

KARACABEY HARASI SAFKAN ARAP VE HAFLİNGER AYGIRLARINDAN
ALINAN SPERMALARIN DONDURULMASI VE HAFLİNGER KISRAKLARIN-
DAN ELDE EDİLEN DÖLVERİMİ

Afif Sevinç*

Nafiz Yurdayın**

Necmettin Tekin**

Freezing semen of Arabian and Haflinger Stallions raised in Karacabey State Farm and fertility achieved in Haflinger mares.

Summary: *Three ejaculates from each of 2 Arabian and 3 Haflinger stallions were diluted in Merck-Lactose-Egg-Yolk-OEP-Glycerin extender and frozen on liquid nitrogen vapor.*

The total averages of ejaculate volum, sperm concentration million per ml, pH, sperm motility, percentage of abnormal sperm and post-thawing sperm motility in semen of Arabian and Haflinger stallions were 38.33 ml, 202.666, 6.9, 73.33 %, 28.33 % and 47.58 %; And 30 ml, 214.277, 6.9, 78.99 %, 23.33 % and 49.99 % respectively.

Fourteen Haflinger mares were inseminated twice at their foaling estrus and 50 % pregnancy was obtained.

The results achieved in this preliminary study have shown that stallions semen can be frozen and stored effectively and most probably has the potential to give normal fertility results when used in inseminating mares.

Özet: *Bu araştırmada, Karacabey Harası Yetiştirilmesi 2 safkan Arap ve 3 Safkan Haflinger aygırlarının herbirinin gün aşırı alınan 3'er ejakülat, Merck-Laktoz-Yumurta Sarısı-OEP-Gliserin sulandırıcısı ile sulandırılarak makrotübe donduruldu.*

* Prof. Dr. A.Ü. Veteriner Fakültesi, Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama Bilim Dalı, Ankara.

** Dr. Med. Vet. A.Ü. Veteriner Fakültesi, Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama Bilim Dalı, Ankara.

Safkan Arap Aygırlarında, toplam ortalama sperma miktarı 38.33 cm³, spermatozoa yoğunluğu cm³ te 202.666 milyon, pH 6.9, motilite % 73.33, anormal spermatozoa oranı % 28.83 ve donmuş spermanın çözüm motilitesi % 47.58 olarak saptandı.

Safkan Haflinger aygırlarının ise toplam ortalama sperma miktarı 30 cm³, spermatozoa yoğunluğu cm³ te 214.277 milyon, pH 6.9, motilite % 78.94, anormal spermatozoa oranı % 23.33 ve donmuş spermanın çözüm motilitesi de % 49.99 olarak bulundu.

Haflinger aygırlarının donmuş spermalarıyla tohumlanan 14 Haflinger kısırağında % 50 oranında gebelik elde edildi.

Bu ön çalışmada elde edilen sonuçlar, aygır spermasının boğa sperması gibi dondurulup saklanabileceğini gösterdiği gibi, donmuş aygır spermasının istenildiğinde Türkiye halk at yetiştiriciliğinde muhtemelen normal bir dölverimiyle kullanılabilmesi olanağını da verebilecek bir nitelik taşımaktadır.

Giriş

Türkiye'de, % 90'ından fazlası küçük ve orta yapılı, yerli ırklardan oluşan 1 milyona yakın at bulunmaktadır. Bu yerli atları ıslah etmek ve iş gücünü artırmak için, Cumhuriyetin kuruluşundan bu yana ülkenin çeşitli bölgelerinde, sayıları kimi zaman 50'ye varan aygır depolarında tutulan, çeşitli ırktan aygırlarla çiftçilerin kısırakları tohumlanarak ıslah çalışmaları sürdürülmüştür.

Son yıllarda, aygır sperması, boğa sperması gibi başarıyla dondurabilmekte ve çok uzun bir süre saklanabilmektedir. Makrotüb içinde, tekniğine uygun olarak Türkiye'de dondurulacak aygır spermasının at yetiştiriciliği ve ıslahına, dolayısıyla de yurt ekonomisine küçümsenemeyecek ölçüde yararlar sağlayacağı kuşkusuzdur.

