



Tavşanlarda Spermanın Alınması, İşlenmesi ve Saklanması

Ali Doğan ÖMÜR^{1a}, Serkan Ali AKARSU^{1b}✉

1. Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

ORCID: 0000-0002-2976-4368^{1a}, 0000-0003-4450-6540^{1b}

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
24.08.2022	13.09.2022	28.09.2022

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Ömür AD, Akarsu SA: Tavşanlarda Spermanın Alınması, İşlenmesi ve Saklanması. Lab Hayv Bil & Uyg Derg, 2(2): 105-110, 2022.

Öz: Tavşan gerek fiziksel özellikleri gerekse çalışma kolaylığı nedeniyle biyolojik araştırmaları için oldukça uygundur. Tavşanlardan ötenazi işlemine gerek kalmaksızın suni vajen yardımıyla sperma alınabilmesi sayesinde biyoteknolojik çalışmalar kolaylıkla yürütülmektedir. Tavşan spermasının işlenmesi ve saklanması; mevcut kirlilik, lipid peroksidasyona aşırı duyarlılık, dondurma çözündürme sonrası total ve progresif motilite değerlerinde düşüklük sebebiyle tecrübe gerektirmektedir. Benzer şekilde mevsim ve sperma alma sıklığı da sperma kalitesini etkilemektedir. Tavşanlarda suni vajen (SV) ve elektroejekülatör (EE) ile sperma alınması başlıca kullanılan yöntemlerdir. SV, anestezi gerektirmemesi ve elde edilen spermanın kalitesi bakımından EE'ye göre daha sık tercih edilmektedir. Tavşanlarda kullanılan en yaygın sperma sulandırıcısı TCG (313.8 mM Tris, 103.1 mM sitrik asit ve 33.3 mM glukoz) yumurta sarısı (%10-20) sulandırıcısıdır. Tavşan spermasının uzun süreli saklanmasında kullanılan kriyoprotektan maddeler spermanın kriyoprezervasyon başarısını etkileyebilmektedir. Bu amaçla, tavşanlarda sıklıkla dimetil sülfoksit (DMSO) ve amid türevleri kullanılmaktadır. Ayrıca tavşanlarda sperma hızlı ve yavaş yöntemler kullanılarak dondurulmaktadır. Bu alanda yapılan çalışmalar spermanın dondurulduktan sonra fertilizasyon yeteneğinin azaldığını göstermektedir. Bu yüzden tavşanlarda spermanın saklanması konusunda ileri düzey çalışmalar yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu derlemede tavşan spermasının kısa ve uzun süreli saklanmasındaki güncel gelişmeler hakkında bilgi vermesi amaçlanmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Biyoteknoloji, Kısa Süreli Saklama, Sperm Kriyoprezervasyonu, Tavşan.

Semen Collection, Processing and Storage in Rabbits

Abstract: The rabbit is quite suitable for biological research due to their physical properties and ease of working. Biotechnological studies are easily carried out thanks to the ability to collect semen from rabbits with the help of an artificial vagina without the need for euthanasia. The processing and storage of rabbit semen requires experience due to existing pollution, hypersensitivity to lipid peroxidation, and low total and progressive motility values after freezing and thawing. Similarly, the season and the frequency of semen collection also affect semen quality. The semen collection in rabbits with artificial vagina(AA) and electroejaculator(EE) are the main methods used. AV is preferred more often than EE in terms of not requiring anesthesia and the quality of the semen obtained. The most common semen extender used in rabbits is TCG (313.8 mM Tris, 103.1 mM citric acid, and 33.3 mM glucose) egg yolk (10-20%) extender. Cryoprotectant substances used in the long-term storage of rabbit semen affect the success of cryopreservation of semen. For this purpose, dimethyl sulfoxide (DMSO) and amide derivatives are frequently used in rabbits. Moreover, semen in rabbits is frozen using fast and slow methods. Studies show that the fertilization ability of semen decreases after freezing. Therefore, there is a need for advanced studies on the storage of semen in rabbits. In this review, it is aimed to give information about current developments in short and long-term storage of rabbit semen.

Keywords: Biotechnology, Rabbit, Semen Cryopreservation, Short-Term Storage.

