A: n=61, tohumlayıcı B: n=71; tohumlayıcı C: n=57; tohumlayıcı D: n=60; tohumlayıcı E: n=50) donmuş CBS payetleri 37°C sıcaklıkta 30 saniyede çözdürülerek korpus uteriye bırakıldı.



Şekil 10. Çalışma grubundaki düvelerde farklı zamanlarda tohumlamanın ve yapılan uygulamaların sematik görünümü

*US muayeneleri

- Korpus luteum muayenesi (400±3 gün)
- Graaf folikü çapının ölçümü (ST anında-404±3 gün)
- Ovulasyon Kontrolü (ST sonrası 12 saat aralıklarla)
- 30. gün Gebelik Muayenesi
- 60. gün Gebelik Muayenesi

3.4. Ultrasonografik muayeneler

Düvelerin ultrasonografik muayeneleri transrektal linear proba sahip bir ultrason aracılığıyla gerçekleştirildi (Ibex™ 7,5 MHz Linear transducer, E.I. Medical Imaging, Kolorado, Amerika). Çalışma, düveler 12 aylık yaşa geldiğinde boyun kolyeleri takılmasını takiben başlatıldı. Haftalık muayeneler ile tohumlama yaşına gelen (ort. 400 günü dolduran) düvelerin ovaryumları ultrasonografik olarak korpus luteum varlığı yönünden muayene edildi (Şekil 10). Ovaryum üzerinde luteal dokunun sınırları belirgin olduğunda ve çevre dokulardan kesin olarak ayırt edilebildiğinde hipoekojenik görüntüsü alınan kaviteli veya trabekuluma sahip yapı korpus luteum olarak değerlendirildi (Cairolı ve ark., 2006). Ovaryumlarında korpus luteuma sahip olan düvelere östrus indüksiyonu uygulandı.

Ultrasonografik muayeneler tohumlama anında graaf folikül çapının ölçülmesi amacıyla tekrarlandı (Şekil 10). Ultrasonografik muayene sırasında ovaryum üzerinde saptanan graaf folikülün en geniş çaplı ve net görüntüsü tespit edildikten sonra görüntü donduruldu ve folikülün en geniş yatay ve dikey uzunlukları ölçülüp ortalaması alınarak graaf folikül çapı belirlendi (Keskin ve ark., 2016). Bununla birlikte gruplarda ovulasyonun teyiti için gruplardan rastgele düve seçilerek bir alt grup (n=68) oluşturuldu (Grup1, n=21; Grup2, n=26; Grup3, n=21). Alt grup olarak belirlenen düvelerin tohumlamayı takiben ovulasyon kontrolleri 12 saat aralıklarla olmak üzere günde iki defa ultrasonografi ile yapıldı (Sá Filho ve ark., 2010). Takip eden ultrasonografik muayenelerde graaf folikülün bulunduğu ovaryum üzerinde folikülün ortadan kaybolması ovulasyonun gerçekleşmesi olarak kabul edildi (Perry ve ark., 2005).

Düvelerin birinci gebelik muayenesi tohumlama sonrası 30 ± 3 . günde ve ikinci gebelik muayenesi 60 ± 3 . günde ultrasonografi ile yapıldı. Gebe tespit edilen düve sayısının tohumlanan düve sayısına bölünmesiyle gebelik oranı hesaplandı. Birinci gebelik muayenesinde gebe olduğu belirlenen düvenin ikinci gebelik muayenesinde gebe olmadığı saptanması gebelik kaybı olarak değerlendirildi.

3.5. İstatistiki Analizler

Gruplardaki düvelerin yaş, beden ölçüleri (cidago yüksekliği, sağrı yüksekliği, göğüs çevresi, vücut uzunluğu), canlı ağırlıkları ve maruz kaldıkları sıcaklık nem indeksi (SNİ) verilerinin karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi kullanıldı. Analizde post test olarak varyansların homojen olup olmaması dikkate alınarak Tukey HSD testi seçildi.

Verilerin (folikül çapı, maksimum östrus indeksi, östrus süresi, PGF_{2α} enjeksiyonu ile östrus başlangıcı arasındaki süre, östrus başlangıcı ile tohumlama arasındaki süre, tohumlama ile ovulasyon arasındaki süre, iki östrus (tohumlama anındaki östrus ile çevirdikleri östrus) arasındaki süre) deneme grupları karşılaştırmalarında GLM prosedürüne göre Univariate analiz kullanıldı. Analizde Full Factorial model seçilirken, post test olarak Tukey seçildi ve ana etkiler karşılaştırılırken güven aralığı düzeltmesi için LSD kullanıldı. Modele deneme grupları için SNİ ve boğa kovaryans olarak girildi.

Oransal verilerin karşılaştırılmasında Ki-kare testi kullanıldı. Sonuçların nemlilik düzeyleri için Pearson Chi-Square ya da Fisher's Exact Test dikkate alındı. Önemlilik düzeyi olarak tüm analizler için $p < 0.05$ düzeyi dikkate alındı. Tüm istatistiki analizler SPSS paket programı (version 23.0, SPSS Inc, Amerika) kullanılarak gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

4.1. Genel Sonuçlar

Çalışmaya dahil edilen düvelere ait (Grup1, Grup2 ve Grup3) yaş, canlı ağırlık, cidago ile sağrı yüksekliği, göğüs çevresi ve vücut uzunluğu açısından fark olmadığı tespit edildi (Tablo 6).

Tablo 6. Deneme grupları arasında düvelerin genel parametrelerinin karşılaştırılması

Parametreler	Grup 1 Ortalama \pm S.H.	Grup 2 Ortalama \pm S.H.	Grup 3 Ortalama \pm S.H.	P
Yaş (gün) n=299	405,90 \pm 1,75	402,10 \pm 1,81	404,05 \pm 1,90	0,44
Cidago yüksekliği (cm) n=196	131,52 \pm 0,47	131,30 \pm 0,28	131,96 \pm 0,37	0,30
Sağrı yüksekliği (cm) n=196	140,11 \pm 0,48	140,67 \pm 0,37	141,03 \pm 0,41	0,27
Göğüs çevresi (cm)n=196	176,23 \pm 0,66	175,86 \pm 0,61	177,04 \pm 0,64	0,39
Vücut uzunluğu (cm) n=196	147,14 \pm 0,52	147,80 \pm 0,49	147,21 \pm 0,43	0,60
Canlı Ağırlık (kg) n=196	417,45 \pm 4,56	419,89 \pm 3,59	425,06 \pm 4,18	0,39

Çalışmada tüm düvelerin %57,5'i (172/299) PGF_{2 α} uygulaması sonrası tohumlanırken; %42,5'i doğal östrus sonrası tohumlandı. Korpus luteuma sahip düvelerin östrus indüksiyonu sonrası %87,8'i (172/196) östrus gösterdi ve tohumlandı. Östrus indüksiyonu sonrası östrus göstermeyen/saptanamayan düveler %12,2 (24/196) olarak belirlendi. Östrus indüksiyonu yapılan tüm düveler (Grup farketmeksizin) değerlendirildiğinde PGF_{2 α} uygulaması ile östrus başlangıcı arası ortalama süre 50,43 \pm 1,23 saat olarak tespit edildi. Deneme grupları arasında ise PGF_{2 α} uygulaması ile östrus başlangıcı arası ortalama süre (Grup1'de 50,50 \pm 2,25 saat; Grup2'de 49,79 \pm 2,04 saat; Grup3'de 51,08 \pm 2,17 saat) arasında fark saptanmadı ($p>0,67$).

4.2. Genel Gebelik Oranı ve Gebelik Kaybı Oranı

Çalışmada deneme grupları dikkate alınmaksızın CBS ile yapılan tohumlama sonrasında tüm düvelerde; gebelik oranı 30.gün gebelik muayenesinde %52,2 (156/299), ikinci gebelik muayenesinde %50,2 (150/299) tespit edildi. Birinci gebelik muayenesi ile ikinci gebelik muayenesi arasında saptanan gebelik kaybı oranı %3,8 (6/156) olarak belirlendi.

4.3. Deneme Gruplarında Gebelik Oranları

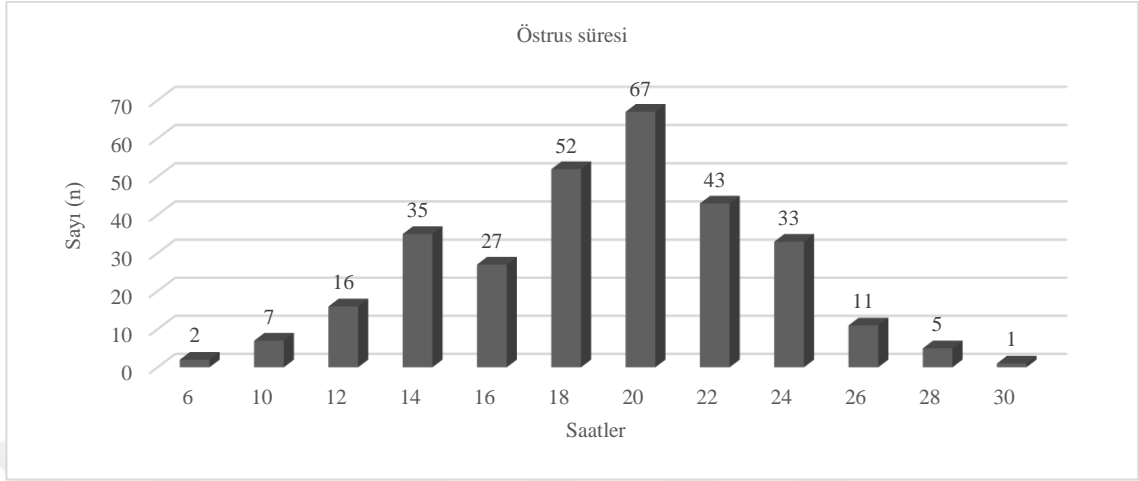
Deneme gruplarında tohumlama sonrası elde edilen gebelik oranları Tablo 7’de verilmektedir. Gruplar arasında gebelik oranları benzer bulundu. Ancak Grup3’te bulunan ve östrus başlangıcından itibaren 20,1-24. saatlerde tohumlanan düvelerde elde edilen gebelik oranları diğer gruplara göre sayısal olarak yüksek bulunmasına rağmen (yaklaşık %10) istatistiki fark belirlenmedi. Aynı zamanda gebelik kaybı bakımından gruplar arasında fark tespit edilmedi.

Tablo 7. Cinsiyeti belirlenmiş sperma ile farklı saatlerde tohumlamanın, tohumlama başına gebelik oranları ve gebelik kaybı oranları üzerine etkisi

Parametreler	Grup 1 % (n/n)	Grup 2 % (n/n)	Grup 3 % (n/n)	P
Gebelik /ST (30. Gün)	49,0 (49/100)	49,0 (49/100)	58,6 (58/99)	>0,29
Gebelik/ST (60. Gün)	49,0 (49/100)	47,0 (47/100)	54,5 (54/99)	>0,54
Gebelik Kaybı	0,0 (0/49)	4,1 (2/49)	6,9 (4/58)	>0,18

4.4.Östrus Gösterme Süresinin Gebelik Oranı Üzerine Etkisi

Şekil 11’de deneme grupları dikkate alınmaksızın tüm düvelerin östrus gösterme süresinin saatlere göre dağılımı gösterilmektedir. Tohumlama sonrası gebe kalan düvelerin östrus gösterme süresinin (19,41±0,33 saat) gebe olmayan düvelere (18,45±0,35 saat) göre daha uzun ($p=0,046$) olduğu saptandı.



Şekil 11. Çalışmaya dahil edilen Holstein ırkı düvelerin östrus gösterme süreleri

4.5. Deneme Gruplarında Östrus-Tohumlama ve Tohumlama-Ovulasyon Arası Süreler

Çalışmanın amacına uygun olarak tohumlamalar östrus başından itibaren ortalama Grup 1’de $14,10 \pm 0,12$, Grup 2’de $17,98 \pm 0,10$ ve Grup 3’de $22,30 \pm 0,13$. saatte gerçekleştirildi. Deneme grupları arasındaki östrus süresi, iki östrus arası süre ve tohumlama ile ovulasyon arasındaki süreler Tablo 8’de gösterilmiştir. Deneme grupları arasında ortalama östrus süresi açısından fark tespit edilmedi. Gruplar arasında iki östrus arası süre açısından fark belirlenmedi. Sunulan çalışmada Grup 3’teki yani geç tohumlanan düveler diğer gruptaki düvelere istatistiki olarak ovulasyona daha yakın zamanda tohumlanmıştır ($p=0,001$)

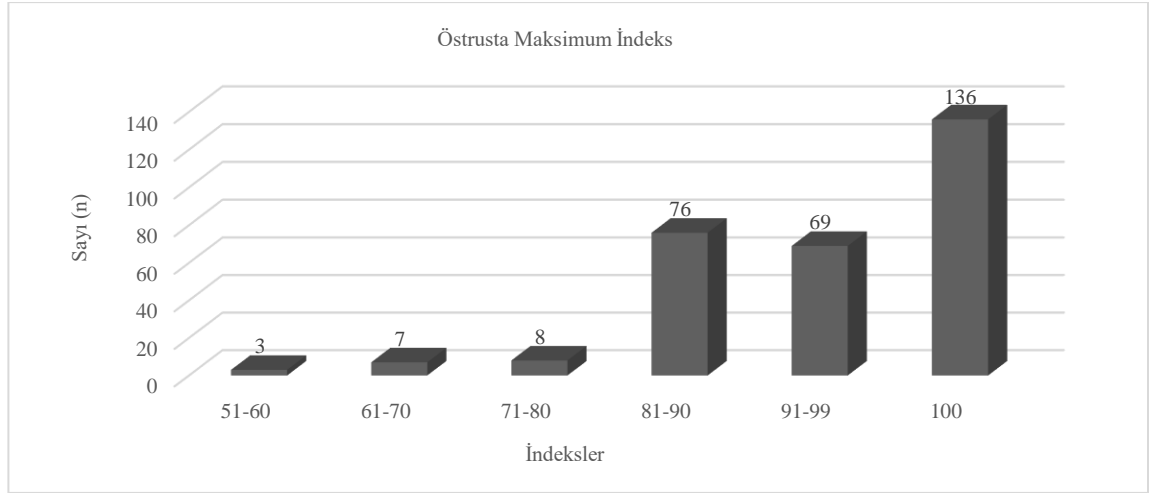
Tablo 8. Deneme gruplarına göre östrus-tohumlama-ovulasyon zamanlarının dağılımı

