

KURT VE KANGAL IRKI KÖPEKLERİN TAZE VE SULANDIRILMIŞ SPERMALARININ SPERMATOLOJİK ÖZELLİKLERİ VE VIABİLİTESİ ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR*

M. Mürsel BÜYÜKÇOBAN**

M. Kemal SOYLU***

ÖZET

Bu çalışmada, Kurt (Alman Çoban Köpeği; German Shepherd Dog) ve Kangal ırkı köpeklerin spermatolojik özelliklerinin ve sulandırılmış spermalarının viabilitelerinin araştırılması amaçlandı. Bu amaçla, Gemlik Askeri Araştırma Eğitim Merkez Komutanlığı Köpek Eğitim Merkezinde bulunan sekiz Kurt ve sekiz Kangal köpeği kullanıldı. Köpeklerden penis masajı yöntemiyle sperma alındı. Alınan spermalar hacim, motilite, spermatozoit yoğunluğu, ölü, anormal, akrozom defektli spermatozoit oranları ve pH, yönünden muayene edildiler. Anılan değerlerin ortalamaları Kurt ve Kangal ırkı köpekler için sırasıyla 3.32 ml, , % 80.80, 393.70x10⁶/ml, % 2.98, % 13.08, % 2.29 ve 6.34; 3.65 ml, % 72.01, 335.20x10⁶/ml, % 2.93, % 10.00, % 1.78 ve 6.05 olarak saptandı. Viabilite muayenesi için spermalar Tris + Glikoz + Sitrik asit + Yumurta Sarısı (T-YS) ve Sodyumdihidrojenfosfat + Glisin + Glikoz + Yumurta Sarısı (SDHP-YS) sulandırıcılarıyla sulandırılıp ısıları +4°C'ye düşürülerek motiliteleri sona erinceye kadar 12 saat arayla muayene edildiler. T-YS sulandırıcısı ile sulandırılan örnekte 108., SDHP-YS sulandırıcısı ile sulandırılan örnekte 36. saatte motilite sona erdi.

Anahtar kelimeler: Köpek, Taze-, Sulandırılmış sperma, Viabilite.

* Aynı isimli Doktora tezinden özetlenmiştir.

** Vet. Hek. Dr.; Nilüfer Belediyesi Veteriner İşleri Müdürü, Bursa-Türkiye.

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

SUMMARY

Investigations on Spermatological Characteristics and Viability of Fresh and Diluted Semen of German Shepherd Dogs and Kangal Dogs

In the present study, it is aimed to investigate the spermatological characteristics and the viability of fresh and diluted semen of German Shepherd Dogs and Kangal Dogs comparatively. For this aim, eight German Shepherd Dogs and eight Kangal Dogs, bred in Gemlik Military Research Training Center Commandary, were used. Semen was collected by digital manipulation. Collected semen samples were examined for volume, motility, spermatozoid concentration, percentages of abnormal, dead, acrosome defected spermatozooids and pH. The averages of the mentioned characteristics of German Shepherd Dogs and Kangal Dogs were found 3.32 ml, % 80.80, $393.70 \times 10^6/ml$, % 13.08, % 2.98, % 2.29 and 6.34; 3.65 ml, % 72.01, $335.20 \times 10^6/ml$, % 10.00, % 2.93, % 1.78 and 6.05, respectively. Semen samples were diluted with Tris + Glucose + Citric acid + Egg Yolk (T-YS) and Sodiumdihydrogenphosphate + Glycin + Glucose + Egg Yolk (SDHP-YS) diluents and cooled to +4°C for viability examination, and examined at 12 hours interval until the motility ended. Motility was ended on 108th and 36th hours for semen diluted with T-YS and SDHP-YS diluents, respectively.

Key words: Dog, Fresh-, Diluted semen, Viability.