✉Serkan Ali AKARSU

Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.
e-posta: serkanaliakarsu@gmail.com

GİRİŞ

Erkek tavşanlar, üreme alanında yapılan araştırmalarda fiziksel özellikleri ve çalışma kolaylığı açısından diğer laboratuvar hayvanlarına göre daha fazla tercih edilebilmektedir (Naughton ve ark., 2003). Yaş, besleme, sperma alınma sıklığı ve ışığa maruz kalma süresi gibi birtakım faktörler sperma kalitesini etkileyebilmektedir (Boiti ve ark., 2005). Erkek tavşanlar ad libitum olarak beslenmelidir (Luzı ve ark., 1996). İyi kalitede bir sperma elde edebilmek için diyetinde ortalama %15 oranında protein bulunması gereklidir (Nizza ve ark., 2000). Spermada yüksek miktarda çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) bulunduğundan ve bu yağ asitleri membran akışkanlığını ve yeterliliğini modifiye ettiğinden, hayvanlara dengeli bir beslenme programının uygulanması önemlidir (Boiti ve ark., 2005). Tavşanlarda kaliteli bir ejakulat elde edilebilmesi için haftada bir kez sperma alınmalıdır (Bencheikh, 1995). Sperma, tavşanlarda suni vajen (SV) (Nizza ve ark. 2003) ve elektroejakulatör (EE) (Orihuela ve Ungerfeld 2019) yardımıyla alınabilmektedir. Işığa maruz kalma süresi de spermanın kalitesini etkileyebilmektedir. Günde 16 saat ışık, 8 saat karanlık ortamda tutulan tavşanlarda spermanın kalitesinin arttığı ve bunda hipotalamo-hipofiz aksının etkisinin olduğu düşünülmektedir (Theau-Clément ve ark., 1994). Yapılan bir çalışma, dondurma öncesinde spermadan seminal plazmanın elimine edilmesi dondurma-çözdürmeden sonra sperma kalitesinde bir iyileşme olduğunu da bildirmektedir (Gogol, 1999).

Tavşanlardan Sperma Alma Yöntemleri

Tavşanlarda kullanılan başlıca yöntemler; suni vajen ve elektroejakulatör yardımıyla sperma alma yöntemleridir.

Tavşanlarda suni vajenle sperma alma yönteminde uzunluğu yaklaşık olarak 8-12 cm, çapı ise 4-6 cm olan sert kauçuk ya da ebonitten yapılmış silindirik şeklinde bir ana gövde mevcuttur. Bu ana gövdeye yerleştirilen bir iç lastik ile suni vajene

takılan dereceli bir sperma toplama tüpünden oluşur. Diğer türler için tasarlanan suni vajenlerde olduğu gibi tavşanlar için üretilenlerde de taşınması gereken üç temel özellik; sıcaklık, basınç ve kayganlıktır (Şekil 1).



Şekil 1. Tavşan için üretilmiş suni vajen (Naughton, 2003)

Figure 1. Artificial vagina made for rabbits (Naughton, 2003)

Sperma alınabilmesi için erkek tavşanların önceden suni vajene alıştırmış olmaları gerekir. Genellikle erkek tavşanlar suni vajene birkaç denemeden sonra alışırlar. Seçilen uysal bir dişi tavşan, erkek tavşanın bulunduğu bir kafese bırakılır. Erkek tavşan dişiyi aşınca, dişinin arka iki bacağı arasına, sağ elle tutulan suni vajen yerleştirilir ve penisin suni vajene girmesi sağlanır (Şekil 2) (Sevinç, 1973).



Şekil 2. Suni vajenin tavşanda kullanımı (Naughton, 2003).

Figure 2. Use of artificial vagina in rabbit (Naughton, 2003).

Elektroejakülatör (EE), rektuma yerleştirilen bir elektrotla genital organları uyaran sinirlerin elektriksel uygulama ile uyarılması sonucu ereksiyonun ve ejakülasyonun sağlanmasıdır. Bu yöntemde; ilk olarak karboksi metilden üretilmiş 15 cm uzunluğunda, 0.8 cm çapında rektal prop anüse yerleştirilir. Periyodik bir şekilde 3-5 sn aralıklarla kontrollü olarak 0-15 V arası akım artırılarak uygulanır (Orihuela ve Ungerfeld 2019).

Tavşanlarda Sperma Muayenesi ve Referans Değerler

Tohumlama amacıyla kullanılacak tavşan spermasının değerlendirilmesi; genellikle alınan spermanın hacmi ve yoğunluğu ile bir yönde ve güçlü hareket eden spermatozoonların oranına bakılarak yapılır. Bu bakımdan, normal ve normalin üstünde sperma yoğunluğu ve güçlü bir spermatozoon hareket oranı gösteren ejakülatlar kullanılır. Düşük nitelikteki spermaların tohumlamada kullanılması tercih edilmez (Sevinç, 1973).