Parametreler	Grup 1 Ortalama + S.H.	Grup 2 Ortalama + S.H.	Grup 3 Ortalama + S.H.	P
Östrus süresi (saat)	$18,82 \pm 0,43$	$18,68 \pm 0,43$	$19,35 \pm 0,40$	$>0,25$
Tohumlama-ovulasyon arası süre (saat)	$19,76 \pm 1,62^a$	$16,42 \pm 1,35^{ab}$	$13,90 \pm 0,67^b$	0,003
İki östrus arası süre (gün)	$21,71 \pm 0,63$	$22,45 \pm 0,91$	$21,21 \pm 0,80$	$>0,28$

a, b; $p < 0,05$

4.6. Maksimum Östrus İndeksinin Gebelik Oranı Üzerine Etkisi

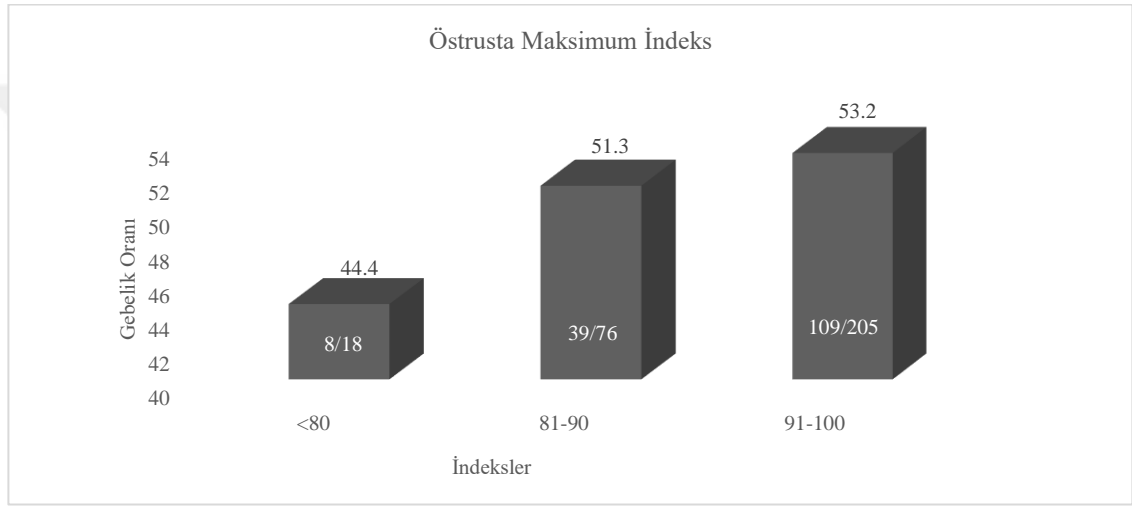
Östrus boyunca düvelerin göstermiş oldukları maksimum östrus indeksi dağılımı Şekil 12’de gösterilmiştir. Deneme grupları arasında maksimum östrus indeksi açısından fark tespit edilmedi (Tablo 9) ($p>0,16$). Ancak östrus başlangıcını takiben tohumlama zamanı ilerledikçe gruplarda östrus indeksinin azaldığı tespit edildi (Tablo 9, $p<0,001$). Östrus boyunca maksimum östrus indeksi ortalama $93,42\pm 0,51$ belirlenirken, Madureira ve ark., (2015)'na göre sınıflandırıldığında; yüksek (90-100) ve düşük (35-89) olan gruplar arasında (Tablo 10) gebelik oranı (yüksek indekste %52,3; 113/216 ve düşük indekste %51,8; 43/83) değişmediği saptandı ($p=0,93$). Bununla birlikte maksimum östrus indeksi değeri <80, 81-90 ve 91-100 değerleri arasında sınıflandırıldığında %94'nün (281/299) 80'in üzerinde maksimum östrus indeks değerine sahip olduğu tespit edildi. Maksimum östrus indeksi <80 olanların gebelik oranı ile karşılaştırıldığında 81-90 ve 91-100 arasında indekse sahip olanların gebelik oranında yaklaşık %8 artış (sırasıyla %44,4; 8/18, %51,3; 39/76, %53,2; 109/205) olmasına rağmen istatistikî fark saptanmadı (Şekil 13) ($p=0,47$). Ayrıca 30. gün gebelik muayenesinde gebe olan ve gebe olmadığı saptanan düvelerin östrusları boyunca ulaştığı maksimum östrus indeksi arasında fark bulunmadı (gebe olmayan düvelerde $93,26\pm 0,74$; gebe düvelerde $93,58\pm 0,72$) ($p=0,76$).



Şekil 12. Östrus boyunca ulaşılan maksimum östrus indeksi

Tablo 9. Deneme gruplarına göre östrustaki ve tohumlama anındaki maksimum östrus indeksi

Parametreler	Grup 1 (Ortalama \pm S.H.)	Grup 2 (Ortalama \pm S.H.)	Grup 3 (Ortalama \pm S.H.)	P
Maksimum Östrus İndeksi	92,25 \pm 0,98	93,96 \pm 0,79	94,07 \pm 0,89	>0,16
Tohumlama Anındaki Östrus İndeks	63,17 \pm 3,22	37,99 \pm 3,45	12,28 \pm 2,38	<0,001



Şekil 13. Maksimum östrus indeksinin (<80 ve >80) gebelik oranı üzerine etkisi

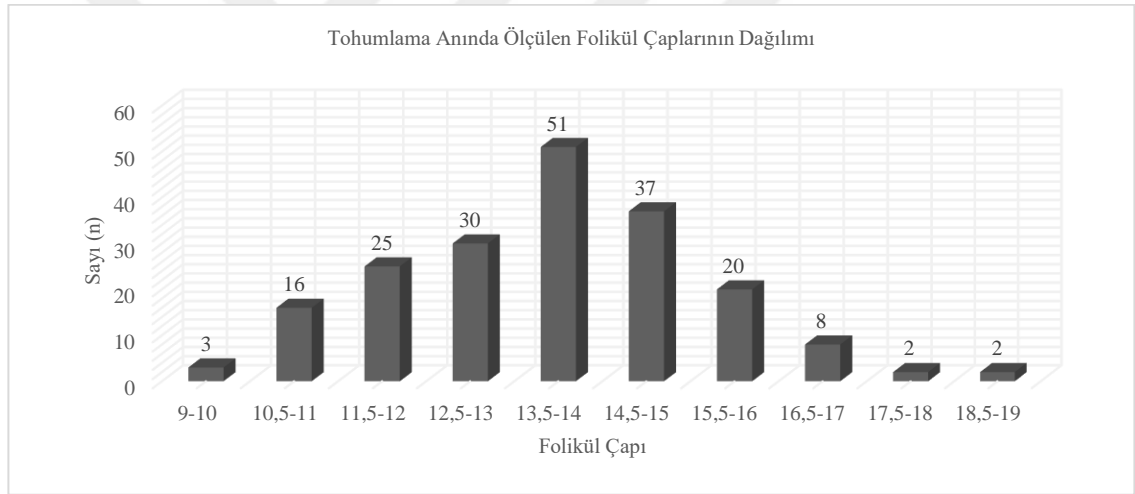
Tablo 10. Maksimum östrus indeksinin gebelik oranı üzerine etkisi

Maksimum Östrus İndeksi*	Ortalama \pm S.H.	Gebelik Oranı %	P
35-89	81,69 \pm 0,97	51,8 (43/83)	0,93
90-100	97,93 \pm 0,60	52,3 (113/216)	

*Maksimum Östrus İndeksi gruplandırması için Madureira ve ark. (2015) referans alınmıştır.

4.7. Graaf Folikül Çapının Gebelik Oranı Üzerine Etkisi

Tohumlama anında ölçülen graaf folikül çaplarının dağılımı Şekil 14’de verilmektedir. Çalışmada deneme grupları dikkate alınmaksızın ortalama folikül çapı $13,63 \pm 0,12$ mm olarak tespit edildi. Gruplar arasında ortalama folikül çapı Grup1’de $13,38 \pm 0,18$ mm; Grup2’de $13,94 \pm 0,23$ mm; Grup3’de $13,57 \pm 0,23$ mm belirlenirken gruplar arasında folikül çapının benzer olduğu tespit edildi ($p=0,18$). Bununla birlikte folikül çapı ortalama değerin altında kalan foliküller küçük, üstünde kalanlar büyük olarak sınıflandırıldığında küçük ve büyük olarak iki ayrı grupta sınıflandırıldığında küçük ve büyük folikül çapına sahip düvelerin gebelik oranı arasında fark saptanmadı (Tablo 11) ($p=0,46$).



Şekil 14. Tohumlama anında ölçülen graaf folikül çaplarının sayısal dağılımı

Tablo 11. Tohumlama anında ölçülen graaf folikül çapının gebelik oranı üzerine etkisi

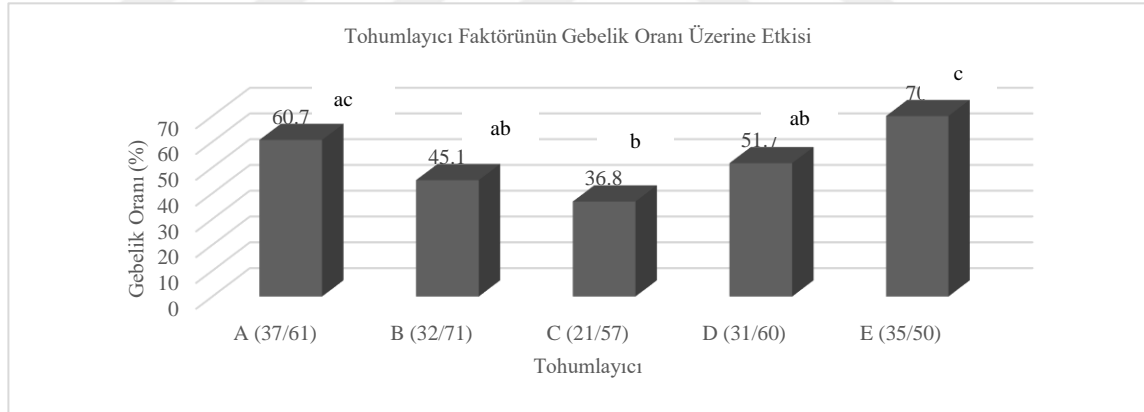
Folikül Çapı	Ortalama \pm S.H.	Gebelik oranı %	P
Küçük (<13,63 mm)	$12,27 \pm 0,11$	48,5 (48/99)	0,46
Büyük (>13,63 mm)	$15,03 \pm 0,11$	43,2 (41/95)	

4.8. Boğa Etkisinin Değerlendirilmesi

Çalışmaya dahil edilen düvelerin tohumlanmasında kullanılan 3 farklı (Sperma A, Sperma B, Sperma C) boğaya ait spermanın gebelik oranı üzerine etkisi değerlendirildiğinde boğalar arasında farklılık saptandı ($p<0,02$). Sperma C ile tohumlama sonrası elde edilen gebelik oranı (%65,6; 65/99) sperma A (%41,4; 41/99) ve Sperma B'ye (%49,5; 50/101) göre daha yüksek ($p<0,02$) bulundu.

4.9. Tohumlayıcıların Gebelik Oranı Üzerine Etkisi

Tohumlayıcıların elde ettiği gebelik oranı Şekil 15'de gösterilmektedir. Tohumlayıcılar arasında en yüksek gebelik oranı E tohumlayıcısında (%70,0; 35/50) belirlenirken en düşük gebelik oranı C tohumlayıcısında (%36,8; 21/57) saptandı. Tohumlayıcının gebelik oranı üzerine etkisi değerlendirildiğinde tohumlayıcılar arasında fark tespit edildi ($p<0,05$).



^{a,c}: Aynı sütünde farklı üst indislerle işaretlenen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir ($p<0,05$).

Şekil 15. Tohumlayıcıların gebelik oranları

4.10. Sıcaklık Stresinin Gebelik Oranı Üzerine Etkisi

Sıcaklık-Nem İndeksi (SNİ) deneme grupları arasında değerlendirildiğinde Grup1'de $58,91 \pm 1,45$; Grup2'de $56,38 \pm 1,75$ ve Grup3'de $56,77 \pm 1,85$ hesaplanırken, gruplar arasında fark bulunmadı ($p > 0,54$). Bununla birlikte deneme grupları dikkate alınmaksızın tüm düveler değerlendirildiğine SNİ'nin 72'den yüksek olduğunda gebelik oranı düşmesine rağmen Tablo 12'de gösterildiği gibi fark saptanmadı ($p = 0,78$).

Mevsimin gebelik oranı üzerine etkisi değerlendirildiğinde sıcak dönem olarak tanımlanan Haziran-Ağustos ayları arası SNİ $70,93 \pm 0,23$ ile serin dönem olarak tanımlanan Eylül-Mayıs ayları arası SNİ $55,37 \pm 0,59$ olarak belirlendi. Serin dönem ile sıcak dönem arasında birinci ($p = 0,52$) ve ikinci ($p = 0,68$) gebelik muayenesinde elde edilen gebelik oranları arasında ve gebelik kaybı bakımından fark bulunmadı ($p = 0,43$) (Tablo 13).

Tablo 12. Sıcaklık nem indeksinin gebelik oranı üzerine etkisi

SNİ	Ortalama \pm S.H.	30. gün Gebelik Muayenesi % (n/n)	P
Düşük (<72), n=263	$58,73 \pm 0,58$	52,5 (138/263)	0,78
Yüksek (>72), n=36	$73,39 \pm 0,18$	50,0 (18/36)	

Tablo 13. Mevsimin gebelik oranı üzerine etkisi

Gebelik Oranları / Mevsim	Sıcak % (n/n)	Serin % (n/n)	P
Gebelik /ST (30. Gün)	49,4 (47/95)	53,4 (109/204)	0,52
Gebelik/ST (60. Gün)	48,4 (46/95)	51,0 (104/204)	0,68
Gebelik kaybı	2,1 (1/47)	4,8 (5/104)	0,43

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, Holstein düvelerde CBS ile östrus başlangıcından sonra farklı saatlerde yapılan tohumlamanın gebelik oranı üzerine etkisi değerlendirildi. Yapılan çalışma sonucunda gelişen teknolojilerle ayrıştırılan CBS kullanımında optimum gebelik oranlarının elde edilebilmesi için ideal tohumlama saatinin belirlenmesi hedeflendi.

Hayvancılık sektöründe spermada cinsiyetin belirlenmesi biyoteknolojinin bir parçası olarak kabul edilmektedir. Spermanın ayrıştırılmasını takiben ortalama %90 doğrulukta istenilen cinsiyette sperma hazırlanabilmektedir (DeJarnette ve ark., 2008; Garner ve Seidel, 2003). Bu da sütçü bir işletmede CBS kullanımı sonrası doğan buzağların yaklaşık %90'ının dişi olacağı anlamına gelmektedir (Butler ve ark., 2014; DeJarnette ve ark., 2008). İşletmede dişi buzağı sayısının artması; genetik ilerlemeyi hızlandırması, gönüllü sürüden çıkarmaya imkân sunarak radikal kararların işletmede alınabilmesi, sürüden çıkan hayvanların yerine damızlıkların yetiştirilebilmesi, biyogüvenlik problemlerinin önüne geçilmesi, gelişmekte olan işletmelere damızlık hayvan satışıyla karlılığı artırması gibi birçok avantajı barındırmaktadır. Tüm bu avantajlarıyla CBS sütçü işletmeler için yaygınlaşan bir teknoloji uygulaması haline gelmektedir (Butler ve ark., 2014; Carvalho ve ark., 2014; De Vries ve ark., 2008; Hietala ve ark., 2014; Hohenboken, 1999; Holden ve Butler, 2018). Yukarıda verilen bilgiler ışığında CBS kullanımı Türkiye hayvancılığının geleceği açısından önemli hale gelmektedir. Örneğin Türkiye İstatistik Kurumu'nun 2017 verilerine göre Türkiye farklı ülkelerden yaklaşık 667.000 baş boğa altı damızlık hayvan ithal ederken yaklaşık 723 milyon dolar para harcamıştır (TÜİK, 2018). Benzer şekilde kırmızı et açığı yine ithalat ile karşılanmaktadır. Bundan dolayı CBS kullanımı hem sütçü işletmelerin hem de ülke damızlık ihtiyacının karşılanması ve genetik ilerlemenin hızlandırılması bakımından en iyi çözüm yollarından birisi olabilir. Ayrıca ülkemiz sınırları içerisinde damızlık ihtiyacının karşılanması, ithalat ile ülkemize girebilecek hastalıklara karşı biyogüvenliğin korunması açısından önemli bir adımdır. Bununla birlikte Dünyada "CBS'nin fertiliteye

etkisi” bir araştırma konusu olarak güncelliğini korurken (Holden ve Butler, 2018; Kurykin, 2017; Vishwanath ve Moreno, 2018), bu konu ile ilgili Türkiye’de yapılmış sadece iki çalışma (Karakaya ve ark., 2014; Karakaya ve ark., 2018) bulunmaktadır. Dolayısıyla bu konuda daha fazla çalışmaya ihtiyaç doğmuştur.