1949'da, Polge ve ark. (16), tarafından spermanın dondurularak uzun süre saklanabileceği ve sun'i tohumlama uygulamasında kullanılabilmesinin ortaya konmasından sonra aygır spermasını -79° C de cam ampuller içinde ilk kez 1954'de Szumowski (19), 1955'de Roy (17), 1956'da, Iljinaskaja (6), 1957'de Barker ve Gandier (4), 1960'da, Zmurin (20) ve 1961 de Platov ve Rombe (15) dondurmuşlardır. Bu araştırmacılar-dan Barker ve Gandier (4), donmuş aygır spermasıyle ilk kez normal

bir dölverimi almışlardır. Daha sonra, Nagese ve ark. (11) ile Merkt ve Krause (10) 1966'da, Krause ve Grove (8) 1967'de, Hess ve ark. (5) ile Bader ve Mahler (3) 1968'de aygır spermasını pellet yöntemiyle dondurarak çok iyi sonuçlar elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bader ve Mahler (3), donmuş aygır sperması ile tohumladıkları 21 kısrağa % 47.6 gebelik oranı saptamışlardır.

Nishikawa ve ark. (12) ise, 1968'de değişik ırk 13 aygırdan aldıkları spermayı Lactose-Raffinose-Citrate-Phosphate-Tartarate-Yumurta Sarısı ile sulandırıp payette dondurmuşlardır. Araştırmacılar, dondurdukları spermalarda, çözüm sonu motilite oranını ortalama % 80 ve bu spermalar ile tohumladıkları 113 kısrağa % 44.2 gebelik oranı bulmuşlardır. Petelikova ve ark. (14) da, ilk spermatozoa motilite oranını % 64.7 olarak saptadıkları değişik ırktan aygırların spermalarını dondurup çözdükten sonra, ortalama % 31.6 oranında motilite elde etmişlerdir.

Öteyandan, Bader (2) aygır spermasını 1/3 oranında Laktoz-Yumurta Sarısı-Gliserin sulandırıcısı ile sulandırıp kuru buz üzerinde pelet şeklinde dondurmuştur. Sıvı azot içinde muhafaza ettiği peletleri çözdüğünde, spermatozoa motilite oranını % 50 bulmuştur.

Aliev (1) ise, Laktoz-EDTA-Yumurta Sarısı Sitrata sulandırıcısı ile sulandırdığı aygır spermasını yumuşak plastik tüplerde dondurmuş ve bu spermaların çözüm sonu motilite oranını % 30 olarak saptamıştır. Krause ve Grove (8) de, aygır ve eşek spermalarını Glikoz-Yumurta Sarısı-Gliserin ve Raffinoz-Yumurta Sarısı-Gliserin sulandırıcıları ile sulandırıp pellet şeklinde dondurmuşlar ve alınan ejakülatlarda dondurmadan önce % 70-80 olan motilite oranını, dondurup çözdükten sonra % 50-70 olarak bulmuşlardır.

Schörner ve Leeb (18), Avusturya'da Haflinger ve Noriker ırkından 13 aygırdan aldıkları spermaları Laktoz-Yumurta Sarısı-Gliserin sulandırıcısı ile sulandırıp pellet metoduyla dondurmuşlardır. Aynı araştırmacılar, bu sulandırıcı içindeki maddeleri üç değişik oranda kullanmışlar ve bu değişik orandaki sulandırıcılarla dondurulan spermaları yağsız ve steril sütte çözmüşlerdir. Sonuçta motilite oranlarını şöyle bulmuşlardır (Çizelge 1).

Öteyandan, Klug ve ark. (7), aygır spermasını Laktoz-Yumurta Sarısı-Gliserin sulandırıcısı ile sulandırıp pellet metoduyla dondurdukları spermaların motilite oranını, donmadan önce % 75, dondurup çözdükten sonra % 40 olarak saptamışlardır.

Çizelge 1.