Spermatozoon üretimi, farklı tavşan ırklarında değişkenlik gösterebilmektedir. Yetişkin bir tavşanda spermatozoon yoğunluğu ortalama 250×10^6 'dır (El-Habbato ve ark. 1984). Spermatozoon olgunlaşması esnasında kanal sistemi aracılığıyla taşınan ve içeriğinde bol miktarda testis sıvı içeren spermanın yaklaşık olarak %40 kadarı epididimisin caput bölümünden emilmektedir (Orgebin-Crist, 1968). Epididimal geçiş toplamda 8-9 gün sürmekte olup, bu sürenin 2 günü caputta, 2 günü corpusta ve geri kalanı da caudada geçmektedir (Alvarino, 2000). Ayrıca spermatozoonların fertilizasyondan önce en az 4-6 saat süreyle uterusu kapasitasyon sürecini geçirmeleri gerekmektedir. Olgun spermatozoonların uterusuaki yaşam süresi ve fertil ömrü 24-36 saat arasında değişmektedir (Tablo 1) (İleri ve ark., 2002).

Tablo 1. Orta büyüklükteki bir erkek tavşanda ortalama sperma verimi (İleri ve ark., 2002).

Table 1. Average semen yield in a medium-sized male rabbit (İleri ve ark., 2002).

Ejakülat Hacmi (ml)	0.32-6 (ort: 0.5-1)
Jel Miktarı (gr) / ejakülat	1.7
Spermatozoa Sayısı / ml	$10-1000 \times 10^6$ (ort: 700×10^6)
Spermatozoa Sayısı / ejakülat	$150-200 \times 10^6$
Spermatozoa Sayısı / testis	350×10^6
Spermatozoa Sayısı / gün	$88-170 \times 10^6$
Spermatozoa Üretimi / gr testis	24×10^6

Tavşan Spermasının Kısa Süreli Saklanması

Spermanın soğutulularak saklanması metabolizmayı azaltmakta ve uzun bir süre boyunca spermatozoon canlılığını korumaktadır. Bu süre boyunca spermatozoonlar, membranlarının yapısında bulunan fosfolipidlerdeki nispeten yüksek doymamış yağ asidi içerikleri nedeniyle, reaktif oksijen türlerine (ROS) ve serbest radikallere maruz kalmaktadırlar. Soğutulmuş spermanın başarısı kullanılan sperma sulandırıcısına, soğutma sıcaklığına ve spermatozoon yoğunluğuna bağlıdır (Kubovicova ve ark. 2022). Uluslararası Tavşan Reprodüksiyon Grubu'nun 2005 yılında yayımladıkları yönergelerine göre $15-18^\circ\text{C}$ 'nin, 48 saate kadar tavşan spermasını saklamak için en uygun sıcaklık aralığı olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde yapılan bir çalışmada, Tris bazlı sulandırıcılarda 15°C 'lik sıcaklıkta 48-72 saate kadar tavşan spermatozoonlarının fertilitite yeteneklerini korudukları belirtilmiştir (Roca ve ark., 2000).

Tavşan Spermasının Uzun Süreli Saklanması

Tavşanlar, artan dünya nüfusunun beslenmesinde rol üstlenen hayvan türlerinden biridir. Bu nedenle artan talebin karşılanabilmesi için tavşan üretimi giderek önem kazanmakta ve bu doğrultuda çoğu ülkede tavşan üremesinin etkili bir şekilde sağlanabilmesi için tabii aşımın yanı sıra taze, sulandırılmış veya dondurulmuş sperma ile suni tohumlama uygulamaları yapılmaktadır.

Spermanın uzun süreli saklanması, birtakım işlemler uygulanan spermayı dondurup depolayarak korunmasını sağlayan yöntemdir (Zaniboni ve ark.,

2014). Kullanılan sulandırıcı tipi, hazırlanması, dondurulması gibi işlemler spermanın saklanabilirliğinin başarısını etkileyebilmektedir (Kubovicova ve ark., 2022). Tavşanlarda spermanın dondurulması, çözündürme sonrası sperma kalitesini düşürmekte ve elde edilen gebelik oranlarında düşüşe yol açmaktadır (Mocé ve ark., 2015). Tavşanlarda sperma; yavaş dondurma (Mocé and Vicente 2009), vitrifikasyon (Rossato ve Laffaldano 2013) ve liyofilizasyon teknikleri (Liu ve ark., 2004) ile dondurulabilmektedir.