GİRİŞ

Köpek yetiştiriciliği günümüzde süs hayvanı olarak güncellik kazanmaya başlamıştır¹. Bu gelişmeye paralel olarak insanlar arasında toplumsal olarak yer bulan evcil hayvan bakımının gittikçe arttığı görülmektedir. Kırsal kesime ek olarak artık kentsel yerleşim yerlerinde de gerek küçük, gerekse büyük cüsseli her cins köpek ırklarının sahiplenme ve yetiştirme sayısı çoğalmaya başlamıştır. Erkek köpeklerin fertilizasyon kapasitesinin belirlenmesi, elde edilen yavru sayısı ile ölçülmektedir. Bunun için öncelikle sperma muayenesi yapılması gerekir. Köpeklerde sperma muayenesi yapmak için çeşitli sperma alma teknikleri uygulanmaktadır. Bu konuda araştırmacılar en pratik yöntemin el masajı (digital manipülasyon) yöntemi olduğu kanısında birleşmektedirler²⁻⁷. Üç fraksiyondan oluşan köpek spermasının ikinci fraksiyonu spermatozoondan zengin olan bölümdür ve genelde spermatolojik olarak yapılan tüm araştırmalarda kullanılan kısımdır¹⁻¹⁴. Gökçen ve ark.¹, Kangal, Kurt köpeği ve melezleri üzerinde yaptıkları bir çalışmada ikinci fraksiyondaki ortalama hacmi 2.24 cm³, Tekin ve ark.², Kangal köpeklerinde 2.0 ml, Kurt köpeklerinde 2.4 ml olarak saptadıklarını bildirirlerken, çeşitli köpek ırklarında çalışma yapan Settergen³ 0.5-4.0 ml, Arthur ve ark.⁴ 0.5-3.5 ml olarak bildirmektedirler.

Bir sperma örneğinin muayenesinde motilite en önemli özellik olarak kabul edilmektedir¹⁵. Yaptıkları çalışmalarda motilite ortalamalarını Gökçen ve ark.¹ % 60.0, Tekin ve ark.² Kangal köpeklerinde % 62.6, Kurt Köpeklerinde % 67.8, Ellington ve ark.¹⁴ % 73.0 olarak bildirmektedirler. Kimi araştırmacılar^{7,16-18} 0-4 arasında derecelendirdikleri motilitenin, fekondasyonda yeterli açısından 4 (% 75-100) arasında olması gerektiğini vurgulamaktadırlar.

Spermatozoit yoğunluğunu Gökçen ve ark.¹ Kangal ve Kurt Köpeklerinde ortalama olarak 680×10^6 /ml bulduklarını bildirirken, diğer bir çalışmada² Kangallarda 524.0×10^6 /ml, Kurt Köpeklerinde 305.0×10^6 /ml olarak saptandığı bildirilmektedir. Tsutsui ve ark.¹⁷ çeşitli ırk köpeklerde spermatozoon yoğunluğunu $1.2-8.5 \times 10^8$ /ml arasında ortalama 4.1×10^8 /ml saptamışlardır.

Spermanın kaliteli olarak nitelendirilmesi için anormal, ölü ve akrozom defektli spermatozoon oranlarının belirli bir yüzdenin üzerine çıkmaması gerekmektedir. Anormal spermatozoon oranını kimi araştırmacılar % 40 olarak belirtirken¹⁹, kimileri de % 30'dan fazla olmaması gerektiğini bildirmektedirler²⁰. Spermada ölü spermatozoon oranının yüksek olmaması arzu edilen bir durumdur. Bu oranının % 20'yi geçmemesi sperma kalitesi yönünden önemli bir kriterdir¹⁶. Bu oranı Gökçen ve ark.¹, % 32.24 (Kangal ve Kurt Köpeklerinin ortalaması olarak) Tekin ve ark.², Kangallarda % 6.7, Kurt Köpeklerinde % 6.1, Yurdaydın ve Kotzab²¹ % 17.4 olarak saptadıklarını bildirirken, Yubi ve ark.²², % 9.33-9.50 değerlerini vermektedirler.

Anormal ve ölü spermatozoon oranı kadar istenmeyen bir özellik olan akrozom defektli spermatozoon oranını Gökçen ve ark.¹ % 0.24, Kawakami ve ark. ise¹⁸ % 2.2 olarak saptadıklarını bildirmektedirler. Köpek sperması ile yapılan çalışmalarda 6.1-7.0 arasında pH değerleri saptandığı bildirilmektedir^{1-3,6,18}.