Ancak CBS kullanımının yaygınlaşmasını sınırlandıran iki önemli sebep bildirilmiştir. Sperma maliyetinin fazla ve gebelik oranlarının düşük olması bu sebepleri oluşturmaktadır (Boro ve ark., 2016; Carvalho ve ark., 2014; Seidel, 2003). Maliyetin fazla olmasının en önemli nedeni, ayırıştırma sürecine giren spermaların sadece %20’sinin ticarileşebilmesidir (Garner ve Seidel, 2003). Konvansiyonel ve CBS kullanımı sonrası elde edilen gebelik oranları karşılaştırıldığında; CBS ile tohumlama sonrası gebelik oranı daha düşük (konvansiyonel spermanın %75-80’i kadar) elde edilmektedir (Vishwanath ve Moreno, 2018). Yapılan bir çalışmada Holstein düvelerde CBS kullanımı sonrasında ortalama %45 (%27 ile %70 arasında) gebelik oranı belirlenirken, konvansiyonel sperma sonrası ortalama %56 (%34 ile %83 arasında) gebelik oranı saptanırken CBS kullanımına bağlı olarak gebelik oranının %11 azaldığı rapor edilmiştir (DeJarnette ve ark., 2009). Benzer şekilde düvelerde CBS ile tohumlama sonrası %40 gebelik oranı elde edilirken, konvansiyonel spermada bu oran %56 olarak tespit edilmiştir (Noonan ve ark., 2016). Holstein düvelerde yapılan başka bir çalışmada, CBS kullanımı sonrası gebelik oranı %51,5 saptanmıştır (Cerchiaro ve ark., 2007). Sunulan bu çalışmada CBS kullanımı sonrası tüm düvelerde saptanan gebelik oranı %52,2 tespit edildi. Çalışmada buzağılama oranı %47,8 (143/299) olarak belirlenirken doğan buzağuların %97,2’sinin (139/143) dişi olduğu saptandı. Sunulan çalışmada elde edilen gebelik oranı ve buzağılama oranı CBS ile Holstein düveler üzerinde yapılan birçok çalışma sonucuyla karşılaştırıldığında (Chebel ve ark., 2010, %38,2; DeJarnette ve ark., 2011, %38,0; Healy ve ark., 2013, %31,6; %38,0; Noonan ve ark., 2016, %40,3; Norman ve ark., 2010, %39,0) yüksek belirlendi. Yapılan çalışmada gebelik oranlarının daha yüksek çıkmasında; daha iyi bakım-besleme koşullarına sahip gen kaynağı iyi düvelerin çalışma materyalini oluşturması, SexedULTRA-4M teknolojisinin kullanılması, östrus başlama zamanının aktivite ölçer ile kesin olarak belirlenmesi ve östrus sonrası ilk tohumlamanın yapılması gibi birçok faktörün etkili olduğu kanısına varılmıştır.

Konvansiyonel spermaya göre CBS ile tohumlama sonrası gebelik oranlarının düşük olmasında, tek başına veya birlikte, birçok faktör etkili olabilmektedir (Colazo ve ark., 2018; Kurykin ve ark., 2007; Mellado ve ark., 2014; Miura ve Izumi, 2018; Sá Filho ve ark., 2010). Gebelik oranının düşmesinde en büyük sebebin CBS'nin ayrıştırma sürecinde oluşan fiziksel ve kimyasal hasar olduğu bildirilmiştir (Schenk ve ark., 2009; Seidel, 2007; Seidel, 2014; Vishwanath ve Moreno, 2018). Ancak güncel çalışmalarda SexedULTRA™ olarak adlandırılan bir teknoloji ile spermanın ayrıştırma sürecinde yenilikler olduğu, spermanın hazırlanması ve dondurulması aşamalarının standardize edildiği rapor edilmiştir (Gonzalez-Marín ve ark., 2018; Vishwanath ve Moreno, 2018). Holstein düvelerde yapılan çalışmalarda eski teknoloji ile karşılaştırıldığında SexedULTRA™ teknolojisi sonrası kullanılan CBS ile elde edilen gebelik oranının %4,5 ile %7,4 arasında arttığı tespit edilmiştir (Lenz ve ark., 2016; Vishwanath, 2014). Aynı zamanda yeni teknoloji ile farklı sperma dozlarının gebelik oranı üzerine etkisi karşılaştırıldığında, dozun artırılmasıyla (4×10^6) gebelik oranının arttığı bildirilmiştir (Lenz ve ark., 2016). Etçi ineklerde yapılan bir çalışmada konvansiyonel sperma ve yeni teknoloji sonrasında ayrıştırılmış CBS ile tohumlama sonrası gebelik oranları karşılaştırılmış; konvansiyonel spermada %56,7, CBS'de %49,2 gebelik oranı belirlenirken gruplar arasında fark saptanmamıştır (Crites ve ark., 2018). Etçi düvelerde yapılan farklı bir çalışma sonucunda konvansiyonel sperma ve CBS ile tohumlama sonrasında aynı gebelik oranı (%89,0) tespit edilmiştir (Thomas ve ark., 2017). Literatürde SexedULTRA™ ile ayrıştırılmış CBS konusunda Holstein düveler üzerinde yapılan çalışmalar sınırlı sayıdadır (Lenz ve ark., 2016; Vishwanath, 2014). Sunulan bu çalışmada spermanın ayrıştırma sürecinde standardizasyonların yapıldığı SexedULTRA™ teknolojisi ile %90 doğrulukta ayrıştırılmış, payetinde (4×10^6) doz içeren CBS kullanıldı. Çalışma sonucunda %52,2 gebelik oranı elde edildi ve bu oran yeni teknolojinin kullanıldığı çalışmalarla uyumlu bulundu (Lenz ve ark., 2016; Vishwanath, 2014; Vishwanath ve Moreno, 2018). Ancak etçi düvelerin yeni teknoloji sonrasında ayrıştırılmış CBS ile tohumlama sonrası elde edilen gebelik oranına göre düşük belirlendi (Thomas ve ark., 2017). Aradaki oransal farklılığın verim ırkı farklılığından kaynaklandığı belirtilmiştir (DeJarnette ve ark., 2009). Holstein düvelerde XY

teknolojisinde ayrıştırılmış CBS ile yapılan çalışmalar (Chebel ve ark., 2010; Healy ve ark., 2013; Mallory ve ark., 2013; Noonan ve ark., 2016; Norman ve ark., 2010) ile karşılaştırıldığında, sunulan çalışmada daha yüksek gebelik elde edilmesinin sebebi, yeni ayrıştırma teknolojisi ile hazırlanmış CBS'nin kullanılması olabilir.

Dişi buzağı doğacağından hem güç doğum oranını azaltması sebebiyle hem de daha yüksek gebelik elde edilebileceği için CBS kullanımını ineklere kıyasla düvelerde daha yaygındır (Chebel ve ark., 2010; DeJarnette ve ark., 2009; Norman ve ark., 2010). Hatta, CBS düvelerin özellikle ilk tohumlamasında kullanılması önerilmektedir (López-Gatius F, 2012; Healy ve ark., 2013; Sá Filho ve ark., 2010; Seidel, 2007). Düvelerde ineklere kıyasla bir süt veriminin henüz söz konusu olmaması ve buna olarak metabolik ve enfeksiyöz hastalıkların daha az olması nedeniyle fertilité daha yüksektir. Konvansiyonel sperma sonrası ineklerde saptanan gebelik oranı %35 ile %50 arasında (Kurkin, 2017; Mallory ve ark., 2013; Seidel ve Schenk, 2008) iken bu oran düvelerde %65 ile 75 arasındadır (Andersson ve ark., 2006; Karakaya ve ark., 2014; Sales ve ark., 2011). İneklerde CBS kullanımı sonrasında gebelik oranı ortalama %20 ile %30 arasında azalırken, düvelerde bu azalma %10 ile %20 arasında olmaktadır (DeJarnette ve ark., 2009; López-Gatius F, 2012; Seidel ve Schenk, 2008). Bundan dolayı CBS'nin düvelerde kullanımını işletmeler bakımından daha karlı olacaktır. Sunulan bu çalışmada da tüm tohumlamalar hem literatürde önerildiği üzere hem de ülkemiz saha şartlarına uygun olması amacıyla CBS Holstein düvelerin birinci tohumlamasında kullanıldı.

CBS'nin tohumlama dozunun (2×10^6) konvansiyonel spermaya ($10-20 \times 10^6$) göre az olmasından dolayı gebelik oranının düşük olduğu bildirilirken, gebelik oranını artırmak amacıyla muhtemel ovulasyonun olacağı kornu uteriye tohumlama gibi farklı yollar araştırılmıştır (Chang ve ark., 2017; Ingenhoff ve ark., 2017; Kurykin ve ark., 2007; Seidel ve Schenk, 2008). Yapılan bir çalışmada Holstein düvelerde CBS dozu ile tohumlama yerinin gebelik oranı üzerine etkisi değerlendirilmiştir. CBS dozu 3×10^6 kullanıldığında kornu uteri (%51) ve korpus uteriye (%47) yapılan tohumlamalar arasında fark bulunmazken, CBS dozu 1×10^6 kullanıldığında korpus uteriye yapılan göre (%46) kornu uteriye yapılan tohumlamada gebelik oranının düştüğü (%32) saptanmıştır (Seidel ve Schenk, 2008). Holstein düveler üzerinde yapılan başka bir çalışmada kornu uteri (%48,4)

ve korpus uteriye (%44,9) yapılan tohumlamalar sonrasında elde edilen gebelik oranları benzer bulunmuştur (Kurykin ve ark., 2016). Holstein düveler üzerinde yapılan benzer bir çalışmada CBS ile korpus uteriye yapılan tohumlama sonrası %22,3; kornu uteriye yapılan tohumlama sonrası %25,6 gebelik oranı arasında fark saptanmamıştır (Ingenhoff ve ark., 2017). Dolayısıyla yapılan çalışmalar neticesinde, ovulasyon yerine yakınlaşmak amacıyla kornu uteriye yapılan tohumlamanın spermanın geriye boşalmasına engel olduğu bildirilse de (López-Gatius, 2000), kornu uteri veya korpus uteriye yapılan tohumlama sonrası elde edilen gebelik oranları arasında fark bulunmamıştır (Chang ve ark., 2017; Ingenhoff ve ark., 2017; Kurykin ve ark., 2016; Macedo ve ark., 2013; Seidel ve Schenk, 2008; Verberckmoes ve ark., 2005). Tohumlama yerinin değiştirilmesinde gebelik oranlarının artmamasının yanısıra kornu uteriye yapılan tohumlamalarda saha şartlarında kullanılan farklı olarak özel tohumlama katateri gerektirmesi (Meirelles ve ark., 2012; Verberckmoes ve ark., 2005) ve tohumlama yapılırken uterusu meydana gelebilecek hasar ihtimali dikkate alınarak (Kurykin ve ark., 2006), sunulan bu çalışmada tüm tohumlamalar korpus uteriye yapıldı. Yukarıdaki veriler (Chang ve ark., 2017; Ingenhoff ve ark., 2017; Kurykin ve ark., 2016) ve sunulan çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde tohumlama yerinden ziyade kullanılan doz ve sperm ayırıştırma teknolojisinin daha önemli olduğu kanısına varılmıştır.

Spermanın ayırıştırma işlemi sırasında boğaların spermaları farklı derecelerde etkilenmektedir (Sá Filho ve ark., 2010). Bu nedenle farklı boğalara ait CBS ile tohumlama sonrası fertilité değişmektedir. İnek ve düvelerde CBS kullanımı birlikte değerlendirildiğinde boğalar arasında fertilitenin %16-63 aralığında değiştiği tespit edilmiştir (Mellado ve ark., 2014). Jersey düvelerde 3 farklı boğanın, cinsiyeti belirlenmiş ve konvansiyonel sperması birlikte değerlendirilerek gebelik oranı üzerine etkisi karşılaştırıldığında gebelik oranları A boğasında %27,3; B boğasında %44,2 ve C boğasında %41,3 tespit edilmiştir. Çalışmada gebelik oranı üzerine boğanın etkili olduğu sonucuna varılmıştır (Sá Filho ve ark., 2010). Etçi düveler üzerinde yapılan güncel bir çalışmada 3 farklı boğaya ait CBS kullanılmış ve A boğasına ait CBS ile %42,6; B boğasına ait CBS ile %44,4; C boğasına ait CBS ile %54,9 gebelik oranı elde edilmiştir (Colazo ve ark., 2018). Etçi ineklerde yapılan diğer bir çalışmada ise 19 farklı boğaya ait

CBS ile elde edilen gebelik oranı %19,3 ile %55,6 arasında tespit edilmiştir. Aynı çalışmadaki çarpıcı diğer veri ise 6 boğaya ait CBS ile %50'nin üzerinde gebelik oranı saptanırken, 4 boğaya ait CBS ile gebelik oranı %30'un altında kalmıştır (Hall ve ark., 2017). Sunulan bu çalışmada 3 farklı boğaya ait spermadan sadece bir tanesinde %50'nin üzerinde gebelik elde edildi. Farklı boğalardan elde edilecek fertiliteye ilişkin birçok labortauvar sonuçları olmasına rağmen ayrıştırma sürecinden her bir boğa farklı derecelerde etkilenmektedir Abdel-Azim, 2010; Frijters ve ark., 2009; Hall ve ark., 2017). Literatürle uyumlu (Blondin ve ark., 2009; Colazo ve ark., 2018; DeJarnette ve ark., 2008) olarak boğa sperması arasında fertilitite farkının olabileceği tekrar ortaya konuldu. Dolayısıyla boğa fertilititesinin gebelik oranını önemli derecede etkileyebilmesi sebebiyle fertilitesi yüksek tespit edilen bir boğaya ait CBS ile işletmelerde tohumlamaların devam ettirilmesinin işletme karlılığı açısından önemli olduğu ortaya çıkmaktadır.

Tohumlama anında graaf folikül çapının büyüklüğü fertilititeyi etkileyen faktörler arasında yer almaktadır (Perry ve ark., 2005; Vasconcelos ve ark., 2013). Konvansiyonel sperma ile tohumlama sonrasında bazı çalışmalarda graaf folikül çapının artmasıyla gebelik oranının arttığı bildirilirken bazı çalışmalar folikül çapındaki artışla gebelik oranlarının azaldığı ileri sürülmektedir (Lynch ve ark., 2010; Perry ve ark., 2005, Perry ve ark., 2007; Townson ve ark., 2018; Vasconcelos ve ark., 2001; Wiltbank ve ark., 2011). Ayrıca folikül çapının gebelik oranını etkilemediğini de bildiren araştırmalar da vardır (Hillegass ve ark., 2008). Ancak CBS ile yapılan çalışmalarda folikül çapının gebelik üzerine etkisinin değerlendirildiği çalışma sayısı sınırlıdır (Filho ve ark., 2012; Ingenhoff ve ark., 2017). Sunulan bu çalışmada deneme grupları arasında tohumlama anında ölçülen graaf folikül çapının (ort. $13,63 \pm 0,12$ mm) benzer ($p=0,18$) olduğu ve Holstein düvelerde östrus tespiti sonrası tohumlama anında ölçülen graaf folikül çapının gebelik oranını etkilemediği ($p=0,46$) saptandı. Her ne kadar sunulan çalışmada düvelerde folikül çapının gebelik oranı üzerine herhangi bir etkisi olmadığı belirlense de aksinin ortaya konulduğu çok sayıda çalışma düşünüldüğünde, gebelik oranını etkileyen diğer faktörlerin yanında tohumlama anında graaf folikül çapının ölçülmesi ikinci planda bir önem taşıdığı sonucu çıkarılabilir.