İrk	Çözme Sulandırıcısı	Motilite % Sulandırıcı		
		1.	2.	3.
Haflinger	Yağsız süt	31	38.8	40
	Steril "	51.1	61.6	65.1
Noriker	Yağsız süt	24.4	27.4	29.4
	Steril "	40.8	53.3	58.5

Daha sonra, Martin ve ark. (9) 1979'da Westendorf ve arkadaşlarından modifiye ederek makrotübü geliştirmişlerdir. Bu araştırmacılar Laktose-Yumurta Sarısı-Merck sulandırıcısı-Gliserin-Orvus-Es-Paste ile aygır spermasını sulandırıp bir tohumlama dozunda 100-200 milyon spermatozoa bulunacak şekilde 4 cm³ lük makrotüplerde dondurmuşlardır. Martin ve ark. (9), tohumladıkları 19 kısırdan % 63.2 gebelik oranı aldıklarını bildirmişlerdir. Oliveira (13) de, Martin ve ark. (9) nın kullandıkları sperma-sulandırıcısına değişik oranlarda (% 1, % 3, % 5) Gliserin katarak, aygır spermasını makrotüpte dondurmuştur. Gliserin (% 5) içeren sulandırıcı ile dondurduğu spermaların çözümden sonraki motilite oranını % 56 ve bu spermalarla tohumladığı 32 kısırdan % 34.4 gebelik oranı saptamıştır.

Bu ön çalışma, Karacabey Harası yetiştirme safkan Arap ve Haflinger aygırları spermalarının makrotüp'te dondurulması olanaklarını araştırmak ve dondurulmuş Haflinger aygırları spermalarının dölverimini saptamak amacıyla yapılmıştır.

Materyal ve Metot

Araştırmada materyal olarak Karacabey Harası Yetiştirme 2 Safkan Arap ve 3 Safkan Haflinger aygırı ile geçen yıl Avusturyadan ithal edilen 14 Haflinger kısrağı kullanıldı. Her aygırdan 3'er ejakülat sperma, 1984 yılı sıfat sezonu başında ve gün aşırı olarak, sabahları sun'i vajen ile alındı.

Alınan ejakülatların miktarı dereceli cam kadehle, pH sı, pH kağıdı ile saptandı. Spermatozoa motilitesi ise % 5'lik glikoz eriyiği ile sulandırıp üzerine lâmel kapatılarak mikroskopun 10 x 45'lik objektifi ile, üç ayrı mikroskop alanında bir yönde hızlı hareketli spermatozoa sayılarının ortalaması olarak değerlendirildi.

Sperma yoğunluğu, her ejakülatın kapillar pipetle alınan 0.1 cm³ sperma, 9.9 cm³ Hayem solusyonuna* katılarak, özel lâm olan ve herbiri 16 küçük kare içeren 16 orta kareli Thoma lâmi kullanılarak saptandı.

Sperma ejakülatlarındaki anormal spermatozoa'ların türünü, sayısını ve oranlarını saptamak için Kördel'den (1959) modifiye edilen Karras yöntemiyle hazırlanan preparatların herbirinden 400 spermatozoa sayılarak değerlendirildi.

Bu çalışmada aşağıda yapısı ve iki bölümü verilen sperma sulandırıcısı kullanılmıştır.

1. Bölüm (Fa. Merck. Art. 10821 firmasının preparatı)

D-Glukose (Monohidrat)	60.00 g
Tri-Natriumcitrate-2 Hidrat	3.75 g
Athylendiamintetraessigsäure Dinatriumsaltz	3.70 g
Natriumhydrogenatcarbonat	1.75 g
Penicillin-G-Natrium	500.000 I.E.
Bidistile su	1000.00 cm ³
2. Bölüm	
% 11 lik laktoz	50.0 cm ³
Merck sulandırıcısı	25.0 cm ³
Yumurta sarısı	20.0 cm ³
Orvus-Es-Paste (Equex STM)	0.8 cm ³
Gliserin	5 cm ³

* Hayem Solusyonu : 5 kısım Natrium Sülfat

1 " Natrium Chlorid

0.5 " Quecksilberchlorid

200 " Bidistile Su

Spermatolojik özellikleri saptanan spermalar 1:1 oranında 1. bölümle yani Merck firmasınınca yapılan sulandırıcıyla sulandırılıp 10 dakika belettikten sonra dakikada 3000 devir ve 5 dakikalık bir sürede santrifüje edildi. Santrifüje edilen spermaların plazma kısmı pipetle çekilerek dibe çöken ve spermatozoaları içeren kısım, sulandırıcının 2. bölümü ile sulandırılıp, her biri 4 cm³ hacmindeki makrotüplere, 100 milyon motil spermatozoa düşecek biçimde dolduruldu.