Sun'i tohumlama uygulamalarında en iyi sonuçlar taze sperma ile alınmakta ise de, spermanın daha sonra kullanılma zorunluluğu olduğu durumlarda mutlaka sulandırılması ve ısısının düşürülerek saklanması gerekmektedir. Bu konu ile ilgili olarak köpek spermasını sulandırarak +4°C'ta saklandığı çalışmalarda Brochart ve Coulomb²³ dört gün sonra % 50, Harrop²⁴ 4-6 gün sonra % 40-60, Bahlau²⁵ ise sekiz gün sonra % 44.5 motilite saptadıklarını bildirmektedirler.

Bu çalışmada Kurt ve Kangal ırkı köpeklerin spermatolojik özelliklerinin saptanması ve bu köpeklere ait sulandırılmış ve ısıları +4°C'a düşürülmüş spermalarının motilite muayaneleri ile viabilitelerinin saptanması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOD

Materyal olarak Gemlik Askeri Araştırma Eğitim Merkez Komutanlığı bünyesindeki Köpek Eğitim Merkezinde bulunan sekiz Kurt ve sekiz Kangal ırkı köpek kullanıldı. Sperma köpeklerden el masajı yöntemi ile gün aşırı alındı.

gözenmektedir^{1,9-11,13,14,22,27,28}. Ülkemizde yetiştirilen yerli bir ırk olması nedeniyle Kangal ırkı ile yapılan yabancı çalışma bulunmamaktadır. Ülkemizde ise sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır^{1,2,5-7,21}. Sunulan çalışmada Kurt ve Kangal ırkı köpeklerde sperma hacmi ortalamaları sırasıyla 3.32 ml ve 3.65 ml olarak bulundu. Bu değerler Kangal ırkı köpeklerde biraz daha yüksek olmasına karşın birbirine oldukça yakındır. Elde edilen bu sonuçlar literatür verileriyle karşılaştırıldığında her iki köpek ırkının çalışmalarda elde edilen sonuçlara yakınlığı değişiklik göstermektedir. Bunlar 0.1-4.0 ml²⁹ ve 0.5-4.0 ml³ değerlerinin içinde kalırken, Kangalların değeri 0.5-3.5 ml⁴ değerinin biraz üzerinde yer almış, Kurt köpeklerinin değeri ise üst sınırın biraz altında kalmıştır.

Sunulan çalışmada Kangal ırkı köpeklerde bulunan % 72.01 oranındaki motilitenin, Kurt köpeklerin % 80.80 oranından daha düşük olduğu görülmektedir. Aralarında çok fazla fark olmayan bu verilerin Kangallarda Ellington ve ark.nın¹⁴ % 73.90'lık, Kurt köpeklerinde Yurdaydın ve Kotzab'ın²¹ % 80.75'lik sonuçlarıyla hemen hemen aynı oldukları görülmektedir. Bu oranlar çeşitli araştırmalarda elde edilen % 85^{29,30}, % 90-95^{9,15}, % 89.6³¹ ve % 87³² değerlerinin altında yer alırken Gökçen ve ark.nın¹ % 60'lık, Tekin ve ark.nın² Kangallardaki % 62.6'lık, Kurt köpeklerindeki % 67.8'lik sonuçların üzerinde yer almaktadır.

Araştırmada Kurt köpeklerinde 393.70x10⁶/ml, Kangallarda 335.20x10⁶/ml, olarak bulunan yoğunluk değerleri arasında fark olmasına karşın, bu fark istatistiki açıdan önemli bulunmadı. Bununla birlikte Kurt köpeklerinin spermatozoit yoğunluğunun Kangallardan yüksek olduğu görülmektedir. England ve Allen'in⁹ 380-390x10⁶/ml değeri sunulan çalışmadaki Kurt köpeklerinin değerine yakın, Kangalların değerinden ise yüksektir. Ayrıca 350x10⁶/ml³³ ve 365x10⁶/ml³⁴ değerleri de Kangal ve Kurt köpeklerine ait değerlere yakınlık göstermektedir.

Bir köpeğin gebelik ve yavru verimini etkileyen faktörlerin başında normal ve canlı, diğer bir deyişle anormal ve ölü spermatozoon oranı gelmektedir. Sunulan çalışmada Kurt köpeklerinde anormal ve ölü spermatozoon oranları sırasıyla % 13.08 ve % 2.98 olarak saptanırken, anılan özellikler Kangallarda % 10.10 ve % 2.93 olmuştur. Literatür verileriyle karşılaştırıldığında anormal spermatozoon oranlarının kimi araştırmacıların sonuçlarına yakın^{2,16,18,21}, kimilerinin ise altında^{1,2,8,9,14,19,20,27,29,30} yer aldığı görülmektedir. Genel olarak araştırmacılar anormal spermatozoon oranının % 20'yi geçmemesi gerektiğini belirtmektedirler^{4,9,15,29,32}. Gerek Kurt gerekse Kangal ırkı köpeklere ait değerler bu verilerin altında yer almaktadır.