Sıcaklık stresi hayvanların sağlık parametreleriyle birlikte verim parametrelerini de etkilemektedir (Schüller ve ark., 2017). Sıcaklık stresi ineklerde gebelik oranlarının %10 ile 30 arasında azalmasına neden olmaktadır (De Rensis ve Scaramuzzi, 2003). Sıcaklık stresinin etkisini değerlendirmek için SNİ değeri kullanılmaktadır (Cook ve ark., 2007; Healy ve ark., 2013; Ravagnolo ve ark., 2000; Schüller ve Heuwieser, 2016; West, 2003). Sunulan bu çalışmada hayvanların barındırıldığı yere en yakın meteorolojik istasyon verileri kullanıldı. Yapılan çalışmalarda hayvanların sıcaklık stresine maruz kaldığı eşik SNİ değeri 72 olarak belirlenmiştir (Morton ve ark., 2007; Schüller ve ark., 2014). Mevcut çalışmada eşik SNİ değeri bakımından gebelik oranları değerlendirildiğinde (SNİ <72, %52,5; SNİ>72, %50,0; $p=0,78$) fark bulunmadı. Deneme grupları arasında SNİ değeri benzer bulundu ($p>0,54$). Gebelik muayenesinde gebe olduğu ve gebe olmadığı saptanan düvelerin SNİ değeri karşılaştırıldığında da anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p=0,46$). Bu farkın ortaya çıkmamasının muhtemel sebebi SNİ<72 gruptaki düve sayısı (n=263) karşılaştırıldığında SNİ>72 gruptaki düve sayısının (n=36) az olmasından kaynaklanabilir. Sıcaklık stresi mevsime göre değerlendirildiğinde; yapılan bir çalışmada Holstein düvelerdeki CBS kullanımı sonrası gebelik oranı ilkbahar (%53,9), sonbahar (%50,8) ve kış (%50,7) mevsimiyle karşılaştırıldığında en düşük gebelik oranı yaz mevsiminde (%44,2) tespit edilmiştir (Cerchiaro ve ark., 2007). Holstein düvelerdeki başka bir çalışmada CBS ile sıcak dönemde saptanan gebelik oranı (%33) serin dönemdeki gebelik oranının (%64) neredeyse yarısı kadar saptanmıştır (Donovan ve ark., 2003). Sıcak dönemlerde düvelerin gebelik oranındaki bu düşüş ineklerde de aynı şekilde (Serin dönemde %21; Sıcak dönemde %16) yansımaktadır (Mellado ve ark., 2014). Ancak sunulan bu çalışmada sıcak dönemdeki gebelik oranı (%49,4) serin dönemdeki gebelik oranına göre (%53,4) düşük olmasına rağmen istatistiki fark saptanmamıştır ve yapılan çalışmalarda (Cerchiaro ve ark., 2007; Donovan ve ark., 2003; Mellado ve ark., 2014) belirtilen gebelik oranlarındaki azalma sunulan çalışmada dikkat çekici değildir. Gebelik oranlarının çarpıcı şekilde düşmemesinin muhtemel sebebi sıcak dönem olarak belirlenen zaman aralığında ortalama SNİ değerinin fertilitiyi etkilediği bildirilen 72'den daha düşük olmasıdır.

Konvansiyonel sperma ile yapılan çalışmalarda olduğu gibi CBS ile yapılan çalışmalarda da tohumlayıcının fertilitiyi etkileyen bir faktör olduğu güncel çalışmalarda bildirmektedir (Chebel ve ark., 2010; Ingenhoff ve ark., 2017; Vartia ve ark., 2017). Bazı çalışmalarda tohumlayıcı faktörü, işletme etkisi olarak kabul edilse de (DeJarnette ve ark., 2011; Kurykin ve ark., 2016) mevcut çalışmada gebelik oranı üzerine tohumlayıcı etkisi farklı bir faktör olarak değerlendirilmiştir. En yüksek gebelik oranı E tohumlayıcısıyla elde edilirken tohumlayıcılar arasındaki gebelik oranı farkı anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Tohumlayıcılar arasında spermanın hazırlanması ve uygulanmasındaki tecrübe farkı bu sonuca etki etmiş olabilir (DeJarnette ve ark., 2011; López-Gatius, 2012).

Cinsiyeti belirlenmiş sperma ile östrus sonrası yapılan tohumlama sonrası gebelik oranının daha yüksek olduğu birçok çalışmada bildirilmiştir (Colazo ve ark., 2018; Hall ve ark., 2017; Mallory ve ark., 2013; Sá Filho ve ark., 2013; Thomas ve ark., 2014). Bununla beraber tohumlama anında östrus bulguları şiddeti yüksek olarak değerlendirilen hayvanlarda gebelik oranlarının arttığı tespit edilmiştir (Kurykin ve ark., 2007, Kurykin ve ark., 2016). Bunun yanında östrus belirtilerinin şiddetini değerlendirmek amacıyla östrus takip sistemleri kullanılmakta ve bu şiddetin derecesi östrus sırasında ölçülen maksimum östrus indekse göre belirlenmektedir (Silper ve ark., 2015). Bu konuda hem konvansiyonel hem de CBS ile sınırlı sayıda çalışma bulunmakla birlikte östrus boyunca maksimum östrus indeksi yüksek olanlarda gebelik oranlarının arttığını (Madureira ve ark., 2015) ve değişmediği tespit eden çalışmalar bulunmaktadır (Bombardelli ve ark., 2016). Sunulan çalışmada östrus belirtilerinin şiddeti, östrus anında maksimum östrus indeksine göre değerlendirildi. Madureira ve ark. (2015) referans alınarak; maksimum östrus indeksi aralığı 35-89 aralığında olanlar düşük (ortalaması $81,69\pm 0,97$), 90-100 aralığında olanlar yüksek ($97,93\pm 0,60$) olarak değerlendirildi. Çalışmadaki düvelerin östrus sırasındaki maksimum östrus indeksi 90-100 arasında olanlar çoğunluğu (%68,6) oluştururken, ortalaması $93,42\pm 0,51$ olarak belirlendi. Maksimum östrus indeksi yüksek olanlarda yüksek östradiol konsantrasyonunun olması ve uterus ortamının hazırlanmasının gebelik oranında artış saptanacağı bildirilmesine rağmen (Madureira ve ark., 2015) sunulan bu çalışmada maksimum östrus indeksi düşük olanlara göre (%51,8) yüksek olanlarda (%52,3) gebelik oranının değişmediği ($p=0,61$) tespit edildi. Beklenen

farkın ortaya çıkmamasında maksimum östrus indeksi yüksek olan grupta (n=216) düve sayısının düşük olan (n=83) gruba göre yaklaşık üç katı fazla olmasından kaynaklanabilir. Bununla birlikte bulunan bu sonuç, östrus boyunca maksimum östrus indeksi yüksek olanlarda gebelik oranlarının değişmediğini bildiren Bombardelli ve ark. (2016) 'nın çalışması ile uyumlu bulundu.

Tohumlama sonrası fertilizasyon ve takiben gebelik, ancak spermayı ve oositi doğru zamanda bir araya getirerek mümkündür (Roelofs ve ark., 2006). Konvansiyonel sperma ile ideal tohumlama zamanını belirlemek için yapılan ilk çalışmaların üzerinden yaklaşık 70 yıl geçmiştir (Trimberger ve Davis, 1943; Trimberger, 1948). İlk kez sabah akşam kuralı geliştirildikten sonraki yapılan çalışmalar da bu bilgiyi destekler niteliktedir (Dalton ve ark., 2001; Dransfield ve ark., 1998; Roelofs ve ark., 2015; Stevenson ve ark., 2014). Ancak konvansiyonel sperma ile tohumlama zamanı hakkında yapılan birçok araştırma olmasına karşın CBS ile yapılan çalışma sayısı sınırlıdır (Bombardelli ve ark., 2016; SaFilho ve ark., 2010). CBS'nin ayrıştırma sürecinde fiziksel ve kimyasal strese maruz kalması sonucunda yaşam süresi kısalmaktadır (Maxwell ve ark., 2004; Mocé ve ark., 2006; Peippo ve ark., 2009). Aynı zamanda ayrıştırma süreci sonrasında spermada kapasitasyonun kısmi olarak başladığı veya kapasitasyonun hızlandığı bildirilmiştir. Dolayısıyla CBS'nin yaşam süresi kısaldığından ideal zamanda tohumlama yapılmadığında fertilitede azalma meydana gelmektedir (Schenk ve ark., 2009; Vazquez ve ark., 2003). CBS ile tohumlama zamanının araştırıldığı çalışmalarda, araştırmacılar çoğunlukla zaman ayarlı tohumlama protokolünü takiben CBS'yi araştırmıştır. Bu çalışmalarda zaman ayarlı tohumlama protokolü uygulamasını takiben tohumlama zamanının ötelenmesi gebelik oranının arttığı tespit edilmiştir (Colazo ve Mapletoft, 2017; Hall ve ark., 2017; Noonan ve ark., 2016; Sales ve ark., 2011; Thomas ve ark., 2014). Literatürde östrus takibi sonrası yapılan iki adet çalışmaya ulaşılmış ve tohumlama zamanı ötelendiğinde gebelik oranının arttığı tespit edilmiştir. Ancak çalışmaların biri Jersey ineklerde, diğeri Jersey düveler üzerinde yapılmıştır (Bombardelli ve ark., 2016; Sá Filho ve ark., 2010). Ayrıca bu iki çalışmadan bir tanesi retrospektif yapılmış (Bombardelli ve ark., 2016) diğer çalışmada ise birçok boğaya bağlı fertilitate farklılığı söz konusu olmuştur (Sá Filho ve ark., 2010). Dolayısıyla literatürde Holstein düvelerde planlanmış bir çalışma

dizayn edilerek boğa etkisinin değerlendirildiği, östrus takibi sonrası tohumlama zamanının gebelik oranına etkisini araştıran çalışmaya rastlanılmamıştır. Sunulan çalışmanın bu konudaki sınırlı literatür bilgisine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

Özellikle SexedULTRA™ teknolojisi ile ayırıştırma sürecinde yenilikler yapılmış ve sürecin standardizasyonu ile stabilizasyonu sağlandığı rapor edilmiştir (Gonzalez-Marín ve ark., 2018; Vishwanath ve Moreno, 2018). Bu sayede CBS ile elde edilen gebelik oranlarının arttığı bildirilmiştir (Lenz ve ark., 2016; Gonzalez-Marín ve ark., 2018; Vishwanath, 2014). Ancak yeni teknoloji ile ayırıştırılmış CBS ile östrus takibi sonrası tohumlama zamanının gebelik oranı üzerine etkisini araştıran bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Sunulan çalışma Holstein düvelerde SexedULTRA™ teknolojisi uygulanmış CBS ile gebelik oranlarının değerlendirildiği ilk çalışma niteliği taşımaktadır. Sunulan çalışmada ülkemiz şartlarında yetiştirilen Holstein düvelerde deneme grupları dikkate alınmaksızın toplam gebelik oranı %52,2 tespit edilmiştir. Tohumlama zamanının etkisi değerlendirildiğinde, östrus başlangıcından 12-16 ve 16,1-20 saat sonra tohumlanan gruplarda %49,0; 20,1-24 saat sonra tohumlanan grupta %58,6 gebelik oranı elde edilmiştir. Gruplar arasında yaklaşık %10'luk bir artış görülmesine rağmen deneme grupları arasında fark saptanamamıştır ($p=0,29$). CBS ile daha önce yapılan çalışmalarda tohumlama zamanı ovulasyona yaklaştıkça artış tespit edilmiştir (Sá Filho ve ark., 2010; Bombardelli ve ark., 2016). Yapılan çalışmalarda tohumlama zamanının ötelenmesiyle Jersey düvelerde yaklaşık %18 gebelik artışı ve Jersey ineklerde yaklaşık %14 gebelik artışı bildirilirken, sunulan çalışmada tohumlama zamanının ötelenmesiyle elde edilen artış yaklaşık %10 tespit edilirken istatistiki fark saptanamamıştır. Bu farklılık çalışmanın farklı ırk üzerinde yürütülmesinden kaynaklanabilir. Ayrıca sunulan bu çalışmada gruplar arasındaki farkın (Grup 1 ve Grup2'ye karşın Grup3) istatistiki olarak ortaya çıkması için daha fazla sayıda düvenin kullanılması gerektiği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, sunulan çalışma Holstein düvelerde yeni teknoloji sonrası ayrıştırılmış CBS ile tohumlama zamanının gebelik oranı üzerine etkisinin araştırıldığı ilk çalışma olmuştur. CBS'nin dişi genital kanalda yaşama ömrü kısa olduğundan Holstein düvelerde tohumlama zamanının ötelenmesiyle (strus başlangıcından 20,1-24 saatleri arasında) gebelik oranında yaklaşık %10 artış saptanmıştır. Holstein düvelerde konvansiyonel spermada yaygın olarak kullanılan sabah akşam tohumlama kuralının, cinsiyeti belirlenmiş sperma kullanımında ideal tohumlama zamanı olmadığı, tohumlama zamanının ötelenmesinin gebelik oranlarının artırılması için kritik karar olduğu ortaya konmuştur.

6. KAYNAKLAR

Abdel-Azim G (2010) Effect of synchronization and semen sorting on artificial insemination bull fertility. *Journal of Dairy Science* 93: 420-425.

Acosta TJ, Beg MA, Ginther OJ (2005) Effects of modified FSH surges on follicle selection and codominance in heifers. *Animal Reproduction* 2: 28-40.

Acosta TJ, Hayashi KG, Ohtani M et al (2003) Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction* 125: 759-767.

Adams GP, Jaiswal R, Singh J et al (2008) Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology* 69: 72-80.

Aerts JM, Bols PE (2010) Ovarian follicular dynamics. A review with emphasis on the bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects. *Reproduction in Domestic Animals* 45: 180-187.

Ahmad N, Beam SW, Butler WR et al (1996) Relationship of fertility to patterns of ovarian follicular development and associated hormonal profiles in dairy cows and heifers. *Journal of Animal Science* 74: 1943-1952.

Ahmed M, Chowdhury MK, Rahman MM et al (2017) Relationship of electrical resistance of vaginal mucus during oestrus with post-AI pregnancy in cows. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine* 15: 113-117.

Alila HW, Hansel W (1984) Origin of different cell types in the bovine corpus luteum as characterized by specific monoclonal antibodies. *Biology of Reproduction* 31: 1015-1025.

Allen JD, Hall LW, Collier RJ et al (2015) Effect of core body temperature, time of day, and climate conditions on behavioral patterns of lactating dairy cows experiencing mild to moderate heat stress. *Journal of Dairy Research* 98: 1-10.

Amann RP, DeJarnette JM (2012) Impact of genomic selection of AI dairy sires on their likely utilization and methods to estimate fertility: A paradigm shift. *Theriogenology* 77: 795-817.

An L, Wu ZH, Wu YF et al (2010) Fertility in single-ovulating and superovulated dairy heifers after insemination with low dose sex-sorted sperm. *Reproduction in Domestic Animals* 45: 344-350.

Andersson M, Taponen J, Kommeri M et al (2006) Pregnancy rate in lactating Holstein-Friesian cows after artificial insemination with sexed sperm. *Reproduction in Domestic Animals* 41: 95-97.

Araujo RR, Ginther OJ, Ferreira JC et al (2009) Role of follicular estradiol-17beta in timing of luteolysis in heifers. *Biology of Reproduction* 81: 426-437.

Arney DR, Kitwood SE, Phillips CJC (1994) The increase in activity during estrus in dairy cows. *Applied Animal Behaviour Science* 40: 211-218.

Arruda RP, Celeghini ECC, Alonso MA et al (2012) Aspects related to the technique and the utilization of sexed semen in vivo and in vitro. *Animal Reproduction Science* 9: 345-353.

At-Taras EE, Spahr SL (2001) Detection and characterization of estrus in dairy cattle with an electronic heatmount detector and an electronic activity tag. *Journal of Dairy Science* 84: 792-798.

Ball PJH, Peters AR (2004) *Reproduction in Cattle*. Editors: Peters AR, Ball PJH, 3rd edition, Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp: 100-101.

Bao B, Garverick HA, Smith GW et al (1997) Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biology of Reproduction* 56: 1158-1168.

Baran A (2016) Sığır yetiştiriciliğinde cinsiyeti belirlenmiş sperma üretim tekniği ve kullanımı. *Türkiye Klinikleri Journal Reproduction and Artificial Insemination Special Topics* 2: 15-20.

