

DİŞİ KÖPEKLERDE TAZE VE DONMUŞ SPERMAYLA İNTRAVAGİNAL YOLLA YAPILAN SUN'İ TOHURLAMA UYGULAMALARINDA ELDE EDİLEN FERTİLİTE ORANLARI

Alper BARAN* Kemal AK* İ. Kamuran İLERİ*

Fertility rates of intravaginal artificial inseminations with fresh and frozen semen in the bitch

Summary: A total of 32 bitches were used in this study, out of these 16 bitches were inseminated with fresh semen and the other with semen frozen by paillette technique in 4% glycerol containing Tris-fructose-citric acid extender by intravaginal route. The optimal insemination time was determined by Ovulation Test Kit and inseminations were repeated in both groups every other day for 3 times considering the semi-quantitative progesterone value (1-8 ng/ml). Pregnancy rate was 81.25% for the fresh semen group and 37.50% for the frozen semen group. Pregnancy rates in the fresh semen group have been significantly higher than the frozen semen group ($p<0.01$). Mean litter sizes per birth in the fresh and frozen semen groups have been 4.69 and 3.33, respectively.

At the end of the study, it is concluded that intravaginal artificial insemination with fresh semen has the advantages not to need anesthesia or chiralurgical applications and can be accomplished by every pet veterinarian practically, on the other hand no satisfying pregnancy rate could be achieved with frozen semen.

Key Words: Bitch, intravaginal insemination, fresh semen, frozen semen, fertility.

Özet: Çalışmada kullanılan 32 adet dişi köpekten 16'sı taze sperma, kalan 16'sı ise %4 gliserollü Tris-früktöz-sitrik asit sulandırıcısında payet yöntemine göre dondurulmuş sperma ile intravaginal yolla tohumlandı. Optimal tohumlama zamanının tespitinde "Ovulasyon Test Kiti" kullanıldı ve yarı kantitatif saptanan progesteron değerine bakılarak (1-8 ng/ml) taze ve donmuş sperma ile dişiler gün aşırı 3 kez tohumlandı. Gebelik oranı taze sperma ile %81.25, dondurulmuş sperma ile %37.50 olarak saptandı ve aralarındaki fark önemli bulundu ($p<0.01$). Taze ve dondurulmuş sperma ile doğum başına düşen ortalama yavru sayısı 4.69 ve 3.33 olarak saptandı.

Sonuç olarak, dişi köpeklerde taze sperma ile intravaginal sun'î tohumlama tekniğinin, cerrahi bir uygulama veya anestezieye ihtiyaç göstermemesi gibi avantajları nedeniyle tüm veteriner hekimler tarafından uygulamada kullanılabileceği ancak, donmuş sperma ile bu yolla düşük gebelik oranları elde edileceği düşünülmelidir.

Anahtar Kelimeler: Dişi Köpek, İnvavaginal Tohumlama, Taze Sperma, Donmuş Sperma, Fertilitite.

* İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Döleme ve Sun'î Tohumlama Anabilim Dalı, 34851, Avcılar/İstanbul

Giriş

Saf ırk köpek yetiştiriciliğinde ve nesli tükenen bazı köpek ırklarının devamlılığının sağlanması amacıyla, biyoteknolojik bir yöntem olan sun'i tohumlama uygulaması çok büyük bir önem taşımaktadır. Ayrıca çeşitli fiziki ve biyolojik nedenlerle doğal olarak çiftleşemeyen köpeklerde kullanılmasının yanında, çiftleşme yolu ile bulaşan hastalıkların yayılmasını da önleyen etkin bir yöntemdir (2, 13, 18, 21). Köpeklerle ilgili sun'i tohumlama çalışmaları özellikle son 10 yılda yapılan yoğun bilimsel çalışmalarla uygulama alanına sokulmuştur (16, 18).

Dondurulmuş köpek sperması ile ilk başarılı gebelik 1969 yılında, S.W.J Seager tarafından elde edilmiş olup (1, 11, 18), halen elde edilen düşük fertilitite oranlarının artırılması yönünde yoğun bilimsel çalışmalar sürmektedir (11).