Sunulan çalışmada Kurt ve Kangal ırkı köpeklerde % 2.98 ve % 2.93 olarak saptanan ölü spermatozoon oranları birbirine çok yakın düzeydedir. Tekin ve ark.² ise aynı ırklarda anılan değerleri sırasıyla % 6.1 ve % 6.7 olarak bulduklarını bildirmektedirler. Yubi ve ark.'da²² çeşitli ırklar ile yaptıkları çalışmada % 9.33-9.50 ölü spermatozoon saptamışlardır. Bu oranlar sunulan

çalışmada saptanan oranlardan yüksektir. Keza Yurdaydın ve Kotzab'ın²¹ % 17.04 olarak saptadıklarını bildirdikleri ölü spermatozoon oranı ve Gökçen ve ark.nın¹ % 32.24 değerleri sunulan çalışmadaki değerlerden oldukça yüksektir. Sonuçlar arasındaki farklılıklar üzerinde çalışılan ırkların çeşitliliğinden kaynaklanmış olabileceği gibi, çiftleşme sezonu dışında yapılmış olmasından da ileri gelmiş olabilir.

Sunulan çalışmada akrozom defektli spermatozoon oranı Kurt köpekleri için % 2.29, Kangal ırkı köpekler için ise % 1.78 olarak saptandı. Aynı oranı Gökçen ve ark.¹ % 0.24, Kawakami ve ark.¹⁸ ise % 2.2 olarak bulduklarını bildirmektedirler. Bu sonuçların sunulan çalışmadaki sonuçlarla uyum içerisinde olduğu görülmektedir.

Kurt köpeklerinde saptanan 6.34 pH değerinin Kangallarda saptanan 6.05 pH değerinden yüksek olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar Kurt köpeklerinde 6.3²⁷ ve 6.4³⁵, Kangallarda 6.16¹ ile 6.1 ve 6.2² olarak bildirilen literatür değerleriyle benzerlik göstermektedir. Keza pH değerinin 6-7 arasında saptandığı çalışmalar da bulunmaktadır^{3,6,32}.

Yapılan viabilite muayenesinde gerek Kurt gerekse Kangal ırkı köpeklerde T-YS sulandırıcısı ile sulandırılmış spermaların, SDHP-YS sulandırıcısı ile sulandırılmış spermalardan daha uzun süre canlı kaldıkları görüldü (Tablo: II). T-YS sulandırıcısında hem yaşam sürelerinin hem de motilitenin her iki ırkta da SDHP-YS sulandırıcısından daha yüksek bulunduğu, ayrıca hem T-YS hem de SDHP-YS sulandırıcılarının canlı kalma sürelerinin Kangallarda, Kurt köpeklerinden daha uzun olduğu gözlemlendi. Bu sonucun ırklara bağlı olduğu düşünülebilir. Sulandırıcıları oluşturan maddelerin çeşitliliği ve sulandırma işleminin yapılması sırasındaki uygulamalar da sulandırılmış spermaların yaşam süresini ve bu süre içerisindeki motilitesini doğrudan etkileyen faktörlerin başında gelmektedir. Çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan araştırmalarda sulandırma işleminde genelde Tris+Yumurta Sarısı^{11,16,27}, Yumurta Sarısı+Sitrat^{10,23,30}, Tris + Yumurta Sarısı + Sitrat^{8-12,15,17,18,21} kullanılmıştır. Yapılan araştırmalarda sulandırılmış spermaların +4°C'ta birkaç gün canlı olarak saklanabileceği saptanmıştır. Çeşitli sulandırıcıları farklı sürelerde kullandıklarını bildiren araştırmacılar değişik motilite sonuçları elde ettiklerini açıklamaktadırlar. Bu konuda yaptıkları çalışmalarda anılan ısı derecesinde Brochart ve Coulomb²³ dört gün sonra % 50, Harrop²⁴ 4-6 gün sonra % 60, Bahlau²⁵ sekiz gün sonra % 44.5 motilite bulduklarını bildirmektedirler. Spermayı saklama süresi incelendiğinde yaşam süresi uzadıkça motilite oranının azaldığı görülmektedir. Açıklanan bu değerler hem sulandırıcıyı oluşturan maddelerin, dolayısıyla sulandırıcının, hem de saklama süresinin önemli olduğunu vurgulamaktadır. Sunulan çalışmada gerek T-YS gerekse SDHP-YS sulandırıcıları ile bulunan değerler, açıklanan bu motilite değerlerinin altında kalmaktadır. Çalışmada elde edilen değerler Morton ve Bruce'un³⁶ sıfırıncı saatte % 98 ve 96. saatte % 80 olarak saptadığı motilite değerlerin oldukça