Beg MA, Ginther OJ (2006) Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. *Reproduction* 132: 365-377.

Beg MA, Meira C, Bergfelt DR et al (2003) Role of oestradiol in growth of follicles and follicle deviation in heifers. *Reproduction* 125: 847-854.

Berisha B, Schams D (2005) Ovarian function in ruminants. *Domestic Animal Endocrinology* 29: 305-317.

Bleach ECL, Glencross RG, Knight PG (2004) Association between ovarian follicle development and pregnancy rates in dairy cows undergoing spontaneous oestrous cycles. *Reproduction* 127: 621-629.

Blecher SR, Howie R, Li S et al (1999) A new approach to immunological sexing of sperm. *Theriogenology* 52: 1309-1321.

Blondin P, Beaulieu M, Fournier V et al (2009) Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. *Theriogenology* 71: 30-38.

Bodmer M, Janett F, Hässig M et al (2005) Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and non-sorted sperm under field conditions. *Theriogenology* 64: 1647-1655.

Boland MP, Lonergran P, O'Callaghan D (2001) Effect of nutrition on endocrine parameters ovarian physiology and oocyte and embryo development. *Theriogenology* 55: 1323-1340.

Bombardelli GD, Soares HF, Chebel RC (2016) Time of insemination relative to reaching activity threshold is associated with pregnancy risk when using sex-sorted semen for lactating Jersey cows. *Theriogenology* 85: 533-539.

Borchersen S, Peacock M (2009) Danish A.I. field data with sexed semen. *Theriogenology* 71: 59-63.

Boro P, Naha BC, Madkar A (2016) Sexing of semen in bulls: A mini review. *International Journal of Applied Research* 2: 460-462.

Brehme U, Ahlers D, Laufeld P et al (2001) Brunsterkennung und Gesundheitsüberwachung mittels sensorgestützter Funkdatenlogger. In: *Bau, Technik und Umwelt in der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung, Beiträge zur 5. Internationalen Tagung in Hohenheim, Hohenheim, Germany: Institut für Agrartechnik der Universität Hohenheim*, pp: 44-49.

Brehme U, Stollberg U, Holz R et al (2006) ALT pedometer – a new sensor aided measurement system for improvement in oestrus detection. *Computers and Electronics in Agriculture* 62: 1-10.

Britt JH, Scott RG, Armstrong JD et al (1986) Determinants of estrous behavior in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 8: 2195-2202.

Brogliatti GM, Dominguez G, Lüssenhoff MG et al (2009) Deep intrauterine artificial insemination using sexed semen in Holstein heifers. *Reproduction Fertility and Development* 22:165-166.

Butler ST, Hutchinson IA, Cromie AR et al (2014) Applications and cost benefits of sexed semen in pasture-based dairy production systems. *Animal* 8: 165-172.

Cairolì F, Mollo A, Veronesi MC et al (2006) Comparison between cloprostenol-induced and spontaneous oestrus fertility in dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals* 179: 175-179.

Campbell BK, Telfer EE, Webb R et al (2000) Ovarian autografts in sheep as a model for studying folliculogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 163: 131-139.

Canty MJ, Boland MP, Evans ACO et al (2006) Alterations in follicular IGFBP mRNA expression and follicular fluid IGFBP concentrations during the first follicle wave in beef heifers. *Animal Reproduction Science* 93: 199-217.

Carvalho JO, Sartori R, Dode MAN (2014) Different ways to evaluate bovine sexed sperm in vitro. *Animal Reproduction* 11: 199-206.

Castellanos F, Orihuela A, Galina CS (1992) Aggressive behaviour in oestrus and dioestrus dairy cows and heifers. *Veterinary Record* 131: 515-516.

Cavalieri J, Flinker LR, Anderson GA et al (2003) Characteristics of oestrus measured using visual observation and radiotelemetry. *Animal Reproduction Science* 76: 1-12.

Cavestany D, Foote RH (1985) Effect of season and high environmental temperature on fertility of Holstein cattle. *Journal of Dairy Science* 68: 1471-1478.

Celik HA, Aydin I, Sendag S et al (2005) Number of follicular waves and their effect on pregnancy rate in the cow. *Reproduction in Domestic Animals* 40: 87-92.

Cerchiaro I, Cassandro M, Dal Zotto R et al (2007) A field study on fertility and purity of sex-sorted cattle sperm. *Journal of Dairy Science* 90: 2538-2542.

Cerri RLA, Chebel RC, Rivera F et al (2011). Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: II. Ovarian and uterine responses. *Journal of Dairy Science* 94: 3352-3365.

Chang LB, Chou CJ, Shiu JS et al (2017) Artificial insemination of Holstein heifers with sex-sorted semen during the hot season in a subtropical region. *Tropical Animal Health and Production* 49: 1157-1162.

Chebel RC, Guagnini FS, Santos JEP et al (2010) Sex-sorted semen for dairy heifers: Effects on reproductive and lactational performances. *Journal of Dairy Science*, 93: 2496-2507.

Chenault JR, Thatcher WW, Kalra PS et al (1976). Plasma progesterone, estradiol, and luteinizing hormone following prostaglandin F_{2α} injection. *Journal of Dairy Science* 59: 1342-1346.

Claycomb RW, Delwiche MJ (1998) Biosensor for on-line measurement of bovine progesterone during milking. *Biosensors and Bioelectronics* 13: 1173-1180.

Colazo MG, Mapletoft RJ (2017) Pregnancy per AI in Holstein heifers inseminated with sexed semen after detected estrus or timed-AI. *Canadian Veterinary Journal*, 58: 365-370.

Colazo MG, Whittaker P, Macmillan K et al (2018) Evaluation of a modified GnRH-based timed-AI protocol associated with estrus detection in beef heifers inseminated with sex-selected or conventional semen. *Theriogenology* 118: 90-95.

Cook NB, Mentink RL, Bennett TB et al (2007) The Effect of heat stress and lameness on time budgets of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 90: 1674-1682.

Cooke RF, Bohnert DW, Cappelozza BI et al (2014) Incorporation of sexed semen into reproductive management of cow-calf operations. *Livestock Science* 163: 165-171.

Cottle DJ, Wallace M, Lonergan P et al (2018) Bioeconomics of sexed semen utilization in a high-producing Holstein-Friesian dairy herd. *Journal of Dairy Science* 101: 4498-4512.

Crites BR, Vishwanath R, Arnett AM et al (2018) Conception risk of beef cattle after fixed-time artificial insemination using either SexedUltra™ 4M sex-sorted semen or conventional semen. *Theriogenology* 118: 126-129.

Cutullic E, Delaby L, Causeur D (2009) Hierarchy of factors affecting behavioural signs used for oestrus detection of Holstein and Normande dairy cows in a seasonal calving system. *Animal Reproduction Science* 113: 22-37.

Dalton JC, Nadir S, Bame JH et al (2001) Effect of Time of insemination on number of accessory sperm, fertilization rate, and embryo quality in nonlactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 84: 2413-2418.

De Rensis F, Garcia-Ispuerto I, Lopez-Gatius F (2015) Seasonal heat stress: clinical implications and hormone treatments for the fertility of dairy cows. *Theriogenology* 84: 659-666.

De Rensis F, Peters AR (1999) The control of follicular dynamics by PGF_{2α}, GnRH, hCG and estrus synchronization in cattle. *Reproduction in Domestic Animals* 34: 49-59.

De Rensis F, Scaramuzzi RJ (2003) Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow-a review. *Theriogenology* 60: 1139–1151.

De Vries A, Nebel R (2009) National heifer supply and the effects of sexed semen. *Western Dairy Management Conference*, Reno, Nevada, USA, pp: 131-140.

De Vries A, Overton M, Fetrow J et al (2008) Exploring the impact of sexed semen on the structure of the dairy industry. *Journal of Dairy Science* 91: 847-856.

DeJarnette JM, Leach MA, Nebel RL et al (2011) Effects of sex-sorting and sperm dosage on conception rates of Holstein heifers: Is comparable fertility of sex-sorted and conventional semen plausible? *Journal of Dairy Science* 94: 3477-3483.

DeJarnette JM, McCleary CR, Leach M et al (2010) Effects of 2.1 and 3.5x10⁶ sex-sorted sperm dosages on conception rates of Holstein cows and heifers. *Journal of dairy science* 93: 4079-4085.

DeJarnette JM, Nebel RL, Marshall CE (2009) Evaluating the success of sex-sorted semen in US dairy herds from on farm records. *Theriogenology* 71: 49-58.

DeJarnette JM, Nebel RL, Marshall CE et al (2008) Effect of sex-sorted sperm dosage on conception rates in Holstein heifers and lactating Cows. *Journal of Dairy Science* 91: 1778-1785.

Delwiche M, Tang X, Bondurant R (2001) Improved biosensor for measurement of progesterone in bovine milk. *Transactions of the American Society of Agricultural and Biological Engineers* 44: 1997-2002.

Dematawena CMB, Berger PJ (1997) Effect of dystocia on yield, fertility, and cow losses and an economic evaluation of dystocia scores for Holsteins. *Journal of Dairy Science* 80: 754-761.

Demmers KJ, Derecka K, Flint A (2001) Trophoblast interferon and pregnancy. *Reproduction* 121: 41-49.

DeVries A (2006) Economic value of pregnancy in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 89: 3876-3885.

Diaz FJ, Anderson LE, Wu YL et al (2002) Regulation of progesterone and prostaglandin F₂ α production in the CL. *Molecular and Cellular Endocrinology* 191: 65-80.

Diskin MG (2008) Reproductive management of dairy cows: a review (part I). *Irish Veterinary Journal* 61: 326-332.

Diskin MG, Sreenan JM (2000) Expression and detection of oestrus in cattle. *Reproduction, Nutrition, Development* 40: 481-491.

Dobson H, Walker SL, Morris MJ et al (2008) Why is it getting more difficult to successfully artificially inseminate dairy cows? *Animal* 2: 1104-1111.

Dominguez JHE, Costa DS, Jojot VC et al (2011) Pregnancy rate of Nelore females inseminated with male-sexed sperm. *Animal Reproduction Science* 129: 127-131.

Donaldson LE, Hansel W (1968) Cystic corpora lutea and normal and cystic graafian follicles in the cow. *Australian Veterinary Journal* 44: 304-308.

Donovan GA, Bennet FL, Springer FS (2003) Factors associated with first service conception in artificially inseminated nulliparous Holstein heifers. *Theriogenology* 30: 67-75.

Doyle SP, Seidel GE, Schenk JL et al (1999) Artificial insemination of lactating Angus cows with sexed semen. *Journal of Animal Science* 50: 203-205.

Dransfield MGB, Nebel RL, Pearson RE et al (1998) Timing of insemination for dairy cows identified in estrus by a radiotelemetric estrus detection system. *Journal of Dairy Science* 81: 1874-1882.

Driancourt MA (2001) Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* 55: 1211-1239.

Elischer MF, Arceo ME, Karcher EL (2013) Validating the accuracy of activity and rumination monitor data from dairy cows housed in a pasture-based automatic milking system. *Journal of Dairy Science* 96: 6412-6422.

Engelmann U, Krassnig GF, Schatz H et al (1988) Separation of human X and Y spermatozoa by free-flow electrophoresis. *Gamete Research* 19: 151-160.

Ericsson RJ, Langevin CN, Nishino MI (1973) Isolation of fractions rich in Y spermatozoa. *Nature* 246: 421-424.

Esslemont RJ, Bailie JH, Cooper MJ (1985) Fertility management in dairy cattle, Editors: Esslemont RJ, Chapter 5, Collins Publisher, London, pp: 70-93.

Esslemont RJ, Bryant MJ (1976) Oestrous behavior in a herd of dairy cows. *Veterinary Record* 99: 472-475.

Ettema JF, Hoag DL, Seidel GE Jr (2007) Economic opportunities for sexed semen on commercial dairies. *Western Dairy News* 7: 67-68.

Evans ACO, Fortune JE (1997) Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. *Endocrinology* 138: 2963-2971.

Fehring RJ (1997) A comparison of the ovulation method with the CUE ovulation predictor in determining fertile period. *Journal of American Academy of Nurse Practitioners* 8: 461-466.

Figueiredo RA, Barros CM, Pinheiro OL et al (1997) Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology* 47: 1489-1505.

Filho MFS, Girotto R, Abe EK et al (2012) Optimizing the use of sex-sorted sperm in timed artificial insemination programs for suckled beef cows. *Journal of animal science* 90: 1816-1823.

Firk R, Stamer E, Junge W et al (2002) Automation of oestrus detection in dairy cows: A review. *Livestock Production Science* 75: 219-232.

Fisher AD, Morton R, Dempsey JM et al (2008) Evaluation of a new approach for the estimation of the time of the LH surge in dairy cows using vaginal temperature and electrodeless conductivity measurements. *Theriogenology* 70: 1065-1074.

Foote RH (1975) Estrus detection and estrus detection aids. *Journal of Dairy Science* 58: 248-256.

Forde N, Beltman ME, Duffy GB et al (2011) Changes in the endometrial transcriptome during the bovine estrous cycle: effect of low circulating progesterone and consequences for conceptus elongation. *Biology of Reproduction* 84: 266-278.

Forde N, Beltman ME, Lonergan P et al (2011) Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Animal Reproduction Science* 124: 163-169.

Fortune JE (1993) Follicular Dynamics during the bovine estrous cycle a limiting factor in improvement of fertility. *Animal Reproduction Science* 33: 111-125.

Fortune JE (1994) Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biology of Reproduction* 50: 225-232.

Fortune JE, Rivera GM, Evans ACO et al (2001) Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biology of Reproduction* 65: 648-654.

Fortune JE, Sirois J, Quirk SM (1988) The growth and differentiation of ovarian follicles during the bovine estrous cycle. *Theriogenology* 29: 95-109.

Fricke PM, Carvalho PD, Giordano JO (2014b) Expression and detection of estrus in dairy cows: the role of new Technologies. *Animal* 8: 134-143.

Fricke PM, Giordano JO, Valenza A (2014a) Reproductive performance of lactating dairy cows managed for first service using timed artificial insemination with or without detection of estrus using an activity-monitoring system. *Journal of Dairy Science* 97: 1-11.

Fricke PM, Wiltbank MC (1999) Effect of milk production on the incidence of double ovulation in dairy cows. *Theriogenology* 52: 1133-1143.

Friggens NC, Bjerring M, Ridder C et al (2008) Improved detection of reproductive status in dairy cows using milk progesterone measurements. *Reproduction in Domestic Animals* 43: 113-121.

Friggens NC, Chagunda MGG (2005) Prediction of the reproductive status of cattle on the basis of milk progesterone measures: model description. *Theriogenology* 64: 155-190.

Frijters ACJ, Mullaart E, Roelofs RMG et al (2009) What affects fertility of sexed bull semen more, low sperm dosage or the sorting process? *Theriogenology* 71: 64-67.

Funston RN, Meyer TL (2012) Evaluating conventional and sexed semen in a commercial beef heifer development program. *The Professional Animal Scientist* 28: 560-563.

Garcia-Ispuerto I, De Rensis F, Casas X et al (2018) Reproductive performance of lactating dairy cows after inducing ovulation using hCG in a five-day progesterone-based fixed-time AI protocol. *Theriogenology* 107: 175-179.

Garner DL (2006) Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology* 65: 943-957

Garner DL and Seidel GE Jr (2008) History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology* 69: 886-895.

Garner DL, Gledhill BL, Pinkel D et al (1983) Quantification of the X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry. *Biology of Reproduction* 28: 312-321.

Garner DL, Seidel GE (2003) Past, present and future perspectives on sexing sperm. *Canadian Journal of Animal Science* 83: 375-384.

Garnsworthy PC, Sinclair KD, Webb R (2008) Integration of physiological mechanisms that influence fertility in dairy cows. *Animal* 2: 1144-1152.

Ghavi Hossein-Zadeh N, Nejati-Javaremi A, Miraei-Ashtiani SR et al (2010) Bio-economic evaluation of the use of sexed semen at different conception rates and herd sizes in Holstein populations. *Animal Reproduction Science* 121: 17-23.