Makrotüplere çekilen spermalar sıvı azot buharında 20 dakika tutularak donduruldu. Dondurulan spermalar gobletlere konarak sıvı azotta muhafaza edildi.

Daha sonra, donmuş spermalar 50° C de 40 saniyede çözülerek motilite oranları saptandı.

Ondört Haflinger kısağı, doğum sonu ilk kızgınlıklarında, yaklaşık 3 ay sıvı ezotta saklanmış spermalarla 2 kez tohumlandı. Kısırakların gebelik durumu, tohumlamadan 15 gün sonra başlayarak 60. güne kadar periodik muayenelerle saptandı.

Bulgular

Araştırmada kullanılan 2 Safkan Arap aygırının gün aşırı alınan 3'er ejakülatlarında saptanan spermatolojik özellikler Tablo-1'de gösterilmiştir. Tablodan izlenebileceği gibi, 86/71 Berk adlı Safkan Arap aygırının ortalama sperma miktarı 33.33 cm^3 , spermatozoa yoğunluğu cm^3 de 177.833 milyon, pH 7.0, motilite % 68.33, anormal spermatozoa oranı % 29 ve spermanın dondurulup çözüldükten sonraki motilite oranı da % 50.16 bulundu.

Aynı Tablodan görüleceği gibi, 95/72 Kuruş adlı aygırın ortalama sperma miktarı 43.33 cm^3 , spermatozoa yoğunluğu cm^3 de 277.500 milyon, pH 6.8, motilite % 78.33, anormal spermatozoa oranı % 28.66 ve spermanın dondurup çözüldükten sonraki motilite oranı da % 45 idi.

Bu iki aygırın toplam ortalama sperma miktarı 38.33 cm^3 spermatozoa yoğunluğu cm^3 de 202.666 milyon, pH 6.9, motilite % 73.33, anormal spermatozoa oranı % 28.83 ve spermanın dondurup çözüldükten sonraki motilite oranı ise % 47.58 değerlerde bulundu.

Karacabey Harası yetiştirmesi 3 Safkan Haflinger aygırının her birinden gün aşırı alınan 3'er ejakülatlarında elde edilen spermatolojik özellikler Tablo 2'de verilmiştir. Tablodan izlenebileceği gibi, 2/74 Hakan adlı aygırın ortalama sperma miktarı 24 cm^3 , spermatozoa yoğunluğu cm^3 'de 207.583 milyon, pH 6.9, motilite % 78.33, anormal spermatozoa oranı % 26 ve spermanın dondurulup çözüldükten sonraki motilite oranı ise % 46.66 bulunmuştur.

Alper adlı aygırın 3/74 ortalama sperma miktarı 29.1 cm^3 , spermatozoa yoğunluğu cm^3 'de 261.833 milyon, pH 6.9, motilite % 80.17, anormal spermatozoa oranı % 27 ve spermanın dondurup çözüldükten sonraki motilite oranı da % 58.33 olarak saptanmıştır.

Aynı Tablodan görülebileceği gibi, 5/74 Volkan adlı Safkan Haflinger aygırının ortalama sperma miktarı 37 cm^3 , spermatozoa yoğun-

Tablo 1. İki Safkan Arap aygırından gün aşırı alınan 3'er ejakülatta saptanan spermatojistik özellikler

Aygırın adı Numarası	Ejekülata alındığı gün	Sperma miktarı (cm ³)	Spermatozoa yoğun- luğu (milyon /cm ³)	pH	Motilite (%)	Anormal spermato- zoa oranı (%)	Çözüm sonu motilitesi (%)
Berk 86 /71	14.2.1984	28	253.750	6.5	60	31	40
	16.2.1984	50	131.250	7.0	70	24	55
	18.2.1984	22	146.250	7.5	75	32	60
	Ortalama	33.33	177.833	7.0	68.23	29	50.16
Kuruş 95 /72	14.2.1984	40	217.500	6.7	80	29	40
	16.2.1984	36	162.500	6.7	70	31	45
	18.2.1984	54	302.500	7.0	85	26	50
	Ortalama	43.33	227.500	6.8	78.33	28.66	45
Toplam Ortalama		38.33	202.666	6.9	73.33	28.83	47.58