altında yer almaktadır. Sunulan çalışmadaki yaşam süresinin bu çalışmayla benzerlik taşımaya rağmen motilitenin çok az olduğu gözlenmektedir. Sainz ve ark.nın³⁷ ise birinci saatte % 79.33 ve 24. saatte % 36.6 olarak bildirdikleri motilite oranları, sunulan çalışmadaki oranlardan daha düşük bir değere sahiptir. Spermayı soğutma işleminde önem taşıyan bir diğer konu da sulandırılmış spermanın saklanma ısısı ve ısının sabitliği ile sulandırılmış spermaya uygulanan soğutma aşamalarıdır. Araştırmacıların çoğu spermayı +4°C'ta sakladıklarını bildirmektedirler^{10,11,23-25,36,37}. Spermatozoonların hem sulandırıcılara hem de soğutma işlemine alışması ve uyum göstermesi açısından -1.0°C/dk'nın en iyi sonucu verdiği bildirilmektedir¹⁰. Sözü geçen çalışmada -1.0°C/dk soğutma hızıyla 120. saatte % 5 motilite saptandığı bildirilmekte olup, bu sonuç sunulan çalışmada elde edilen motilite ve yaşam süresine uyum göstermektedir. Bu ısıdan daha yavaş yapılan soğutma işlemlerinin fazla zaman kaybıyla birlikte enerji kaybına neden olabileceği, dolayısıyla motilite ve yaşam süresini etkileyebileceği düşünülebilir.

Sonuç olarak, günümüzde teknolojik gelişmelerin ışığında gerek doğal, gerekse sun'i tohumlamada kullanılacak köpeklerin önce spermatolojik muayeneye tabi tutularak bireysel özelliklerin belirlenmesi ve gerekli önlemlerin alınması bir zorunluluk olarak ortaya çıkmaktadır. Ayrıca köpeklerde sun'i tohumlama çalışmalarının ilerleme göstermesi ve gelişmesi bakımından, spermanın çeşitli sulandırıcılar ile sulandırılarak viabilite ve motilite muayenelerinin yapılması, doğru sulandırıcı seçimi ve sulandırılmış spermanın spermatolojik özelliklerini koruyup korumadığını saptamak açısından önem taşımaktadır. Buna bağlı olarak, daha ileri bir aşama olan spermanın dondurulması açısından da sulandırma ve sulandırılmış spermanın muayenesi, sun'i tohumlama çalışmalarının en önemli aşaması ve işlemlerinden biri olarak görülmektedir.

Sunulan araştırma ile köpekler üzerinde yapılan sperma muayenesi ve spermanın çeşitli sulandırıcılarla sulandırılarak yaşam süresinin uzatılması çalışmalarına bilimsel açıdan katkıda bulunulmaya çalışılmıştır. Araştırma sırasında yapılan tüm işlemlerin duyarlılıkla yerine getirilerek uygulamalara özen gösterilmesinin, bu alanda yapılacak çalışmalara yarar sağlayacağı ve köpeklerde yapılacak sun'i tohumlama çalışmalarının başarısını artıracağı kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. GÖKÇEN, H., SOYLU, M.K., TÜMEN, H.: Erkek köpeklerin kimi spermatolojik özellikleri üzerinde araştırmalar, U. Ü. Vet. Fak. Derg., 10 (1-2-3), 67-73 (1991).
2. TEKİN, N., İZGÜR, H., ÖZYURT, M.: Köpeklerde penis masajı yöntemiyle sperma alma ve başlıca spermatolojik özellikler üzerinde araştırmalar. Selçuk Üniversitesi Vet. Fak. Derg., 3 (1), 83-95 (1987).