Ginther OJ, Bergfelt DR, Kulick LJ et al (1999) Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of FSH concentrations. *Theriogenology* 52: 1079-1093.

Ginther OJ, Bergfelt DR, Kulick LJ et al (2000) Selection of the dominant follicle in cattle: role of the two-way functional coupling between follicle-stimulating hormone and the follicles. *Biology of Reproduction* 62: 920-927.

Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP (1989) Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycles with two and three follicular waves. *Journal of Reproduction and Fertility* 87: 223-230.

Ginther OJ, Kot K, Kulick LJank, et al (1997) Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology* 48: 75-87.

Ginther OJ, Shrestha HK, Fuenzalida MJ et al (2010) Intrapulse temporality between pulses of a metabolite of prostaglandin F2a and circulating concentrations of progesterone before, during, and after spontaneous luteolysis in heifers. *Theriogenology* 74: 1179-1186.

Ginther OJ, Silva LA, Araújo RR et al (2007) Temporal associations among pulses of 13,14- dihydro-15-keto-PGF₂alpha, luteal blood flow, and luteolysis in cattle. *Biology of Reproduction* 76: 506-513.

Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM et al (1996) Selection of the dominant follicle in cattle. *Biology of Reproduction* 55: 1871-1194.

Ginther OJ (2016) The theory of follicle selection in cattle. *Domestic Animal Endocrinology* 57: 85-99.

Gonzalez-Marin C, Lenz RW, Gilligan TB et al (2016) SexedULTRA™, a new method of processing sex-sorted bovine sperm improves post-thaw sperm quality and in vitro fertility. *Reproduction, Fertility and Development* 29: 204-205.

Gonzalez-Marín C, Gongora CE, Gilligan TB et al (2018) *Theriogenology* In vitro sperm quality and DNA integrity of SexedULTRA™ sex-sorted sperm compared to non-sorted bovine sperm. *Theriogenology* 114: 40-45.

Guyer MF (1910) Accessory chromosomes in man. *Biological Bulletin of Marine Biology Laboratory*. 19: 219-234.

Hall JB, Kasimanickam RK, Glaze JB et al (2017) Impact of delayed insemination on pregnancy rates to gender selected semen in a fixed-time AI system. *Theriogenology* 102: 154-161.

Hanzen CH, Pieterse M, Scenczi O et al (2000) Relative accuracy of the identification of ovarian structures in the cow by ultrasonography and palpation per rectum. *The Veterinary Journal* 59: 161-170.

Haughian JM, Ginther OJ, Diaz FJ et al (2013) Gonadotropin-releasing hormone, estradiol, and inhibin regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone surges: Implications for follicle emergence and selection in heifers. *Biology of Reproduction* 88: 1-10.

Hawk HW (1983) Sperm survival and transport in the female reproductive tract. *Journal of Dairy Science* 66: 2645-2660.

Healy AA, House JK, Thomson PC (2013) Artificial insemination field data on the use of sexed and conventional semen in nulliparous Holstein heifers. *Journal of Dairy Science* 96: 1905-1914.

Hendriksen PJM (1999) Do X and Y spermatozoa differ in proteins? *Theriogenology* 52: 1295-1307.

Hietala P, Bouquet P, Juga J (2014) Effect of replacement rate, crossbreeding and sexed semen on the efficiency of beef production from dairy herds in Finland. *Acta Agriculturae Scandinavica Section A-Animal Science* 64: 199-209.

Hillegass J, Lima FS, Filho MFS et al (2008) Effect of time of artificial insemination and supplemental estradiol on reproduction of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 91: 4226-4237.

Hockey CD, Morton JM, Norman ST et al (2010) Improved prediction of ovulation time may increase pregnancy rates to artificial insemination in lactating dairy cattle. *Reproduction in Domestic Animals* 45: 239-248.

Hohenboken WD (1999) Applications of sexed semen in cattle production. *Theriogenology* 52: 1421-1433.

Holden SA, Butler ST (2018) Review: Applications and benefits of sexed semen in dairy and beef herds. *Animal* 12: 97-103.

Hollinshead FK, Gillan L, O'Brien JK et al (2003) In vitro and in vivo assessment of functional capacity of flow cytometrically sorted ram spermatozoa after freezing and thawing. *Reproduction, Fertility and Development* 15: 351-359.

Hollinshead FK, O'Brien JK, Gillan L et al (2004) Birth of lambs of a predetermined sex after in vitro production of embryos using frozen-thawed sex-sorted and re-frozen-thawed ram spermatozoa. *Reproduction* 127: 557-568.

Holmann FJ, Blake RW, Shumway CR (1987) Economic evaluation of fourteen methods of estrous detection. *Journal of Dairy Science* 70: 186-194.

Huang CY, Chen HJ, Poun SH et al (1987) Study of the techniques of heat detection and artificial insemination in beef cattle. English Summary of Annual Research Report, July 1986-June 1987.

Hunter RHF (1995) Sex determination, differentiation and intersexuality in placental mammals. Editor: Hunter RHF, Press Syndicate of the University of Cambridge, New York, pp: 69-106.

Hurnik JF, King GJ, Robertson HA (1975) Estrous and related behavior in postpartum Holstein cows. *Applied Animal Ethology* 2: 55-68.

Hutchison JL, Bickhart DM (2016) Sexed-semen usage for Holstein AI in the United States. *Journal of Animal Science* 94: 176.

Hutchison JL, Norman HD (2009) Characterization and usage of sexed semen from US field data-Abstract. *Theriogenology* 71: 48-48.

Ijaz A, Lambert RD, Sirardlv M (1994) In vitro-cultured bovine granulosa and oviductal cells secrete sperm motility-maintaining factor(s). *Molecular Reproduction and Development* 37: 54-60.

Inbar G, Wolfenson D, Roth Z (2001) Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. *Journal Dairy Science* 84: 465.

Ingenhoff L, Hall E, Ranjbar Ni S et al (2017) Effect of insemination site and diameter of the pre-ovulatory follicle on the odds of pregnancy in heifers using sexed or non-sexed semen. *Australian Veterinary Journal* 95: 317-324.

Ireland JJ, Mihm M, Austin E et al (2000) Historical perspective of turnover of dominant follicles during the bovine estrous cycle: Key concepts, studies, advancements, and terms. *Journal of Dairy Science* 83: 1648-1658.

Ireland JJ, Roche JF (1987) Hypotheses regarding development of dominant follicles during a bovine estrous cycle. Editors: Roche JF and O'Callaghan D, In *Follicular Growth and Ovulation Rate in Farm Animals*, Martinus Nijhoff Publishers, Dublin, Ireland pp. 1-18.

Jain A, Yathish HM, Jain T et al (2011) Efficient production of sexed semen by flow cytometry: a review. *Agricultural Reviews* 32: 36-45.

Johnson LA, Flook JP, Hawk HW (1989) Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biology of Reproduction* 41: 199-203.

Johnson, L.A., Welch, G.R., Rens, W., 1999. The Beltsville sperm sexing technology: high-speed sorting gives improved sperm output for IVF and AI. *Journal of Animal Science* 2: 213-220.

Jordan ER, Schouten MJ, Quast JW et al (2002) Comparison of two timed artificial insemination (TAI) protocols for management of first insemination postpartum. *Journal of Dairy Science* 85: 1002-1008.

Juengel JL, Niswender GD (1999) Molecular regulation of luteal progesterone synthesis in domestic ruminants. *Journal of Reproduction and Fertility* 54: 193-205.

Kamphuis C, DelaRue B, Burke CR et al (2012) Field evaluation of two collar-mounted activity meters for detecting cows in estrus on a large pasture-grazed dairy farm. *Journal of Dairy Science* 95: 3045-3056.

Kaneko S, Oshiro S, Kobayashi T et al (1984) Human X- and Y-bearing sperm differ in cell surface sialic acid content. *Biochemical Biophysical Research Communications* 124: 950-955.

Karakaya E, Yilmazbas-Mecitoglu G, Keskin A et al (2014) Fertility in dairy cows after artificial insemination using sex-sorted sperm or conventional semen. *Reproduction in Domestic Animals* 49: 333-337.

Karakaya E, Yilmazbas-Mecitoglu G, Keskin A et al (2018) Fertility in dairy cows inseminated with sex-sorted or conventional semen after Ovsynch, PreSYNCH-Ovsynch and Double-Ovsynch protocols. *Reproduction in Domestic Animals* DOI: 10.1111/rda.13363

Kerbrat S, Disenhaus C (2004) A proposition for an updated behavioural characterization of the oestrus period in dairy cows. *Appl. Animal Behaviour Science* 87: 223-238.

Keskin A, Mecitoğlu G, Bilen, E et al (2016) The effect of ovulatory follicle size at the time of insemination on pregnancy rate in lactating dairy cows. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 40: 68-74.

Kiddy CA (1977) Variation in physical activity as an indication of estrus in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 60: 235-243.

King JOL (1977) The effect of oestrus on milk production in cows. *Veterinary Record* 101: 107-108.

Klinc P, Rath D (2006) Application of flowcytometrically sexed spermatozoa in different farm animal species: A review. *Archiv fur Tierzucht* 49: 41-54.

Kotwica J, Rekawiecki R, Duras M (2004) Stimulatory influence of progesterone on its own synthesis in bovine corpus luteum. *Bulletin Veterinary Institute in Pulawy* 48: 139-145.

Kuhn MT, Hutchison JL, Wiggans GR (2006) Characterization of holstein heifer fertility in the united states. *Journal of Dairy Science* 89: 4907-4920.

Kulick LJ, Bergfelt DR, Kot K et al (2001) Follicle selection in cattle: follicle deviation and codominance within sequential waves. *Biology of Reproduction* 65: 839-846.

Kurykin J (2017) Sex-Sorted Semen: Efficiency of insemination and opportunities to increase outcome of pregnancies in dairy and beef cattle-A review. *Veterinarija ir Zootechnika* 75: 22-29.

Kurykin J, Hallap T, Jalakas M et al (2016) Effect of insemination-related factors on pregnancy rate using sexed semen in Holstein heifers. *Czech Journal of Animal Science* 61: 568-577.

Kurykin J, Jaakma Ü, Jalakas M et al (2007) Pregnancy percentage following deposition of sex-sorted sperm at different sites within the uterus in estrus-synchronized heifers. *Theriogenology* 67: 754-759.

Kurykin J, Jaakma Ü, Waldmann A et al (2006) Low semen dose intracornual insemination of cows at fixed time after PGF_{2α} treatment or at spontaneous estrus. *Animal Reproduction Science* 95: 116-124.

Kurykin J, Jalakas M, Kaart T et al (2017) Efficiency of insemination with sexed semen at spontaneous estrus and synchronization of ovulation in lactating holstein cows. *Veterinarija ir Zootechnika* 75: 30-35.

Leidl W and Stolla R (1976). Measurement of electric resistance of the vaginal mucus as an aid for heat detection. *Animal Reproduction Science* 5: 259-273.

Lenz RW, Gonzalez-Marin C, Gilligan TB et al (2016) SexedULTRA™, a new method of processing sex-sorted bovine sperm improves conception rates. *Reproduction, Fertility and Development* 29: 203-204.

Lima FS, Ayres H, Favoreto MG et al (2011) Effects of gonadotropin-releasing hormone at initiation of the 5-d timed artificial insemination (AI) program and timing of induction of ovulation relative to AI on ovarian dynamics and fertility of dairy heifers. *Journal of Dairy Science* 94: 4997-5004.

Liszewska E, Rekawiecki R, Kotwica J (2005) Effect of progesterone on the expression of bax and bcl-2 and on caspase activity in bovine luteal cells. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* 78: 67-81.

Liu X, Spahr SL (1993) Automated electronic activity measurement for detection of estrus in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 76: 2906-2912.

Lopes AS, Butler ST, Gilbert RO et al (2007) Relationship of pre-ovulatory follicle size, estradiol concentrations and season to pregnancy outcome in dairy cows. *Animal Reproduction Science* 99: 34-43.

Lopez H, Bunch TD, Shipka MP (2002) Estrogen concentrations in milk at estrus and ovulation in dairy cows. *Animal Reproduction Science* 72: 37-46.

Lopez H, Sartori R, Wiltbank MC (2005) Reproductive hormones and follicular growth during development of one or multiple dominant follicles in cattle. *Biology of Reproduction* 72: 788-795.

Lopez H, Satter LD, Wiltbank MC (2004) Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science* 81: 209-223.

López-Gatius F (2000) Site of semen deposition in cattle: A review. *Theriogenology*, 53: 1407-1414.

López-Gatius F (2003) Is fertility declining in dairy cattle? A retrospective study in northeastern Spain. *Theriogenology* 60: 89-99.

López-Gatius F (2012) Factors of a noninfectious nature affecting fertility after artificial insemination in lactating dairy cows. A review. *Theriogenology* 77: 1029-1041.

Lopez-Gatius F, Lopez-Bejar M, Fenech M et al (2005a) Ovulation failure and double ovulation in dairy cattle: risk factors and effects. *Theriogenology* 63: 1298-1307.

Lopez-Gatius F, Santolaria P, Mundet I et al (2005 b). Walking activity at estrus and subsequent fertility in dairy cows. *Theriogenology* 63: 1419-1429.

Lovendahl P, Chagunda M, O'connell J et al (2008) Genetics of fertility indicators based on behaviour and progesterone in milk. *Cattle Practice* 17: 7-12.

Lovendahl P, Chagunda MGG (2010) On the use of physical activity monitoring for estrus detection in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 93: 249-259.

Lu KH, Seidel GE (2004) Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst development rates of bovine oocytes inseminated with flow cytometrically-sorted sperm. *Theriogenology* 62: 819-830.

Lucena JA, Kenyon AG, Reynolds JP et al (2014) Comparison between low-dose, high-sort and high-dose, low-sort semen on conception and calf sex ratio in Jersey heifers and cows. *Journal of Dairy Science* 97: 1-8.

Lucy MC (2007a). The bovine dominant ovarian follicle. *Journal of Animal Science* 85: E89–E99

Lucy MC (2007b) Fertility in high producing dairy cows: reasons for decline and corrective strategies for sustainable improvement. *Society of Reproduction and Fertility supplement* 64: 237-254.

Lucy MC, Savio JD, Badinga L et al (1992) Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *Journal of Animal Science*, 70: 3615-3626.

Lussier JG, Matton P, Dufour JJ (1987) Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *Journal of Reproduction and Fertility* 81: 301-307.

Lyimo ZC, Nielen M, Ouweltjes W et al (2000) Relationship among estradiol, cortisol and intensity of estrous behavior in dairy cattle. *Theriogenology* 53: 1783-1795.

Lynch CO, Kenny DA, Childs S et al (2010) The relationship between periovulatory endocrine and follicular activity on corpus luteum size, function, and subsequent embryo survival. *Theriogenology* 73: 190-198.

Macedo GG, Sa Filho M, Sala RV et al (2013) The use of sex-sorted sperm for reproductive programs in cattle. Editors: Alemayehu Lemma, *Success in artificial insemination, Chapter 3: Quality of Semen and Diagnostics Employed* pp: 39-63.

Macmillan KL, Shackell GH, Vishwanath R (1998) Comparative reproductive performance. Editors: Fielden ED, Smith JF. *Reproductive management of grazing ruminants in New Zealand*, New Zealand Society of Animal Production, Hamilton, pp: 43-64.

Madureira AML, Silper BF, Burnett TA et al (2015) Factors affecting expression of estrus measured by activity monitors and conception risk of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 98: 7003-7014.

Mai HM, Ogwu D, Eduvie LO et al (2002) Detection of oestrus in Bunaji cows underfield conditions. *Tropical Animal Health and Production* 34: 35-47.

Mallory DA, Lock SL, Woods DC et al (2013) Hot topic: Comparison of sex-sorted and conventional semen within a fixed-time artificial insemination protocol designed for dairy heifers. *Journal of Dairy Science* 96: 854-856.