Tavşanlarda Spermanın Sulandırılması

Sulandırıcılar, tavşan spermatozoonları için gerekli olan besinleri içerdiği ve ortamın pH'sı ile ozmotik basıncını kontrol ettiği için uzun süreli saklamada önemli bir rol oynamaktadır (Di Iorio ve ark. 2014). Bu amaçla sperma sulandırıcılarına çeşitli maddeler ilave edilmektedir. Spermanın sulandırılmasında bakteriyel kontaminasyona karşı antibiyotik katılmaktadır (Sönmez, 2015). Penisilin G ve Streptomisin tavşanlarda sulandırıcıya eklenen antimikrobiyal ajanlardan başlıcalarıdır (Chen ve Foote, 1994). Bu maddelerin haricinde; çoğu türde olduğu gibi tavşanlarda da sulandırıcıya değişik oranlarda (%10-20) yumurta sarısı eklenmektedir (Fox, 1961). Yapılan bazı çalışmalarda yumurta sarısı yerine yağsız süt tozu veya ticari bir ürün olan Laciphos kullanılmış fakat yumurta sarısı daha başarılı olduğu belirtilmiştir (Rohlof ve Laiblin, 1976).

Tavşanlarda spermanın uzun süreli saklanmasında uygun bir sulandırıcı belirlemek için yapılmış birtakım araştırmalar mevcuttur (Roca ve ark., 2000; Carluccio ve ark., 2004; El-Kelawy ve ark., 2012). Tavşanlarda spermanın sulandırılmasında sıklıkla TCG (313.8 mM Tris, 103.1 mM sitrik asit ve 33.3 mM glukoz) kullanılmaktadır (Sevim ve Sariözkan, 2020). Yapılan bir çalışmada TCG, Lepus, Merk III ve Cortolap ile tavşan sperması sulandırılmış ve 72 saat sürenin sonunda en iyi sonucu Cortolap vermiştir (Di Iorio ve ark., 2014). Bir başka çalışmada ise Lepus, Verdunnungsmischung M III ve INRA 96 kullanılmış ve en iyi sonuç INRA 96'da elde edilmiştir (Carluccio ve ark., 2004).

Tavşan Spermasında Kullanılan Kriyoprotektan Maddeler

Tavşan spermasında kriyoprotektan ajan (CPA) olarak gliserol, DMSO ve amid türevleri kullanılabilir. Ancak yapılan bir çalışmada gliserolün başarısı daha düşük bulunmuştur (Mocé ve Vicente 2009). Diğer türlerin spermatozoon yapısından farklı olarak, tavşan spermatozoonu düşük bir su geçirgenlik katsayısı ve yüksek bir aktivasyon enerjisine sahiptir. Bu sebepten ötürü daha düşük moleküler ağırlıklı ve daha yüksek geçirgenliğe sahip DMSO veya amid gibi CPA'ları kullanma ihtiyacı ortaya çıkmıştır (Curry ve ark. 1995). Tavşanlarda yapılan bir çalışmada DMSO %12.4-17.5 arasında kullanılmıştır (Sawada ve Chang, 1964). Fakat sonrasında yapılan bir çalışmada ise yüksek doz DMSO'nun spermatozoon akrozomu üzerinde olumsuz etkisinin olduğu belirtilmiştir (Martin Bilbao, 1993). Yapılan bir başka araştırmada da in vivo doğurganlık oranını düşürdüğü bildirilmiştir (Helleman ve ark., 1979). Elde edilen tüm bu sonuçlara istinaden yapılan bir çalışmada DMSO'nun olumsuz etkisi disakkaritlerin ilavesiyle minimize edilmeye çalışılmıştır (Vicente ve Viudes de Castro, 1996).

Amidler, gliserolden daha düşük moleküler ağırlığa sahip olup spermatozoonlarda daha az ozmotik hasara neden olmaktadır (Hanada ve Nagase, 1980). Tavşanlarda yapılan bir çalışmada 1M dozda laktamid, asetamid ve DMSO'nun en iyi sonuç verdiği ortaya koyulmuştur (Kashiwazaki ve ark., 2006). Asetamid, tavşan spermasının dondurularak saklanması için tercih edilen CPA'lardandır (Moriya, 1996).