3. SETTERGEN, I.: Examination of the canine genital system, *Vet. Clin. North. Am.*, 1 (I), 103-117 (1971).
4. ARTHUR, C.H., NOAKES, D.E., PEARSON, H.: *Veterinary Reproduction and Obstetrics (Theriogenology)*, Sixth Edition, Bailliere Tindall, London, 509-580 (1989).
5. YURDAYDIN, N.: Köpeklerde sun'i tohumlama, *A. Ü. Vet. Fak. Derg.*, 34 (3), 486-493 (1987).
6. TEKİN, N.: Erkek Üreme Organlarının Muayenesi, *Theriogenoloji*, Ed. E. ALAÇAM, Nurol Matbaacılık A.Ş., Ankara, 59-60 (1990).
7. YURDAYDIN, N.: Spermanın alınması, saklanması ve sun'i tohumlama, *Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon Sun'i Tohumlama Obstetrik ve İnfertilite*, Ed. E. ALAÇAM, Dizgievi, Konya, 82-89 (1994).
8. LINDE-FORSBERG, C.: Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen, *Vet. Clin.North Am.Small Anim.Prac.*, 21 (3), 407-485 (1991).
9. ENGLAND, G.C.W., ALLEN, W.E.: Factors affecting the viability of canine spermatozoa II. effects of seminal plasma and blood, *Theriogenology*, 37 (2), 373-381 (1992).
10. BOUCHARD, G.F., MORRIS, J.K., SIKES, J.D., YOUNGQUIST, R.S.: Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility, *Theriogenology*, 34 (1), 147-157 (1990).
11. GÜNZEL-APEL, A.R., EKROD, B.: Einflüsse 'von Prostatasekret und Verdünner auf die Spermienmotilität und ATP-Konzentration sowie die Aktivitat der sauren und alkalischen Phosphatase von Beagle-Samen, *Reprod. Dom. Anim.*, 26, 31-41 (1991).
12. ENGLAND, G. C. W.: Relationship between ultrasonographic appearance, testicular size, spermatozoal output and testicular lesions in the dog. *Journal of Small Animal Practice*, 32, 306-311 (1991).
13. BJURSTRÖM, L., LINDE-FORSBERG, C.: Long-term study of aerobic bacteria of the genital tract in stud dogs, *Am.J.Vet.Res.*, 53 (5), 670-673 (1992).
14. ELLINGTON, J., SCARLETT, J., MEYERS - WALLEN, V., MOHAMMED, H.O., SURMAN, V.: Computer-assisted sperm analysis of canine spermatozoa motility measurements, *Theriogenology*, 40, 725- 733 (1993).
15. ENGLAND, G.C.W., ALLEN, W,E.: Evaluation of cellulose acetate/nitrate filters for measuring the motility of dog spermatozoa, *J. Reprod. Fert.*, 88, 369-374 (1990).
16. THERET, M., TREIZE, G., DUMON, C.: Artificial insemination of the bitch, using the osiris gun, *Modern Vet.Prac.*, April, 229-230 (1987).