Köpek spermasının payet yöntemine göre %8 gliserollü Tris sulandırıcısı ile dondurulması tekniği pek çok araştırmacı tarafından bildirilmektedir (1, 4, 6, 9, 14, 19). Theret ve ark. (19), %4 gliserollü Tris sulandırıcısında dondurduğu sperma numuneleri ile özel bir foley kateter vasıtasıyla intravaginal tohumladığı 5 adet dişi köpeğin 4'ünde, taze sperma ile 6 dişiden 5'inde gebelik elde etmiştir. Bu çalışmada araştırmacılar, bir tohumlama dozunda verilen spermatozoon yoğunluğunun (ortalama 150×10^6) önemli olduğunu, özel kateter sayesinde intrauterin tohumlama yapılmasına gerek kalmadığını bildirmişlerdir. Aynı kateter ve tekniği kullanan Silva ve Verstegen (17) ise, %60 gebelik elde etmişlerdir. Kabasakal (7), taze ve dondurulmuş sperma ile intravaginal tohumlama yaptığı dişilerden elde ettiği gebelik oranlarını sırasıyla %81 ve %41 olarak saptamıştır. Olar (14), donmuş spermaya göre taze spermada elde edilen yüksek fertilitite oranlarının tohumlama dozundaki yüksek spermatozoon sayısına ve spermanın bırakıldığı yere bağlı olduğunu bildirmiştir. Araştırmacı %3 gliserollü Tris sulandırıcısı ile 0.5 ml'lik payetlerde dondurulan spermayla 12 dişi köpeği intravaginal tohumlamış ve %25 gebelik oranı elde etmiştir. Taze sperma ile 12 dişide yaptığı intravaginal tohumlamalarda ise %50 gebelik oranı bulmuştur.

Aynı paralelde yapılan çalışmalarda Linde-Forsberg ve Forsberg (9), taze sperma ile %65.7, donmuş sperma ile ise %41.5 gebelik oranı, Farstad (4), taze sperma ile intravaginal olarak tohumladığı dişi köpeklerden %25, donmuş sperma ile intrauterin tohumlamadan ise %67 gebelik elde etmişlerdir. Bir tohumlama dozundaki hücre sayısının önemine değinen Mickelsen ve ark. (12), yoğunluğu 250×10^6 'dan fazla sperma ile yapılan sun'i tohumlama sonrası %81.5 gebelik oranı elde etmişlerdir.

Gill ve ark. (6), %8 gliserollü Tris-sitrik asit-früktöz sulandırıcısında dondurdukları spermada eritme sonrası %40-50 motilite elde etmelerine rağmen, yaptıkları tohumlamalardan hiç gebelik sağlayamazlarken, taze sperma ile tohumladıkları köpeklerde %70 gebelik oranı bulmuşlardır. Aynı sulandırıcı ve dondurma tekniğini kullanan Andersen (1), intrauterin tohumlama tekniği uyguladığı 11 dişiden 10'unda gebelik elde etmiştir. Köpek spermasını laktoz-yumurta sarısı sulandırıcısında pellet yöntemine göre donduran ve intrauterin uygulayan Seager ve ark. (16), dondurulmuş ve taze sperma ile sırasıyla %65.8 ve %64.5 gebelik elde etmişlerdir.

Dişi köpeklerde serviksin anatomik özelliklerinden dolayı kateterizasyonun oldukça güç olduğu ve uzman operatörlerin dahi %20 oranında serviksi geçebildikleri bildirilmektedir (2).

Sunulan çalışmada, pratikte serviksin her zaman geçilemeyeceği düşünülerek, intravaginal yolla taze veya donmuş sperma ile tekrarlı tohumlamalarda fertilite oranları araştırılmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışmada, Gemlik Askeri Veteriner Okulu ve Eğt. Mrkz. Komutanlığı, Köpek Eğitim ve Üretim Taburunda barındırılan, yaşları 3-5 arasında değişen, reproduktif açıdan sağlıklı, aynı bakım ve beslenme şartlarında barındırılan 32 adet dişi köpek kullanıldı.