SONUÇ

Reprodüktif sahada yapılan deneysel çalışmalarda tavşanlar sıklıkla kullanılmaktadır. Tavşan spermasının işlenmesi ve saklanması konularında yapılan araştırmalar hala daha devam etmektedir. Bu işlemler sırasında hayvanın yaşı ve beslenmesi ile içerisinde bulunan mevsim sperma

kalitesini etkileyebilmektedir. Benzer şekilde spermanın işlenmesi sırasında sperma alma yöntemi, kullanılan sulandırıcı ve kriyoprotektan maddeler de spermatozoonların fertilité yeteneğini etkilemektedir. Araştırmalar tavşanlarda spermanın dondurma çözündürme sonrası total ve progresif motilite değerlerinin düştüğünü göstermektedir. Sonuç olarak tavşanlarda spermanın işlenmesi ve saklanması ile ilgili daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çıkar Çatışması

Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Alvarino JM., 2000. Reproductive performance of male rabbits. 7th Congreso Mundial de Cunicultura. Valencia, Spain, 4-7 July, 13-35.
- Bencheikh N., 1995. Effet de la fréquence de collecte de la semence sur les caractéristiques du sperme. *Ann Zoot*, 44, 263-279.
- Boiti C., Castellini C., Besenfelder U., Theau-Clément M., Liguori L., Renieri T., Pizzi F., 2005. Guidelines for the handling of rabbit bucks and semen. *World Rabbit Sci*, 13(2), 71-91.
- Carluccio A., Robbe D., De Amicis I., Contri A., Russo F., Paoletti M., 2004. Artificial insemination in rabbits: Laboratory and field trial with three different semen extenders. *World Rabbit Sci*, 12, 65-79.
- Chen Y., Foote RH., 1994. Survival of rabbit spermatozoa frozen and thawed at different rates with and without seeding. *Anim Reprod Sci*, 35(1-2), 131-143.
- Curry MR., Redding BJ., Watson PF., 1995. Determination of water permeability coefficient and its activation energy for rabbit spermatozoa. *Cryobiology*, 32, 175-181.
- Di Iorio M., Manchisi A., Rocco M., Chrenek P., Iaffaldano N., 2014. Comparison of different extenders on the preservability of rabbit semen stored at 5 C for 72 hours. *Ital J Anim Sci*, 13(4), 3444.
- El-Habbato HE., Radwan AA., El-Menoufy AA., 1984. Testicular and epididymal sperm reserves in three breed of rabbits under subtropical conditions. *Egypt Poultry Sci*, 4,63-80.
- El-Kelawy HM., Tawfeek MI., El-Gaafary MN., Ibrahim H., 2012. Viability and fertilizing ability of extended rabbit semen stored at 5°C. pp 285-289 in *Proc. 10th World Rabbit Congr.*, Sharm El-Sheikh, Egypt.
- Fox RR., 1961. Preservation of rabbit spermatozoa: Fertility results from frozen semen. *Proc Soc Exp Biol Med* 108, 663-665.
- Gogol P., 1999. Cryopreservation of plasma-deprived rabbit semen. *Ann Anim Sci*, 26, 85-92.
- Hanada A., Nagase H., 1980. Cryoprotective effects of some amides on rabbit spermatozoa. *Reproduction*, 60(1), 247-252.
- Helleman C., Krause D., Weitze KF., 1979. Congelación de semen de conejo. II. Efecto de la cantidad, motilidad espermática e integridad de acrosomas sobre fertilidad. *Arch Med Vet*, 11, 32-36.
- İleri K., Ak K., Pabuccuoğlu S., Birlir S., 2002. Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama. Ders Notu No, 133, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını, İstanbul.
- Kashiwazaki N., Okuda Y., Seita Y., Hisamatsu S., Sonoki S., Shino M., Inomata T., 2006. Comparison of glycerol, lactamide, acetamide and dimethylsulfoxide as cryoprotectants of Japanese white rabbit spermatozoa. *Journal of Reprod Dev*, 52(4), 511-516.
- Kubovicova E., Makarevich A., Balazi A., Vasicek J., Chrenek P., 2022. Factors affecting rabbit sperm cryopreservation: A mini-review. *Zygote*, 30(1), 1-8.
- Liu JL., Kusakabe H., Chang CC., Suzuki H., Schmidt DW., Julian M., Pfeffer R., Bormann C. L., Tian XC., Yanagimachi R., Yang X., 2004. Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits. *Biol Reprod*, 70, 1776-1781.