Maltz E, Devir S, Metz JHM et al (1997) The body weight of the dairy cow. I. Introductory study into body weight changes in dairy cows as a management aid. *Livestock Science* 48: 175-186.

Mann GE, Fray MD, Lamming GE (2006) Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon-tau production in the cow. *Veterinary Journal* 171: 500-503.

Mann GE, Lamming GE (2001) Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction* 121: 175-180.

Mann GE, Robinson RS, Hunter MG (2007) Corpus luteum size and function following single and double ovulations in non-lactating dairy cows. *Theriogenology* 67: 1256-1261.

Mapletoft RJ, Steward KB, Adams GP (2002) Recent advances in the superovulation in cattle. *Reproduction Nutrition Development* 42: 601-611.

Martineau R (2003) Dinoprost Versus Cloprostenol: Does Route of Injection Modulate their Efficacy in Dairy Cattle? *Bovine Practitioner* 37: 10-19.

Maxwell WMC, Evans G, Hollinshead FK et al (2004) Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. *Animal Reproduction Science* 82-83: 79-95.

McCulloch K, Hoag DLK, Parsons J et al (2013) Factors affecting economics of using sexed semen in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 96: 6366-6377.

Meirelles C, Kozicki LE, Weiss RR et al (2012) Comparison between deep intracornual artificial insemination (DIAI) and conventional artificial insemination (AI) using low concentration of spermatozoa in beef cattle. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 55: 371-374.

Mellado M, Sepulveda E, Macias-Cruz U et al (2014) Effects of month of breeding on reproductive efficiency of Holstein cows and heifers inseminated with sex-sorted or conventional semen in a hot environment. *Tropical Animal Health and Production*, 46: 265-269.

Meyer HH, Mittermeier T, Schams D (1988) Dynamics of oxytocin, estrogen and progestin receptors in the bovine endometrium during the estrous cycle. *Acta Endocrinologica* 118: 96-104.

Mihm M, Baguisi A, Boland MP (1994) Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 102: 123-130.

Mihm M, Crowe MA, Knight PG et al (2002) Follicle wave growth in cattle. *Reproduction in Domestic Animals* 37: 191-200.

Mihm M, Evans ACO (2008) Mechanisms for dominant follicle selection in monovulatory species: a comparison of morphological, endocrine and intraovarian events in cows, mares and women. *Reproduction in Domestic Animals* 43: 48-56.

Miura R, Izumi T (2018) Relationship of the conception rate and the side (left or right) of preovulatory follicle location at artificial insemination in dairy heifers. *Animal Science Journal* 89: 328-331.

Mocé E, Graham JK, Schenk JL (2006) Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction. *Theriogenology* 66: 929-936.

Monk EL, Erb RE, Mollett TA (1975) Relationships between immunoreactive estrone and estradiol in milk, blood, and urine of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 58: 34-40.

Morton JM, Tranter WP, Mayer DG et al (2007) Effects of Environmental Heat on Conception Rates in Lactating Dairy Cows: Critical Periods of Exposure. *Journal of Dairy Science* 90: 2271-2278.

Müller R, Schrader L (2003) A new method to measure behavioural activity levels in dairy cows. *Applied Animal Behaviour Science* 83: 247-258.

Nebel RL (2003) Components of a successful heat detection program. *Advances in Dairy Technology* 15: 191-203.

Nebel RL, Dransfield MG, Jobst SM et al (2000) Automated electronic systems for the detection of oestrus and timing of AI in cattle. *Animal Reproduction Science* 60: 713-723.

Nebel RL, Jobst SM, Dransfield MBG (1997) Use of a radio frequency data communication system, HeatWatch, to describe behavioral estrus in dairy cattle. *Journal Dairy Science* 80: 179.

Noonan EJ, Kelly JC, Beggs DS (2016) Factors associated with fertility of nulliparous dairy heifers following a 10-day fixed-time artificial insemination program with sex-sorted and conventional semen. *Australian Veterinary Journal* 94: 145-148.

Norman HD, Hutchison JL, Miller RH (2010) Use of sexed semen and its effect on conception rate, calf sex, dystocia, and stillbirth of Holsteins in the United States. *Journal of Dairy Science* 93: 3880-3890.

Opsomer G, Coryn M, de Kruif A (2002) Postpartum anestrus in high yielding dairy cows. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 73: 112-118.

Orihuela A (2000) Some factors affecting the behavioural manifestation of oestrus in cattle: a review. *Applied Animal Behaviour Science* 70: 1-16.

Pahl C, Hartung E, Mahlkow-Nerge K et al (2015) Feeding characteristics and rumination time of dairy cows around estrus. *Journal of Dairy Science* 98: 148-154.

Palmer M, Olmos G, Boyle LA et al (2010) Estrus detection and estrus characteristics in housed and pastured Holstein-Friesian cows. *Theriogenology* 74: 255-264.

Parr RA, Davis IF, Miles MA et al (1993) Liver blood flow and metabolic clearance rate of progesterone in sheep. *Research in Veterinary Science* 55: 311-316.

Pellegrino CAG, Morotti F, Untura RM et al (2016) Use of sexed sorted semen for fixed-time artificial insemination or fixed-time embryo transfer of in vitro-produced embryos in cattle. *Theriogenology* 86: 888-893.

Peippo J, Vartia K, Kananen-Anttila K et al (2009) Embryo production from superovulated Holstein-Friesian dairy heifers and cows after insemination with frozen-thawed sex-sorted X spermatozoa or unsorted semen. *Animal Reproduction Science* 111: 80-92.

Peralta OA, Pearson RE, Nebel RL (2005) Comparison of three estrus detection systems during summer in a large commercial dairy herd. *Animal Reproduction Science* 87: 59-72.

Pereira MHC, Rodrigues AD, Martins T (2013) Timed artificial insemination programs during the summer in lactating dairy cows: Comparison of the 5-d Cosynch protocol with an estrogen/progesterone-based protocol. *Journal of Dairy Science* 96: 6904-6914.

Perry GA, Perry BL (2008) Effect of preovulatory concentrations of estradiol and initiation of standing estrus on uterine pH in beef cows. *Domestic Animal Endocrinology* 34: 333-338.

Perry GA, Smith MF, Lucy MC (2005) Relationship between follicle size at insemination and pregnancy status. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 102: 5268-5273.

Perry GA, Smith MF, Roberts AJ et al (2007) Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *Journal of Animal Science* 85: 684-689.

Peter AT, Levine H, Drost M et al (2009) Compilation of classical and contemporary terminology used to describe morphological aspects of ovarian dynamics in cattle. *Theriogenology* 71: 1343-1357.

Phillips CJC, Schofield SA (1990) The effect of environment and stage of the oestrous cycle on the behaviour of dairy cows. *Applied Animal Behavior Science* 27: 21-31.

Piccione G, Caola G, Refinetti R (2003) Daily and estrous rhythmicity of body temperature in domestic cattle. *BMC Physiology* 28: 3-7.

Pierson RA, Ginther OJ (1988) Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. *Theriogenology* 29: 21-37.

Pursley JR, Wiltbank MC, Stevenson JS et al (1997) Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *Journal of Dairy Science* 80: 295-300.

Rabaglino MB, Risco CA, Thatcher M.-J et al (2010) Application of one injection of prostaglandin F₂ α in the five-day Co-Synch+CIDR protocol for estrous synchronization and resynchronization of dairy heifers. *Journal of Dairy Science* 93: 1050-1058.

Rahe CH, Owens RE, Fleeger JL (1980) Pattern of plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: dependence upon the period of the cycle. *Endocrinology* 107: 498-503.

Rajakoski E (1960) The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special references to seasonal, cyclical and left-right variation. *Acta Endocrinologica* 52: 1-68.

Rajamahendran R, Robinson J, Desbottes S (1989) Temporal relationships among estrus, body temperature, milk yield, progesterone and luteinizing hormone levels, and ovulation in dairy cows. *Theriogenology* 31: 1173-1182.

Rajamahendran R, Taylor C (1990) Characterization of ovarian activity in postpartum dairy cows using ultrasound imaging and progesterone profiles. *Animal Reproduction Science* 22: 171-180.

Rath, D, Moench-Tegeder G, Taylor U et al (2009) Improved quality of sex-sorted sperm: A prerequisite for wider commercial application. *Theriogenology* 71: 22-29.

Rathbone MJ, Macmillan KL, Inskeep K et al 1998. Fertility regulation in cattle. *Journal of Controlled Release* 54: 117-148.

Ravagnolo O, Misztal I (2002) Effect of heat stress on nonreturn rate in holsteins- fixed-model analyses. *Journal of Dairy Science* 85: 3101-3106.

Ravagnolo O, Misztal I, Hoogenboom G (2000) Genetic component of heat stress in dairy cattle, development of heat index function. *Journal of Dairy Science* 83: 2120-2125.

Redden KD, Kennedy AD, Ingalls JR et al (1993) Detection of estrus by radiotelemetric monitoring of vaginal and ear skin temperature and pedometer measurements of activity. *Journal of Dairy Science* 76: 713-721.

Reith S, Brandt H, Hoy S (2014) Application of electronic estrus detection technologies to reproductive management of cattle. *Livestock Science* 170: 219-227.

Reith S, Hoy S (2017) Review: Behavioral signs of estrus and the potential of fully automated systems for detection of estrus in dairy cattle. *Animal* 12: 398-407

Rekawiecki R, Nowik M, Kotwica J (2005) Stimulatory effect of LH, PGE₂ and progesterone on StAR protein, cytochrome P450 cholesterol side chain cleavage and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase gene expression in bovine luteal cells. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* 78: 169-184.

Remmik A, Harma J, Varnik R (2016) Economic considerations for using sexed semen on Holstein cows and heifers in Estonia. *Agronomy Research* 14: 1671-1683.

Répaši A, Beckers J, Sulon J et al (2005) Effect of prostaglandin treatment on the corpus luteum, plasma progesterone concentration and the largest follicle in dairy cow. *Reproduction in Domestic Animals* 40: 436-442.

Rivera GM, Fortune JE (2003) Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins-4 and -5 in bovine follicular fluid: Implications for ovarian follicular selection and dominance. *Endocrinology* 144: 2977-2987.

Rivera H, Lopez H, Fricke PM (2004) Fertility of Holstein dairy heifers after synchronization of ovulation and timed ai or ai after removed tail chalk. *Journal of Dairy Science* 87: 2051-2061.

Robinson RS, Fray MD, Wathes DC et al (2006) In vivo expression of interferon tau mRNA by the embryonic trophoblast and uterine concentrations of interferon tau protein during early pregnancy in the cow. *Molecular Reproduction and Development* 73: 470-474.

Robinson RS, Mann GE, Lammig GE (2001) Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. *Reproduction* 122: 965-979.

Robinson RS, Mann GE, Lammig GE et al (1999) The effect of pregnancy on the expression of uterine oxytocin, oestrogen and progesterone receptors during early pregnancy in the cow. *The Journal of Endocrinology* 160: 21-33.

Roche JF (2006) The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. *Animal Reproduction Science* 96: 282-296.

Rodríguez-Martínez H (2006) Can we increase the estimative value of semen assessment? *Reproduction in Domestic Animals* 41: 2-10.

Roelofs J, Lopez-Gatius F, Hunter RH et al (2010) When is a cow in estrus? Clinical and practical aspects. *Theriogenology* 74: 327-344.

Roelofs J, Van Eerdenburg FJCM, Soede NM et al (2005a) Pedometer readings for estrous detection and as predictor for time of ovulation in dairy cattle. *Theriogenology* 64: 1690-1703.

Roelofs JB, Erp-van der Kooij E (2015) Estrus detection tools and their applicability in cattle: recent and perspectival situation. *Animal Reproduction* 12: 498-504.

Roelofs JB, Graat EAM, Mullaart E et al (2006). Effects of insemination-ovulation interval on fertilization rates and embryo characteristics in dairy cattle. *Theriogenology* 66: 2173-2181.

Roelofs JB, van Eerdenburg FJCM, Soede NM et al (2005b) Various behavioral signs of estrous and their relationship with time of ovulation in dairy cattle. *Theriogenology* 63: 1366-1377.

Rorie RW, Bilby TR, Lester TD (2002) Application of electronic estrus detection technologies to reproductive management of cattle. *Theriogenology* 57: 137-148.

Roth H (1987) Automatisches Erkennen des Konzeptionsoptimums bei Milchkühen mit Hilfe rechnergestützter Systeme zur Herdenüberwachung. Editors: Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Landbauforschung, Völkenrode, Sonderheft pp: 228.

Sá Filho MF, Ayres H, Ferreira RM et al (2010) Strategies to improve pregnancy per insemination using sex-sorted semen in dairy heifers detected in estrus. *Theriogenology* 74: 1636-1642.

Sà Filho MF, Girotto R, Abe EK et al (2012) Optimizing the use of sex-sorted sperm in timed artificial insemination programs for suckled beef cows. *Journal of Animal Science* 90: 1816-1823.

Sá Filho MF, Mendanha MF, Sala RV et al (2013) Use of sex-sorted sperm in lactating dairy cows upon estrus detection or following timed artificial insemination. *Animal Reproduction Science* 143: 19-23.

Saacke RG (2008) Insemination factors related to timed AI in cattle. *Theriogenology* 70: 479-484.

Sales JNS, Neves KAL, Souza AH et al (2011) Timing of insemination and fertility in dairy and beef cattle receiving timed artificial insemination using sex-sorted sperm. *Theriogenology* 76: 427-435.

Sangsrivong S, Combs DK, Sartori R et al (2002) High feed intake increases blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 β in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 85: 2831-2842.

Sartori R, Haughian JM, Shaver RD et al (2004) Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *Journal of Dairy Science* 87: 905-920.

Sartori R, Souza AH, Guenther JN et al (2004) Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. *Animal Reproduction* 1: 86-90.

Schams D, Berisha B (2004) Regulation of corpus luteum function in cattle – an overview. *Reproduction in Domestic Animals* 39: 241-251.

Schenk JL, Cran DG, Everett RW et al (2009) Pregnancy rates in heifers and cows with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per inseminate, sorting pressure and sperm storage before sorting. *Theriogenology* 71: 717-728.

Schenk JL, Suh TK, Cran DG et al (1999) Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. *Theriogenology* 52: 1375-1391.

Schenk JL, Suh TK, Seidel GE (2006) Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm. *Theriogenology* 65: 299-307.

Schofield SA, Phillips CJC, Owens AR (1991) Variation in milk production, activity rate and electrical impedance of cervical mucus over the oestrus period of dairy cows. *Animal Reproduction Science* 24: 231-248.

Schüller LK, Burfeind O, Heuwieser W (2014) Impact of heat stress on conception rate of dairy cows in the moderate climate considering different temperature – humidity index thresholds, periods relative to breeding, and heat load indices. *Theriogenology* 81: 1050-1057.

Schüller LK, Heuwieser W (2016) Measurement of heat stress conditions at cow level and comparison to climate conditions at stationary locations inside a dairy barn. *Journal of Dairy Research* 83: 305-311.

Schüller LK, Michaelis I, Heuwieser W (2017) Impact of heat stress on estrus expression and follicle size in estrus under field conditions in dairy cows. *Theriogenology* 102: 48-53.

Seidel GE (2003) Economics of selecting for sex: The most important genetic trait. *Theriogenology* 59: 585-598.