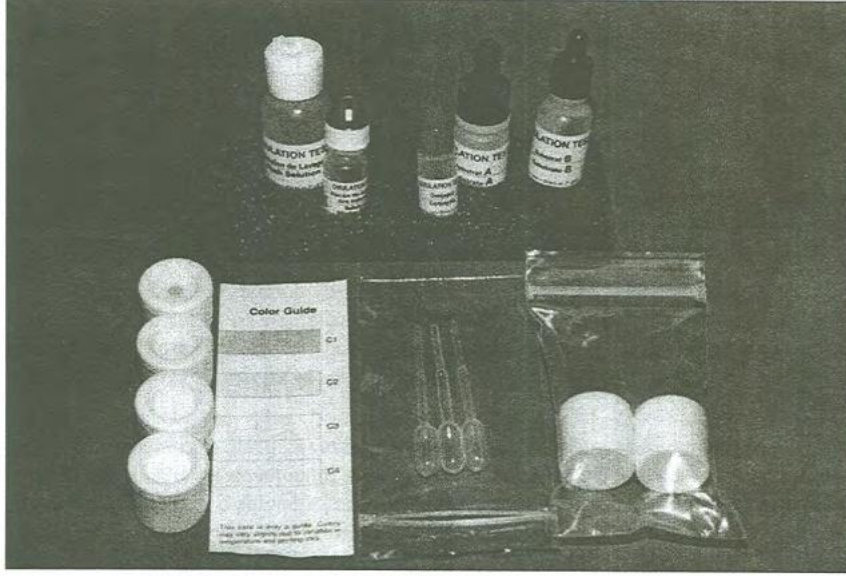
Bunlardan 16 adeti taze sperma ile, geri kalanı ise donmuş sperma ile tohumlandı. Çalışma iki aşamada gerçekleştirildi. Birinci aşamada dişi köpekler taze sperma ile intravaginal tohumlandı. İkinci aşamada ise tekniğine uygun olarak Tris-früktoz-sitrik asit sulandırıcısı ile 0.25 ml'lik payetlerde dondurulup en az bir ay saklanan sperma tohumlamada kullanıldı.

Çalışmanın ilk aşamasında daha önce spermatolojik özellikleri incelenen (\geq %80 motilite ve \geq %80 normal morfolojik özelliğe sahip) ve tohumlamada kullanılacak dişilerle aynı ırktan, yaşları 2-3 arasında değişen erkek köpekler kullanıldı. Spermanın alınmasında el masajı tekniği uygulandı (1, 5, 7, 10, 13, 20, 21) (Resim 1). Spermatozoondan zengin ikinci fraksiyon, steril ve ısıtılmış toplama kadehine aktarıldı. Alınan sperma ile 2-4 yaşlı, 12 adet Alman Çoban, 3 adet Labrador Retriever, 1 adet Pointer olmak üzere toplam 16 adet dişi köpek tohumlandı.



Resim 1. Erkek Köpekten Spermanın El Masajı ile Alınması.
Figure 1. Collecting Semen With Digital Manipulation from Male Dog.

Dişi köpekte kızgınlık zamanının saptanmasında Ovulasyon Test Kit® (Bio Veto Test, France) kitlerinden yararlanıldı (Resim 2).



Resim 2. Ovulasyon Test Kiti ve Renk Skalası.
Figure 2. Ovulation Test Kit and Color Scale.

Ovulasyon Test Kitlerinin Kullanılması:

EIA (Enzymimmunoassay) tekniğine göre çalışan Ovulasyon Test Kit'leri ile, dişiden alınan kan numunesinin serumunda (proöstrus kanamasının 9. gününde) progesteronun yarı kantitatif tayini yapılarak çiftleşme zamanı gün olarak saptandı. Testi kullanmadan önce test solüsyonları ve kan serum örnekleri 2 saat süre ile oda sıcaklığında bekletildi. Tekniğine uygun olarak test gerçekleştirildi ve elde edilen sonuçlar sırasıyla şu renk skalasına göre değerlendirildi. C1: Parlak Mavi=0-1 ng/ml, C2: Açık Mavi=1-2.5 ng/ml (LH pik), C3: Donuk Mavi=2.5-8 ng/ml, C4: Beyaz=>8 ng/ml Çalışmada optimal tohumlama zamanı olarak testin C2 ve C3 dönemleri esas alındı.

Spermanın Sulandırılması ve Dondurulması:

İkinci aşamada spermatolojik özellikler saptandı ve sperma gliserol içermeyen Tris-Sitrik asit-Fruktoz sulandırıcısı ile ben-marey'de oda ısısında (26°C) sulandırıldı.