Tablo 2. Üç Safkan Haflinger aygırından gün aşırı alınan 3'er ejakülatlarında saptanan spermatozojik özellikler

Ayırın adı Numarası	Ejekülatın alındığı gün	Sperma mik- tarı (cm ³)	Spermatozoa yoğun- luğu (milyon /cm ³)	pH	Molitite (%)	Anormal spermato- zoa oranı (%)	Çözüm sonu motilitesi (%)
Hakan 2/74	15.2.1984	25	263.750	6.9	75	18	40
	17.2.1984	24	170.250	6.8	80	24	50
	19.2.1984	23	188.750	7.0	80	26	50
	Ortalama	24	207.583	6.9	78.33	26	46.66
Alper 3/74	15.2.1984	32	352.500	7.0	85	36	60
	17.2.1984	22	260.500	6.8	80	21	55
	19.2.1984	33	172.500	7.0	80	24	60
	Ortalama	29.1	261.833	6.9	80.17	27	58.33
Volkan 5/74	15.2.1984	50	218.750	6.8	85	22	40
	17.2.1984	26	230.250	7.0	75	18	45
	19.2.1984	35	71.250	7.0	75	11	40
	Ortalama	37	173.416	6.9	78.33	17	45.99
Toplam Ortalama		30	214.277	6.9	78.94	23.33	49.99

luğu cm^3 'de 173.416 milyon, pH 6.9, motilite % 78.33, anormal spermatozoa oranı % 17 ve spermanın dondurulup çözüldükten sonraki motilite oranı da % 45 idi.

Öteyandan, bu üç aygırın toplam ortalama sperma miktarı 30 cm^3 , spermatozoa yoğunluğu cm^3 'de 214.277 milyon, pH 6.9, motilite % 78.94, anormal spermatozoa oranı % 23.33 ve spermanın dondurulup çözüldükten sonraki motilite oranı ise % 49.99 olmuştur.

Bu arada makrotüpte dondurulup, yaklaşık 3 ay sıvı azotta saklanılan Haflinger spermalarıyla doğum sonu ilk kızgınlıklarında 2 kez tohumlanan 14 Haflinger kısrığından 7'sinin (% 50) gebe olduğu saptanmıştır.

Tartışma ve Sonuç

Araştırmada kullanılan 2 Safkan Arap ve 3 Safkan Haflinger aygırlarının spermaları dondurulmadan önce sırasıyla, sperma motilite oranları ortalama % 73.33 ve % 78.94 bulundu.

Elde edilen bu sperma motilite oranları Krause ve Grove (8) nin 70-80; Klug ve ark. (7) nin % 75 olarak bildirdikleri sperma motilite oranlarına benzer bir değer göstermektedir.

Oysa, Petelikova ve ark. (14) nin % 64.7 olarak buldukları sperma motilite oranı, bu çalışmadaki bulgulardan düşüktür. Aradaki bu fark, araştırmada kullanılan aygırların farklı ırktan ve genetik yapıda olmalarından ileri gelebileceği gibi, motilite oranlarını saptama ve değerlendirme teknik ve yöntemlerinden ve kullanılan aygır sayısı ile, ejekülasyon sayılarının değişik olmasından kaynaklanmış olabilir.

Safkan Arap ve Safkan Haflinger aygırlarının spermaları dondurulduktan sonra 50°C 'de 40 saniyede çözüldüğünde spermatozoa ortalama motilitesini Safkan Arap aygırlarında % 47.58 ve Safkan Haflingerlerde % 49.99 olarak bulunan değerler, Nishikawa ve ark. (12) nin % 80; Krause ve Grove (8) nin % 50-70 ve Bader (3) in % 50; Oliveira (13) nin % 56 olarak elde ettikleri motilite oranlarından düşüktür; Aliev (1) in % 30; Petelikova ve ark. (14) nin % 31.6; Klug ve ark. (7) nin % 40 olarak bildirdikleri motilite oranlarından ise yüksektir.