17. TSUTSUI, T., TEZUKA, T., SHIMIZU, T., MURAO, I., KAWAKAMI, E., OGASA, A.: Artificial insemination with fresh semen in Beagle bitches, *Jpn. J. Vet. Sci.*, 50 (1), 193-198 (1988).
18. KAWAKAMI, E., TSUTSUI, T., OGASA, A.: Two cases of acrosome and folded abnormality in dog spermatozoa, *Jpn. J. Vet. Sci.*, 50 (6), 1274-1276 (1988).
19. LARSEN, R.E.: Infertility in the male dog, (In) *Current Therapy in Theriogenology*, Ed. D. A. MORROW, W. B. Saunders Company, London, 646-660 (1980).
20. LINDE-FORSBERG, C., FORSBERG, M.: Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen, *J.Reprod.Fert.*, 39, 299-310 (1989).
21. YURDAYDIN, N., KOTZAB, E.: Köpek spermasının dondurulması üzerinde araştırmalar. *A.Ü.Vet.Fak.Derg.*, 34 (3), 534-540 (1987).
22. YUBI, A.C.; FERGUSON, J.M., RENTON, J.P., HARKER, S., HARVEY, M.J.A., BAGYENJI, B., DOUGLAS, T.A.: Some observations on the dilution, cooling and freezing of canine semen, *Journal of Small Animal Practice*, 28, 753-761 (1987).
23. BROCHART, M., COULOMB, J.: Recherches sur la dilution et la conservation du sperma de chien, *Bull. Acad. Vet. Fr.*, 25: 59-62, (Alınmıştır) N. YURDAYDIN, E. KOTZAB, Köpek spermasının dondurulması üzerinde araştırmalar, *A. Ü. Vet. Fak. Derg.*, 34 (3), 534-540 (1987).
24. HARROP, A.E.: Artificial insemination of a bitch with preserved semen, *Brit.Vet. J.*, 110: 424-425, (Alınmıştır) N. YURDAYDIN, E. KOTZAB, Köpek spermasının dondurulması üzerinde araştırmalar, *A. Ü. Vet. Fak. Derg.*, 34 (3) 534-540 (1987).
25. BAHLAU, E.: Untersuchungen über die Konservierung von Hundesperma. München, Univ. Veterinarmed. Fak., Dissertation, (Alınmıştır) N. YURDAYDIN, E. KOTZAB, Köpek spermasının dondurulması üzerinde araştırmalar., *A. Ü. Vet. Fak. Derg.*, 34 (3), 534-540 (1987).
26. PAUFLER, S.K.: Künstliche besamung und eitransplantation bei tier und mensch Verlag M.H.Schaper, Hannover, (1974).
27. ROTA, A., STRÖM, B., LINDE-FORSBERG, C.: Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C, *Theriogenology*, 44 (6), 885-900 (1995).
28. PLUMMER, J.M., WATSON, P.F., ALLEN, W.E.: A spermatozoal midpiece abnormality associated with infertility in a Llasa apso dog, *Journal of Small Animal Practice*, 28, 743-751 (1987).

29. WRIGHT; P.J., PARRY, B.W.: Cytology of the canine reproductive system, *Vet. Clin. North Am., Small Anim.Pract.*, 19 (5), 851-874 (1989).
30. HOPKINS, S.M., EVANS, L.E.: Artificial Insemination, *Veterinary Endocrinology and Reproduction*, Fourth Edition, L.E. McDONALD, Lea and Febiger, London, 355-380 (1989).
31. CHVAPIL, M., CHVAPIL, T.A., OWEN, J.A., BENSON, D.J.: Occlusion of the vas deferens in dogs with a biocompatible hydrogel solution, *Journal of Reproductive Medicine*, 35 (9), 905-910 (1990).
32. DAURIO, C.P., GILMAN, M.R., PULLIAM, J.D., SEWARD, R.L.: Reproductive evaluation of male Beagles and the safety of ivermectin, *Am. J. Vet. Res.*, 48 (12), 1755-1760 (1987).
33. GADELLA, B.M., COLENBRANDER, B., LOPES-CORDOZO, M.: Arysulphatases are present in seminal plasma of several domestic mammals, *Biol. Reprod.*, 45, 381-386 (1991).
34. BARSANTI, J.A., CAUDLE; A.B., CROWEL, W.A., SHOTTS, E.B., BROWN, J.: Effect of induced prostatic infection on semen quality in the dog, *Am.J.Vet.Res.*, 47 (4), 709-712 (1986).
35. PINEDA, M.H.: Male Reproduction, *Veterinary Endocrinology and Reproduction*, Fourth Edition, Ed. L.E. McDONALD, Lea and Febiger, London, 278-301 (1989).
36. BORTON, D.B., BRUCE, S.G.: Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs, *J. Reprod. Fert. (Suppl.)*, 39:311,1989 (In) C.LINDE-FORSBERG, Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen., *Vet. Clin. North Am. Small Anim.Prac.*, 21 (3), 407-485 (1991).
37. SAINZ, J.J., JOSA, A., ESPINOSA, E., NINO-JESUS, A., GIL, L., MUNOZ, I., EXTEGARAY, A.: Refrigeration of dog semen, temperature, survival time and activation, 5th Int. Symp. Anim. Reprod., 30 September - 20 October, Vol. II, 481-487 (1993).