Tris Sulandırıcısı

Tris (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	3.02 gr
(Hydroxymethyl-aminomethane)	
D (-) Früktoz (C ₆ H ₂ O ₆)	1.25 gr
Sitrik asit	1.78 gr
Kristal Penisilin	1000 IU/ml
Streptomisin	1000 µg/ml
Yumurta sarısı	20 ml
Bidistile su	q.s.p. 100 ml

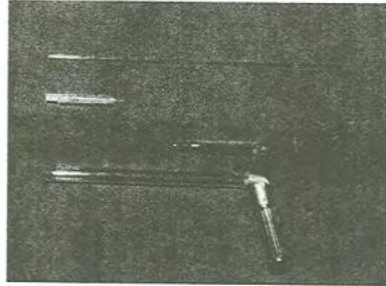
Sulandırılan sperma +5°C'a soğutuldu ve gliserolizasyon işlemine geçildi. Final gliserol oranı %4 olacak şekilde eşit hacimde sulandırıldı. Bu işlemden sonra, sperma numuneleri 0.25 ml'lik payetlere çekildi (bir payette ortalama 25-30x10⁶ spermatozoon) ve ekilibrasyona bırakıldı.

Ekilibrasyonu takiben payet içindeki sperma -110°C'deki sıvı azot buharında 7 dakika süreyle donduruldu ve her bir köpek için ayrı numaralanmış kanisterlere aktararak -196°C'de depolandı.

Tohumlama sırasında, her bir dişi köpeğin tohumlanması için 6 adet payet 37°C'de 30 sn su banyosunda eritildi ve aynı ısıdaki bir cam tüpe payetlerdeki sperma numunesi aktarıldı. Dişi köpeklerin hepsine gün aşırı 3 kez donmuş sperma ile intravaginal sun'î tohumlama uygulaması yapıldı. Donmuş sperma ile 12 adet Alman Çoban, 2 adet Labrador Retriever, 1 adet Pointer, 1 adet de İrlanda Setter olmak üzere 16 adet dişi köpek tohumlandı.

Sun'î Tohumlama Uygulaması:

İntravaginal yolla sun'î tohumlama uygulamasında, ucuna 5 ml'lik enjektör adapte edilmiş plastik steril tohumlama kateterinden yararlanıldı. Tohumlama uygulaması sırasında dişi köpeğin arka kısmı 45° eğimli olacak şekilde yukarıya kaldırıldı. Işıklı vajinal spekülüm (Resim 3) antibiyotikli bir pomatla kayganlaştırıldı ve vajina içerisine serviks'in önüne kadar sokuldu. Spermanın tamamının verilebilmesi için steril tohumlama kateteri içerisine 3 cm³ hava ve 1.5 ml. sperma çekildi. Kateterin uç kısmı spekülüm içinden caudo-cranial yönde ilerletildi ve serviks'in portio vaginalis kısmına sperma verildi (Resim 4).



Resim 3. Sığır Pistole Kılıfı, Plastik Enjektör, Işıklı Vajinal Spekülüm, Sperma Toplama Kadehi.
Figure 3. Bovine Pistole Sheath, Plastic Syringe, Vaginal Speculum With Light, Semen Collecting Tube.



Resim 4. Dişi Köpekte İnvaginal Sun'î Tohumlama.
Figure 4. Intravaginal Artificial Insemination in the Bitch.

4). Tohumlamayı takiben, spermanın geri akmasını önlemek için, dişi köpek belirtilen pozisyonda 10 dakika bekletildi ve bu sırada çiftleşme hissi alması için klitorise masaj uygulandı.

İstatistiksel Değerlendirme:

Elde edilen gebelik oranlarının istatistiksel analizleri *Student t-testi* kullanılarak değerlendirildi (3).

Bulgular

Çalışmada, sperması alınan erkek köpeklerden taze spermada ≥ 80 motilite ve ≥ 80 normal spermatozoa oranına sahip sperma örnekleri kullanıldı. Taze sperma ile uygulama yapılan östrusdaki 16 adet dişi köpeğin 13'ü gebe kaldı ve gebelik oranı %81.25 oldu. Ayrıca bu dişi köpeklere ait gebelik süresinin ortalaması 64.62 gün olarak saptandı. Doğum başına düşen erkek yavru sayısı 2.23, dişi yavru sayısı 2.46 ve toplam yavru sayısı 4.69 oldu (Tablo 1, 3).