18. Luzi F., Maertens L., Mijen P., Pizzi F., 1996. Effect of feeding level and dietary protein on libido and semen characteristics of bucks. In: Proc. 6th World Rabbit Congr., Toulouse, vol. 2, 87-92.
19. Martín-Bilbao M., 1993. Congelación de semen de conejo. Efecto de algunos agentes crioprotectores sobre la viabilidad espermática, V Jornadas sobre Producción Animal, ITEA 12 (Supl. II), 486-488.
20. Mocé E., Blanch A., Talaván M., Viudes-de-Castro M., 2015. Effect of different freezing velocities on the quality and fertilising ability of cryopreserved rabbit spermatozoa. *Reprod Fert Dev*, 27, 846-851.
21. Mocé E., Vicente JS., 2009. Rabbit sperm cryopreservation: a review. *Anim Reprod Sci*, 110, 1-24.
22. Moriya T., 1996. Cryopreservation of semen from Japanese white rabbits for use in teratological studies. *Exp Anim*, 45, 403-404.
23. Naughton CK., Nelson DR., Thomas Jr AJ., 2003. Development of an inexpensive artificial vagina for semen collection from rabbits. *J Androl*, 24(5), 712-715.
24. Nizza A., Di Meo C., Taranto S., 2000. Influence of dietary protein content on libido and semen characteristics bucks. in: Proc. 7th World Rabbit Congr. Valencia jul, 217-224.
25. Nizza A., Di Meo C., Taranto S., 2003. Effect of collection rhythms and season on rabbit semen production. *Reprod Domest Anim*, 38(6), 436-439.
26. Orgebin-Crist M., 1968. Gonadal and epididymal sperm reserves in the rabbit: estimation of daily sperm production. *J Reprod Fert*, 15,15-25.
27. Orihuela A., Ungerfeld R., 2019. Acoustic characteristics of vocalisations emitted by the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) during copula ejaculation and electro-ejaculation with or without anaesthesia. *World Rabbit Sci*, 27(3), 157-162.
28. Öztemel S., Doğan İ., Soylu MK., 2003. Beyaz Yeni Zelanda ırkı tavşanların kimi spermatolojik özellikleri. *Uludag Univ J Fac Vet Med*, 22(1-2-3), 69-73.
29. Roca J., Martínez S., Vázquez J. M., Lucas X., Parrilla I., Martínez EA., 2000. Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-buffer extenders and stored at 15°C. *Anim Reprod Sci*, 64(1-2), 103-112.
30. Rohloff D., Laiblin C., 1976. Deep-freezing of rabbit spermatozoa. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 89, 181-183.
31. Rossato MP., Laffaldano N., 2013. Cryopreservation of rabbit semen: comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapour freezing and vitrification. *Theriogenology*, 79, 508-516.
32. Sawada Y., Chang MC., 1964. Motility and fertilizing capacity of rabbit spermatozoa after freezing in a medium containing dimethyl sulfoxide. *Fertil Steril*, 15, 222-229.
33. Sevim S., Sariözkan S., 2020. Kısa süreli saklanan tavşan spermasının spermatolojik parametreleri üzerine taxifolinin etkileri. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, 17(2), 164-172.
34. Sevinç A., 1973. Tavşanlarda Suni Tohumlama. A.Ü. Veteriner Fakültesi Zootečni Kürsüsü, 135-144.
35. Sönmez M., 2015. Reproduksiyon suni tohumlama ve androloji ders notları, Elazığ.
36. Theau-Clément M., Lattaioli P., Roustan A., Castellini C., 1996. Reliability and accuracy of a computerized semen image analyses to evaluate various biological parameters in rabbit semen. in: Proc. 6th World Rabbit Congr., Toulouse, Jul., vol. 2, 139-143.
37. Vicente JS, Viudes de Castro MP., 1996. A sucrose-DMSO extender for freezing rabbit semen. *Reprod Nutr Dev*, 36, 485- 492.
38. Zaniboni L., Cassinelli C., Mangiagalli MG., Gliozzi TM., Cerolini S., 2014. Pellet cryopreservation for chicken semen: Effects of sperm working concentration, cryoprotectant concentration, and equilibration time during in vitro processing. *Theriogenology* 82, 251-258.