Bu değişiklikler, sözkonusu araştırmalarda kullanılan aygırların değişik ırk ve genetik yapıda olmalarından doğmuş olabileceği gibi,

kullanılan sperma sulandırıcılarının değişik ve sulandırıcılara katılan gliserin oranlarının da farklı olmasından kaynaklanmış olabilir. Aygır spermasını dondurma teknik ve yöntemleriyle, spermayı çözme ve kullanılan sulandırıcıların değişik olması da sonuçların farklılığına neden olmuş olabilir.

Bu arada, Schörner ve Leeb (18) in, dondurdukları aygır spermasını yağsız süt ve steril sütte çözerek saptadıkları sperma motilite oranları, bu araştırmadaki bulgulardan büyük ölçüde değişiklik göstermektedir. Bu değişiklik, spermayı dondurma teknik ve yöntemlerinin farklılığı yanında, çözümde kullanılan sulandırıcıların değişik etki yapmalarından da doğmuş olabilir.

Haflinger kısıraklarında elde edilen gebelik oranı (% 50), Nishikawa ve ark. (12)'nin % 44.2; Bader ve Mahler (3) in % 47.6 olarak bildirdikleri gebelik oranlarına yakın, ama Martin ve ark. (9)'nin % 63.2 olarak bildirdikleri gebelik oranından bir ölçüde düşük, Oliveira (13)'nin % 34.4 olarak bulunduğu gebelik oranından ise yüksektir.

Bu çalışmada gebelik oranı ile öbür araştırmacıların bulguları arasındaki fark, araştırmada kullanılan aygır ve kısırakların değişik ırk ve genetik yapıda olmaları yanında, spermayı dondurma ve tohumlamada kullanılan farklı tekniklerin, bir yada bir kaçından doğmuş olabilir.

Öteyandan, donmuş aygır spermasıyla yapılan bu ön çalışma sonuçlarının aygır spermasının da boğa sperması gibi dondurabileceği ve kimi araştırmacıların (2,4,5,6,9,10,11,15,16,17,19,20) da belirttiği gibi ileride donmuş aygır spermasıyla tohumlanacak kısıraklardan normal dölverimi sonuçları alınabileceğini ve at yetiştiriciliğinde etkin bir biçimde kullanılabileceğini göstermektedir.

Türkiye'de donmuş aygır spermasının halk at yetiştiriciliğinde kullanılması halinde:

a- Kısırakların bir kızgınlık süresi içinde, elde yeterince donmuş sperma bulunduğu için, 1 yerine 2, 3 hatta 4 kez tohumlamak mümkün olduğundan dölverimi, dolayısıyla yayru verimi önemli ölçüde artacaktır.

b- Spermanın dondurulmasıyla bir aygırdan doğal çiftleşmeye bakarak 20 misli kısrağın tohumlanabilecektir.

c- Türkiye'de var olan aygır depoları kaldırılmış olduğundan bunlar için yapılan tüm harcamalar tasarruf edilmiş olacaktır.

d- Bugünkü aygır depoları sisteminde, Türkiyede yalnız Karacabey Harasında Haflinger yetiştirilmesi yapıldığından çok sınırlı sayıda aygır elde edilebilmekte ve aygır depolarının aygır talepleri karşılanamamaktadır. Kaldı ki, aygır depolarına gönderilen aygırlardan doğal çiftleşme ve uygulanagelen sistemin yetersizliği nedeniyle çok düşük bir dölverimi alınmaktadır. Oysa, Karacabey Harası Haflinger aygırlarının spermaları dondurularak, Türkiye'nin hemen her yerine, bunların donmuş spermalarını göndermek ve yerli atları bunlarla tohumlayarak çok daha yüksek bir dölverimi almak ve çiftçilerin çok istedikleri Haflinger atını nispeten kısa sürede edinmelerini sağlamak mümkün olacaktır.