Donmuş sperma kullanılan gruptaki erkek köpeklerin eritme sonrası spermatolojik özellikleri ≥ 60 motil ve ≥ 60 normal spermatozoa oranına sahip sperması kullanıldı. Donmuş sperma ile sun'î tohumlama uygulaması yapılan 16 adet dişi köpekten 6'sı gebe kaldı ve gebelik oranı %37.50 olarak saptandı.

Tablo 1. Irklara Göre Taze Sperma İle Tohumlama Sonrası Elde Edilen Veriler (n=16).
Table 1. Data Obtained from Inseminations With Fresh Semen Relating to the Breeds.

Dişi Köpek No (Bitch Number)	İrk (Breed)	Gebelik Süresi (Gün) Pregnancy Period (Day)	Erkek Yavru Sayısı (Male Puppy Numbers)	Dişi Yavru Sayısı (Female Puppy Numbers)	Toplam Yavru Sayısı (Total Puppy Numbers)
1	AÇD	63	4	3	7
2	AÇD	59	0	2	2
3	AÇD	69	2	5	7
4	AÇD	66	1	0	1
5	AÇD	65	2	0	2
6	AÇD	67	4	4	8
7	AÇD	68	0	1	1
8	AÇD	62	4	2	6
9	AÇD	70	0	1	1
10	AÇD	*	-	-	-
11	AÇD	*	-	-	-
12	AÇD	*	-	-	-
13	LAD	60	4	2	6
14	LAD	65	4	6	10
15	LAD	65	3	6	9
16	POD	61	1	0	1
Ortalama (Average)	n=16	64.62	(29) 2.23	(32) 2.46	(61) 4.69

AÇD: Alman Çoban Dişi (German Shepherd Bitch)

LAD: Labrador Dişi (Labrador Retriever Bitch)

POD: Pointer Dişi (German Pointer Bitch)

* Gebe değil (not conceived)

Bu dişi köpeklere ait ortalama gebelik süresi 62.6 gün olarak saptandı. Doğum başına düşen erkek yavru sayısı 2.00, dişi yavru sayısı 1.33 ve toplam yavru sayısı 3.33 oldu (Tablo 2, 3).

Taze ve donmuş sperma ile sun'î tohumlama sonrası elde edilen gebelik oranları sırasıyla; %81.25 ve %37.50 olarak saptandı ve aralarındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulundu ($p<0.01$) (Tablo 3).

Tartışma ve Sonuç

Dişi köpeklerde vajinanın uzun olması, dorso-median post-cervical kanalın serviks'te daralması, para-cervical bölgede daralma ve serviks'in ventral açılı olması gibi anatomik nedenlerle serviks'in kataterizasyonu güçtür ve uzmanların dahi %20 doğrulukla bu işlemi başarabileceği bildirilmiştir (2). Çalışmada taze ve donmuş spermayla uygulaması çok kolay olan invaginal tohumlama yönteminin kullanılabilirliği araştırılmıştır.

Tablo 2. Irklara Göre Donmuş Sperma İle Tohumlama Sonrası Elde Edilen Veriler (n=16).
Table 2. Data Obtained from Inseminations With Frozen Semen Relating to the Breeds.

Dişi Köpek No (Bitch Number)	İrk (Breed)	Gebelik Süresi (Gün) (Pregnancy Period (Day))	Erkek Yavru Sayısı (Male Puppy Numbers)	Dişi Yavru Sayısı (Female Puppy Numbers)	Toplam Yavru Sayısı (Total Puppy Numbers)
1	AÇD	*	-	-	-
2	AÇD	*	-	-	-
3	AÇD	*	-	-	-
4	AÇD	*	-	-	-
5	AÇD	*	-	-	-
6	AÇD	*	-	-	-
7	AÇD	61	4	0	4
8	AÇD	60	3	2	5
9	AÇD	66	1	1	2
10	AÇD	*	-	-	-
11	AÇD	64	2	2	4
12	AÇD	63	1	2	3
13	LAD	*	-	-	-
14	LAD	*	-	-	-
15	POD	62	1	1	2
16	SED	*	-	-	-
Ortalama (Average)	n=16	62.67	(12) 2.00	(8) 1.33	(20) 3.33