- Seidel GE (2007) Overview of sexing sperm. *Theriogenology* 68: 443-446.
- Seidel GE (2012) Sexing mammalian sperm – Where do we go from here? *Journal of Reproduction and Development* 58: 505-509.
- Seidel GE (2014) Update on sexed semen technology in cattle. *Animal* 8: 160-164.
- Seidel GE Jr, Schenk JL, Herickhoff LA et al (1999) Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology*, 52: 1407-1420.
- Seidel GE, Garner DL (2002) Current status of sexing mammalian spermatozoa. *Reproduction* 124: 733-743.
- Seidel GE, Schenk JL (2008) Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per inseminate and site of sperm deposition. *Animal Reproduction Science* 105: 129-138.
- Senger PL (1994) The estrus detection problem: new concepts, technologies, and possibilities. *Journal of Dairy Science* 77: 2745-2753.
- Senger PL (2003) Pathways to pregnancy and parturition. Editors: Senger PL, Second edition, Chapter 8: Reproductive cyclicity-The Follicular Phase and Chapter 9: Reproductive Cyclicity-The Luteal Phase, Press by Current Conceptions Inc. Pullman, Washington, pp: 164-213.
- Sharpe JC, Evans KM (2009) Advances in flow cytometry for sperm sexing. *Theriogenology* 71: 4-10.
- Silper BF, Madureira AML, Kaur M et al (2015) Short communication: Comparison of estrus characteristics in Holstein heifers by 2 activity monitoring systems. *Journal of Dairy Science* 98: 3158-3165.
- Silvia WJ, Lewis GS, McCracken JA et al (1991) Review: Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F₂alpha during luteolysis in ruminants. *Biology of Reproduction* 45: 655-663.
- Sirois J, Fortune JE (1988) Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biology of Reproduction* 39: 308-317.
- Skarzynski DJ, Ferreira-Dias G, Okuda K (2008) Regulation of luteal function and corpus luteum regression in cows: hormonal control, immune mechanisms and intercellular communication. *Reproduction in Domestic Animals* 2:57-65.

Skenandore CS, Cardoso FC (2017) The effect of tail paint formulation and heifer behavior on estrus detection. *International Journal of Veterinary Science and Medicine* 5: 113-120.

Smith MF, McIntush EW, Smith GW (1994) Mechanisms associated with corpus luteum development. *Journal of Animal Science* 72: 1857-1872.

Souza AH, Gümen A, Silva EPB et al (2007) Supplementation with estradiol-17 β before the last gonadotropin-releasing hormone injection of the ovsynch protocol in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 90: 4623-4634.

Spicer LJ, Echtenkamp SE (1986) Ovarian follicular growth, function and turnover in cattle: A review. *Journal of Animal Science* 62: 428-451.

Stevenson JL, Rodrigues JA, Braga FA et al (2008) Effect of breeding protocols and reproductive tract score on reproductive performance of dairy heifers and economic outcome of breeding programs. *Journal of Dairy Science* 91: 3424-3438.

Stevenson JS, Hill SL, Nebel RL et al (2014) Ovulation timing and conception risk after automated activity monitoring in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 1-13.

Stevenson JS, Phatak AP (2004) Inseminations at estrus induced by presynchronization before application of synchronized estrus and ovulation. *Journal of Dairy Science* 88: 399-405.

Sturman H, Oltenacu EAB, Foote RH (2000) Importance of inseminating only cows in estrus. *Theriogenology* 53: 1657-1667.

Swanson LV, Hafs HD, Morrow DA (1972) Ovarian characteristics and serum LH, prolactin, progesterone and glucocorticoids from first estrus to breeding size in Holstein heifers. *Journal of Animal Science* 34: 284-293.

Taylor JF, Schnabel RD, Sutovsky P (2018) Review: Genomics of bull fertility. *Animal*, 12: 172-183.

Thomas JM, Locke JWC, Vishwanath R et al (2017) Effective use of SexedULTRA™ sex-sorted semen for timed artificial insemination of beef heifers. *Theriogenology* 98: 88-93.

Thomas JM, Smith MF, Patterson DJ et al (2014) Delayed insemination of non-estrous heifers and cows when using conventional semen in timed artificial insemination. *Journal of Animal Science* 92: 4189-4197.

Thorburn GD, Cox RI, Currie WB et al (1973) Prostaglandin F and progesterone concentrations in the utero-ovarian venous plasma of the ewe during the estrus cycle and early pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 18: 151-158.

Townson DH, Tsang PCW, Butler WR et al (2018) Relationship of fertility to ovarian follicular waves before breeding in dairy cows. *Journal of animal science* 80: 1053-1058.

Trimberger GW (1948) Breeding efficiency in dairy cattle from artificial insemination at various intervals before and after ovulation. *Historical Research Bulletins of the Nebraska Agricultural Experiment Station (1913-1993)* 153: 1-29.

Trimberger GW, Davis HP (1943) Conception rate in dairy cattle by artificial insemination at various stages of estrus. *Historical Research Bulletins of the Nebraska Agricultural Experiment Station (1913-1993)* 129: 1-17.

Tubman LM, Brink Z, Suh TK et al (2004) Characteristics of calves produced with sperm sexed by flow cytometry/cell sorting. *Journal of Animal Science* 82: 1029-1036.

TÜİK (2018) Türkiye Dış Ticaret Miktarları ve Değerleri <http://www.tuik.gov.tr> (09.10.2018).

Valenza A, Giordano JO, Lopes Jr G et al (2012) Assessment of an acceleration system for detection of estrus and treatment with gonadotropin-releasing hormone at the time of insemination in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 95: 7115-7127.

Van Eerdenburg FJCM, Karthaus D, Taverne MAM et al (2002) The Relationship between estrous behavioral score and time of ovulation in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 85: 1150-1156.

Van Eerdenburg FJCM, Loeffler HSH, Van Vliet JH (1996) Detection of oestrus in dairy cows: a new approach to an old problem. *Veterinary Quarterly* 18: 52-54.

Van Munster EB, Stap J, Hoebe RA et al (1999) Difference in sperm head volume as a theoretical basis for sorting X- and Y-bearing spermatozoa: potentials and limitations. *Theriogenology* 52: 1281-1293.

Van Vliet JH, van Eerdenburg FJCM (1996) Sexual activities and oestrus detection in lactating Holstein cows. *Applied Animal Behaviour Science* 50: 57-69.

Vartia K, Taponen J, Heikkinen J et al (2017) Effect of education on ability of AI professionals and herd-owner inseminators to detect cows not in oestrus and its relation with progesterone concentration on day of re-insemination. *Theriogenology* 102: 23-28.

Vasconcelos JLM, Pereira MHC, Meneghetti M et al (2013) Relationships between growth of the preovulatory follicle and gestation success in lactating dairy cows *Animal Reproduction Science* 10: 206-214.

Vasconcelos JLM, Sangsritavong S, Tsai SJ et al (2003) Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. *Theriogenology* 60: 795-807.

Vasconcelos JLM, Sartori R, Oliveira HN et al (2001) Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology* 56: 307-314.

Vasconcelos JLM, Silcox RW, Rosa GJ et al (1999) Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology* 52: 1067-1078.

Vazquez JM, Martinez EA, Parrilla I et al (2003) Birth of piglets after deep intrauterine insemination with flow cytometrically sorted boar spermatozoa. *Theriogenology* 59: 1605-1614.

Vazquez JM, Parrilla I, Gil MA et al (2008) Review article improving the efficiency of insemination with sex-sorted spermatozoa sperm sorting by dna content. *Reproduction in Domestic Animals* 43: 1-8.

Verberckmoes S, Van Soom A, Dewulf J et al (2005) Low dose insemination in cattle with the Ghent device. *Theriogenology* 64: 1716-1728.

Vishwanath R, Moreno J F (2018) Review: Semen sexingcurrent state of the art with emphasis on bovine species. *Animal* 12: 85-96.

Vishwanath R 2014. SexedULTRA-raising the fertility bar of sexed sorted semen. 25th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction, National Association of Artificial Breeders, Wisconsin, USA, pp: 57-61.

Walker WL, Nebel RL, McGilliard ML (1996) Time of ovulation relative to mounting activity in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 79: 1555-1561.

Wangchuk K, Wangdi J, Mindu M (2018) Comparison and reliability of techniques to estimate live cattle body weight. *Journal of Applied Animal Research* 46: 349-352.

Webb R, Garnsworthy PC, Gong JG et al (2004) Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. *Journal of Animal Science* 82: E63-E74.

Webb R., Nicholas B, Gong JG et al (2003) Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reproduction Supplement* 61: 71-90.

Weigel KA (2004) Exploring the role of sexed semen in dairy production systems. *Journal of Dairy Science* 87: 120-130.

- Welch GR, Johnson LA (1999) Sex preselection: laboratory validation of the sperm sex ratio of flow sorted X- and Y-sperm by sort reanalysis for DNA. *Theriogenology* 52: 1343-1352.
- West JW (2003) Effects of heat-stress on production in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 86: 2131-2144.
- Wettemann RP, Hafs HD, Edgerton LA et al (1972) Estradiol and progesterone in blood serum during the bovine estrous cycle. *Journal of Animal Science* 34: 1020-1024.
- Williamson NB, Morris RS, Blood DC et al (1972) A study of oestrus behaviour and oestrus detection methods in a large commercial dairy herd. The relative efficiency of methods of oestrus detection. *Veterinary Record* 91 :50-58.
- Wilson SJ, Kirby CJ, Koenigsfeld AT et al (1998) Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 81: 2132-2138.
- Wiltbank M, Lopez H, Sartori R et al (2006) Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology* 65: 17-29.
- Wiltbank MC, Fricke PM, Sangsritavong S et al (2000) Mechanisms that prevent and produce double ovulations in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 83: 2998-3007.
- Wiltbank MC, Pursley JR (2014) The cow as an induced ovulator: Timed AI after synchronization of ovulation. *Theriogenology* 81: 170-185.
- Wiltbank MC, Sartori R, Herlihy MM et al (2011) Managing the dominant follicle in lactating dairy cows. *Theriogenology* 76: 1568-1582.
- Wiltbank MC, Souza AH, Carvalho PD et al (2012) Improving fertility to timed artificial insemination by manipulation of circulating progesterone concentrations in lactating dairy cattle. *Reproduction, Fertility and Development* 24: 238-243.
- Wolfenson D, Roth Z, Meidan R (2000) Impaired reproduction in heat-stressed cattle basic and applied aspects. *Animal Reproduction Science* 60: 535-547.
- Wolfenson D, Inbar G, Roth Z et al (2004) Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. *Theriogenology* 62: 1042-1055.
- Xu ZZ, Burton LJ, Macmillan KL (1996) Reproductive performance of lactating dairy cows following oestrus synchronization regimens with PGF_{2α} and progesterone. *Theriogenology* 47: 687-701.

Xu ZZ, McKnight DJ, Vishwanath R et al (1998) Estrus detection using radiotelemetry or visual observation and tail painting for dairy cows on pasture. *Journal of Dairy Science* 81: 2890-2896.

Yániz JL, Santolaria P, Giribet A et al (2006) Factors affecting walking activity at estrus during postpartum period and subsequent fertility in dairy cows. *Theriogenology* 66:1943-1950.

Zuluaga JF, Saldarriaga JP, Cooper DA et al (2007) Evaluation of vaginal electrical resistance as an indicator of follicular maturity and suitability for timed artificial insemination in beef cows subjected to a synchronization of ovulation protocol. *Animal Reproduction Science* 109: 17-26.



7. SİMGELER ve KISALTMALAR

LH	Lüteinleştirici Hormon
FSH	Folikül Stimüle edici Hormon
GnRH	Gonadotropin Salınım Hormonu
FSH-R	Folikül Stimüle edici Hormon Reseptörü
IGF	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IGFBP	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Protein
LH-R	Lüteinleştirici Hormon Reseptörü
CL	Korpus Luteum
PGF_{2α}	Prostaglandin F ₂ alfa
IFN τ	İnterferon Tau
CBS	Cinsiyeti Belirlenmiş Sperma
KS	Konvansiyonel Sperma
US	Ultrasonografi
SNİ	Sıcaklık Nem İndeksi
THI	Temperature Humidity Index

8. EKLER

Ek-1. Tez çalışmasına dahil edilen düvelerin ovaryum muayene formu

TARİH :

SIRA	KULAK NO	TR NO	SOL OVARYUM FOLİKÜL	SOL OVARYUM CL	SAĞ OVARYUM FOLİKÜL	SAĞ OVARYUM CL
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
21						
22						
23						
24						
25						
26						
27						
28						
29						

Ek-2. Kayıt Formu

SIRA NO	KULAK NO	TOH. ANI YAŞ (gün)	ÖSTRUS PROT	ÖSTRUS BAŞ. SAATİ	ST ANI İNDEKS	PİKE ÇIKTIĞI SAAT	ÖSTRUS BİTİŞ SAATİ	ST SAATİ	TOPLAM ÖSTRUS SAATİ	TOHUMLAYICI	BOĞA ADI	FOLİKÜL ÇAPI	ÖSTRUS - ST SAAT FARKI	DENEY GRUBU
1														
2														
3														
4														
5														
6														
7														
8														
9														
10														
11														
12														
13														
14														
15														

Ek-3. Ovulasyon Kontrol Formu

ÇİFTLİK:

BAŞ. TARİH:

KULAK NO	ST TARİHİ VE SAATİ	1. OV. MUAYENE ZAMANI	SONUÇ	2. OV. MUAYENE ZAMANI	SONUÇ	3. OV. MUAYENE ZAMANI	SONUÇ	4. OV. MUAYENE ZAMANI	SONUÇ	ST OVULASYON ARASI SÜRE

9. TEŞEKKÜR

Doktora hayatım boyunca bilimin önemini yaşayarak gösteren, hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen ve mesleğimin icrasında örnek olup vizyonumu açan başta danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet GÜMEN'e, Sayın Prof.Dr. Abdülkadir KESKİN ve Sayın Doç.Dr. Gülnaz YILMAZBAŞ-MECİTOĞLU hocalarıma sonsuz teşekkürü borç bilirim. Tezimde bulguların istatistiki değerlendirilmesinde bana her zaman yardımcı olan Sayın Doç. Dr. Abdülkadir ORMAN hocama teşekkür ederim. Doktora eğitimimde katkıları bulunan tüm hocalarıma, çalışma ortamını paylaştığım tüm asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmam için desteklerini unutmayacağım Sayın Uluova Süt Tic. AŞ. Genel Müdürü Mesut BURAN abime, bilgisiyle genç bilim insanlarına örnek olan Vet. Hek. Melih ERTÜRK abime, Zir. Müh. Atıf ÇAPACI, Zir. Müh. Onur DURGUN ve Vet. Hek. Mehmet Fatih ŞAHAN arkadaşlarıma ve tüm ULUOVA ailesine teşekkür ederim.

Doktora hayatımın her anını paylaştığım, bana her daim başarabilme duygusunu yaşatan eşim Vet. Hek. Elif GÜNER'e ve beni bugünlere getiren tüm aileme minnettarım

10. ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Bilecik’de doğmuştur. İlk, orta ve lise eğitimlerini Bilecik iline bağlı Bozüyük ilçesinde tamamlamıştır. 2007-2013 yılları arasında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nde eğitim görmüştür. 2014 yılında aynı fakültenin Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı’nda doktora eğitimine başlamıştır. Uludağ Üniversitesi’nde 2015-2018 yılları arasında Araştırma Görevlisi olarak çalışmıştır. 2018 yılından itibaren Balıkesir Üniversitesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı’nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.



BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

TEZ ÇOĞALTMA VE ELEKTRONİK YAYIMLAMA İZİN FORMU

Yazar Adı Soyadı	Barış GÜNER
Tez Adı	Sütçü Düvelerde Cinsiyeti Belirlenmiş Sperma İle Östrus Başlangıcını Takiben Farklı Saatlerde Tohumlamanın Gebelik Oranı Üzerine Etkisi
Enstitü	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Veteriner Doğum ve Jinekoloji
Tez Türü	Doktora
Tez Danışmanı	<i>Prof. Dr. Ahmet GÜMEN</i>
Çoğaltma (Fotokopi Çekim) İzni Kısıtlama	<input type="checkbox"/> Patent Kısıt (2 yıl) <input type="checkbox"/> Genel Kısıt (6 ay) <input checked="" type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasına izin veriyorum.

Hazırlamış olduğum tezimin belirttiğim hususlar dikkate alınarak, fikri mülkiyet haklarım saklı kalmak üzere Bursa Uludağ Üniversitesi Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı tarafından hizmete sunulmasına izin verdiğimi beyan ederim.

Tarih : 30.01.2019

İmza : 