Literatür

- 1- Ailev, A. (1975). *In improved technique of semen freezing*. Anim. Breed. Abstr. 44: 180.
- 2- Bader, H. (1968). *Zur Tiefgefrierung von Hengstsperma nach der Pelletmethode*, VI. Internat. Kongr. Tier. Fortpfl. Haustierbes, Paris, II. 985-988.
- 3- Bader, H. und Mahler, R. (1968). *Tiefgefrier- und Besamungsversuche mit Hengstsperma unter Anwendung des pelletverfahrens*. Zuchthygiene, 3: 6-13.
- 4- Barker, C.A., and Gandier, J.C.C. (1957). *Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa*. Can. J. Comp. Med., 21: 47-51.
- 5- Hess, R., Schöfer, W., Schmidt, D. und Bowm, W. (1968). *Versuche zur pelletierung von Hengstsperma*, Fortpfl., Bes, u. Aufz. der Haust. 4, 207-214.
- 6- Iljinskaja, T. (1956): *The effect of various factors on stallion spermatozoa frozen to -70 C*. Anim. Breed. Abstr. 25 (1957): 132.
- 7- Klug, E., Günzel, A.-R., Merkt, H. und Krause, D. (1977). *Untersuchungen von Hengsten zum Einsatz in der instrumentellen semenübertragung mit Tiefgefriersperma*. Dtsch. tierarztl. Wochenschr., 84: 236-238.
- 8- Krause, D., and Grove, D. (1967). *Deep freezing of jack ass and stallion semen in concentrated pellet form*. J. Reprod. fertil., 14: 139-141.
- 9- Martin, J.C., Papa, F.O., Krause, A. und Klug, E. (1980). *Einfluss der Zentrifugation auf die Motilität von Hengstsperma im Thermoresistenz und Tiefgefrieretest*. Zuchthygiene, 15: 93
- 10- Merkt, H. und Krause, D. (1966). *Tiefgefriersperma-versuche mit Equindensperma unter Anwendung des sog. pellet-Verfahrens*. Dtsch. tierarztl. Wochenschr., 73: 267-268.
- 11- Nagase, H., Soejime, S., Niwa, T., Oshida, H., Sagara, Y., Ishizaki, N. and Hoshi, S. (1966a). *Studies on the freezing of stallion semen. I. Fertility results of stallion semen in concentrated pellet form*. Jap. J. Anim. Reprod. 12: 48-51.
- 12- Nishikawa, Y., Waide, Y. and Shinomiya, S. (1968). *Studies on deep freezing of horse spermatozoa*. IV. Internat. Kongr. Tier. Fortpfl. Haustierbes., Paris II, 1589-1590.

- 13- Oliveira, M.A.L. (1982). *Einfluß verschiedener Aufbereitungsverfahren auf Motilität und Akrosinaktivität in der Thermoresistenzprüfung und auf das Befruchtungsergebnis von tiefgefrorenem Pferdesamen*. Hannover, Tierarztl. Hochschule, Dissertation.
- 14- Petelikova, J., Matouser, V. and Müller, Z. (1977). *Experiences with artificial insemination of mares with frozen semen*. Anim. Breed. Abstr. 46: 3162.
- 15- Platov, E.M. and Rombe, S.M. (1961). *Freezing semen, diluted in Laktose-Yolk, with 2 percent glycerol preliminary communication*. Anim. Breed. Abstr. 30 (1962): 157.
- 16- Polge, C., Smith, A.U. and Parkes, A.S. (1949). *Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature*. Nature, 164: 666.
- 17- Roy, A. (1955). *Storage of boar and stallion spermatozoa in glycine-egg-yolk medium*. vet Rec., 67: 330.
- 18- Schörner, G. und Leeb, M. (1977). *Zur Tiefgefrierkonservierung von Hengstisamen*. Wien tierarztl. Monatsschr., 64: 91-93.
- 19- Szumowski, M.P. (1954). *Essais de congelation du sperma de cheval*. Anim. Breed. Abstr. 23 (1955): 124.
- 20- Zmurin, L. (1960). *Diluents for stallion semen frozen to -20° C*. Anim. Breed. Abstr. 30 (1962): 157.