AÇD: Alman Çoban Dişi (German Shepherd Bitch)

LAD: Labrador Dişi (Labrador Retriever Bitch)

POD: Pointer Dişi (German Pointer Bitch)

SED: Setter Dişi (Irish Setter Bitch)

* Gebe değil (not conceived)

Tablo 3. Taze ve Donmuş Sperma İle Sun'ı Tohumlama Sonrası Elde Edilen Gebelik Oranları.
Table 3. Pregnancy Rates from Inseminations With Fresh and Frozen Semen.

Gruplar (Groups)	Gebelik Oranı (Pregnancy Rate)
Taze Sperma ile (with fresh semen) (n=16)	81.25 ^a (13/16)
Donmuş Sperma ile (with frozen semen) (n=16)	37.50 ^b (06/16)

^{a,b}: Dikey kolonlarda farklı harf taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir (p<0.01).

^{a,b}: Longitudinal columns different letter have significant differences between them (p<0.01).

Araştırmada taze sperma ile intravaginal tohumlamalarda %81.25 gebelik oranı bulunmuştur. Saptanan gebelik oranı çoğu araştırmacının intravaginal tohumlamalarda elde ettiği bulgulara benzer (7, 8, 20) veya yüksek (4, 6, 9, 14, 16) değerlerdir. Taze sperma ile intrauterin tohumlamalarda Mickelsen ve ark. (12) %81 ve Farstad (4) %82 gebelik saptamışlardır. Çalışmada taze spermada bulunan sonuçların başarılı olduğu söylenebilir.

Elde edilen yüksek gebelik oranları optimal tohumlama zamanının saptanmasında kullanılan tekniklerin başarısına bağlanabilir (5, 9, 21). Hızlı progesteron test kitleri ile yarı kantitatif olarak progesteronu ölçerek ovulasyon zamanı çok az yanılma ihtimali ile (%98) saptanabilmektedir (9).

Çalışmada taze ve donmuş sperma ile elde edilen ortalama yavru sayısı sırasıyla; 4.69 ve 3.33 olarak bulunmuş olup, bu tekniği kullanan çoğu araştırmacının saptadığı değerlerle benzerdir (6, 11, 15, 17). Linde-Forsberg ve ark. (11), taze ve dondurulmuş sperma ile tohumlama sonucu elde edilen yavru sayıları üzerine ırkların etkisinin olabildiğini bildirmiştir. Çalışmada farklı ırklardan dişi köpekler kullanıldığı için elde edilen yavru sayıları bu nedenle dikkate alınmamıştır.

Donmuş sperma ile intravaginal tohumlamalarda gebelik oranları %25 ile %42 arasında değişmektedir (7, 8, 14). Donmuş sperma ile intrauterin tohumlamalarda ise bu oran %42-%67 gibi daha yüksek değerlere ulaşmaktadır (4, 10). Dondurulmuş köpek spermasıyla yapılan tohumlamalar genellikle düşük gebelik oranlarıyla sonuçlanmaktadır (2, 5, 15). Taze spermada kullanılan tohumlama tekniğinin ve ovulasyon zamanını belirleme yönteminin başarılı olması, aynı yöntem ve tekniklerin donmuş spermada başarılı olamaması akla ilk olarak spermanın nicel ve nitel özelliklerini getirmektedir. Sperma hücrelerinin donma ve eritme prosedürlerinden zarar gördüğü bilinen bir gerçektir (5). Donmuş sperma ile tohumlama sonrası dişi genital kanala bırakılan fertil sperma hücrelerinin sayısı ve bu hücrelerin genital kanallarda transportunda, olgunlaşmasında ve ovulasyon zamanını belirlemede taze spermaya göre daha dayanıksız olabilecekleri ifade edilebilir. Tohumlama dozundaki spermatozoon sayısının artırılması ve tohumlama aralıklarının sıklaştırılması ile donmuş sperma ile daha yüksek gebelik oranlarının elde edilebileceği beklenebilir. Bu konuda çalışmaların yapılmasında yarar vardır.

Sonuç olarak tohumlama zamanının belirlenmesinde ovulasyon test kitinin başarıyla kullanılabilmesi, taze sperma ile intravaginal tohumlamaların önerilebilecek özellikte olduğu, donmuş sperma ile yapılan tohumlamalarda gebelik oranlarının düştüğü, bu düşüklüğün tohumlama dozundaki spermatozoon sayısının artırılmasıyla ve tohumlama aralıklarının sıklaştırılmasıyla giderilebileceği sonucuna varılmıştır.

Kaynaklar

1. Andersen, K. (1975): Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique. Zuchthyg., 10:1-4.
2. England, G.C.W. (1996): Radiographic contrast medium for uterine insemination in the bitch, and its effect upon the quality and fertility of fresh dog semen. Theriogenology, 46: 1233-1241.
3. Evrim, M., Güneş, H. (1994): Biyometri. Ders Notları, İ.Ü. Vet. Fak. Yay., Ders Notu: 41, İstanbul.
4. Farstad, W. (1984): Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with fresh or frozen semen. J. of Small Anim. Prac., 25: 561-565.
5. Farstad, W., Andersen Berg, K. (1989): Factors influencing the success rate of

- artificial insemination with frozen semen in the dog. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 39: 289-292.
6. Gill, H.P., Kaufman, C.F., Foote, R.H., Kirk, R.W. (1970): Artificial insemination of Beagle bitches with freshly collected, liquid-stored, and frozen-stored semen. *Am. J. Vet. Res.*, 31, (10), 1807-1813.
 7. Kabasakal, G. (1995): Değişik sulandırıcılar ile dondurulan köpek spermalarından elde edilen döl verimi üzerinde çalışmalar. Ankara Üniv. Sağlık Bil. Enst. (Doktora Tezi), Ankara.
 8. Keskin, O., Akçay, E., Kaya, M., Yurdaydın, N., Tekin, N., Gürcan, S. (1996): Değişik ırktan köpeklerde sun'i tohumlama çalışmaları. *Lalahan Hay. Arş. Ens. Derg.*, 36 (2), 95-102.
 9. Linde-Forsberg, C., Forsberg, M. (1989): Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 39: 299-310.
 10. Linde-Forsberg, C., Forsberg, M. (1993): Results of 527 controlled artificial inseminations in dogs. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 47, 313-323.
 11. Linde-Forsberg, C., Ström, H.B., Govette, G. (1999): Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. *Theriogenology*, 52, 11-23.
 12. Mickelsen, W.D., Memon, M.A., Anderson, P.B., Freeman, D.A. (1993): The relationship of semen quality to pregnancy rate and litter size following artificial insemination in the bitch. *Theriogenology*, 39, (2), 553-560.
 13. Morton, D.B., Bruce, S.G. (1989): Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to use of frozen semen in dogs. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 39: 311-316.
 14. Olar, T.T. (1985): Using frozen canine semen: a guide for practitioners. *Vet. Med.*, 80: 22-30.
 15. Platz, C.C., Seager, S.W.J. (1977): Successful pregnancies with concentrated frozen canine semen. *Lab. Anim. Sci.*, 27, (6), 1013-1016.
 16. Seager, S.W.J., Platz, C.C., Fletcher, W.S. (1975): Conception rates and related data using frozen dog semen. *J. Reprod. Fertil.*, 45: 189-192.
 17. Silva, L.D.M., Verstegen, J.P. (1995): Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*, 44: 571-579.
 18. Silva, L.D.M., Onclin, K., Lejeune, B., Verstegen, J.P. (1996): Comparisons of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. *Vet. Rec.*, 138, 154-157.
 19. Theret, M., Treize, G., Dumon, C. (1987): Artificial insemination of the bitch, using the osiris gun. *Mod. Vet. Pract.*, 229-230.
 20. Tsutsui, T., Tezuka, T., Shimizu, T., Murao, I., Kawakami, E., Ogasa, A. (1988): Artificial insemination with fresh semen in Beagle bitches. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 50, (1), 193-198.
 21. Yurdaydın, N. (1984): Köpeklerde sun'i sohumlama. *A.Ü. Vet. Fak. Derg.*, 34, (3), 486-493.