

İneklerde gebelik oranı üzerine gözlem yöntemi ve progesteron test kitleriyle yapılan östrus tespitinin etkisi*

Mustafa SÖNMEZ, Gaffari TÜRK, Eşref DEMİRCİ

Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Elazığ

Özet: Bu çalışma, saha koşullarında progesteron test kitleri ile progesteron seviyesinin belirlenmesi ve gözlem yöntemi kullanılarak yapılan östrus tespitinin etkinliğini karşılaştırmak ve progesteron testlerinin ineklerin gebelik oranları üzerine olumlu bir etkisinin olup olmadığını araştırmak amacıyla yapıldı. Bu çalışmada materyal olarak 136 inek kullanıldı. İnekler gözlem yöntemiyle takip edilerek östrus belirtileri kaydedildi. Gözlenen östrus belirtilerinin şiddetine göre hayvanlar üç alt gruba ayrıldı. Serum örneklerinde progesteron test kitleri ile progesteron seviyeleri belirlendi. Progesteron düzeylerine göre de hayvanlar üç alt gruba ayrıldı. Daha sonra ineklerin hepsi suni tohumlama yöntemiyle tohumlandı. Tohumlamayı takip eden 55–60. günlerde rektal palpasyonla gebelikler teşhis edildi. Bu çalışmada tohumlamalardan elde edilen ortalama gebelik oranı % 65.4 olarak kaydedildi. Kuvvetli östrus belirtisi gösteren ineklerin gebelik oranı (% 76.5), hiç belirti göstermeyen ineklerinkinden (% 53.7) önemli ölçüde yüksek ($p<0.05$) bulundu. Tohumlama sırasında progesteron düzeyi düşük olan (<1 ng/ml) ineklerdeki gebelik oranının (% 78.5), progesteron düzeyi orta seviyede olan (1–2.5 ng/ml) ineklerinkinden (% 23.8) önemli derecede ($p<0.05$) yüksek olduğu gözlemlendi. Ayrıca bu çalışmada, progesteron düzeyi yüksek (>2.5 ng/ml) olan ineklerden gebelik elde edilemedi. Sonuç olarak, özellikle gözlem yoluyla östrusun davranışsal belirtileri tespit edilemeyen ineklerde östrus tespitindeki hataların önlenmesi ve gebelik oranının artırılması amacıyla progesteron test kitleri kullanılabilir.

Anahtar sözcükler: Gebelik oranı, gözlem yöntemi, inek, östrus tespiti, progesteron düzeyi.

The effect of estrous detection using visual observation and progesterone test kits on conception rate in cows

Summary: This study was conducted to compare the efficiency of estrous detection using visual observation and determination of progesterone levels by progesterone test kits in field condition, and to investigate whether the progesterone tests has positive effect on conception rate of cows. A total of 136 cows were used in this study. Cows were visually observed, and the behavioural signs of estrous were recorded. They were divided into three subgroups considering the intensity of estrous behaviour. Progesterone levels in serum samples were determined by progesterone test kits. Cows were also divided into three subgroups according to the progesterone levels, and then, all cows were inseminated artificially. The conception rates were determined by rectal palpation on 55-60th days following artificial insemination. The mean overall conception rate obtained from inseminations was recorded as 65.4 % in this study. It was found that the conception rate of cows which showed strong signs of estrous (76.5 %) was significantly higher ($p<0.05$) than that of cows exhibited no signs (53.7 %). It was observed that the conception rates (78.5 %) in cows which had low concentrations of progesterone (<1 ng/ml) during insemination was significantly ($p<0.05$) higher than that (23.8 %) of cows which had intermediate concentrations of progesterone (1-2.5 ng/ml). In addition, the conception didn't occur in cows which had high concentrations of progesterone (>2.5 ng/ml). In conclusion, progesterone test kits can be used to avoid errors in heat detection and to obtain higher conception rate from cows whose behavioural signs of estrous are not apparent through visual observation.

Key words: Conception rate, cow, estrous detection, progesterone level, visual observation.

Giriş

Tarım ve Köyişleri Bakanlığının 2000 yılı verilerine göre (5) yaklaşık 11 milyon baş sığır varlığı ile Türkiye dünya sıralamasında önemli bir konumda bulunmaktadır. Ancak mevcut popülasyonun yaklaşık % 68'ini düşük verimli yerli ırklar oluşturduğundan hayvan sayısı daha az olan Avrupa ülkeleriyle kıyaslandığında elde edilen et

ve süt verimi oldukça düşük düzeylerde kalmaktadır. Bu nedenle hayvancılığının geliştirilmesi ve verim özelliklerinin artırılması amacıyla ülkemiz şartlarına iyi uyum sağlamış yerli ırkların kültür ırklarıyla melezlenmesi yapılarak verimlerinin artırılması çalışmaları hız kazanmıştır (4). Yapılan ıslah çalışmalarının başarıya ulaşması ancak saha şartlarında suni tohumlama programlarının

* Bu çalışma, Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP Proje No:947) Birimi tarafından desteklenmiştir.

yaygın, bilinçli ve tekniğine uygun olarak yapılmasına bağlı olup bu konuda hükümet tarafından son yıllarda teşvik programları başlatılmıştır. Ancak yıllardan beri uygulanmasına rağmen özellikle ülkemizin az gelişmiş bölgelerinde henüz arzu edilen yaygınlığa ve başarı düzeyine ulaşamamıştır (24).

Sığır yetiştiriciliğinde verimliliği belirleyen özelliklerin başında düzenli dölvrimi gelmektedir. Düzenli dölvriminden amaç her inekten yılda bir yavru almaktır. Bunu belirleyen faktörlerin başında ise doğum-gebe kalma arası sürenin uzunluğu gelmektedir. Bu sürenin kısaltılması için bakım-besleme şartlarının iyileştirilmesinin yanında östrusun doğru tespit edilmesi de büyük önem taşımaktadır (1, 2).

Östrus, dişi hayvanların bir seri hormonal değişiklikler sonucunda belli fizyolojik ve psikolojik belirtiler göstererek erkeği kabul ettiği dönem olup süresi ortalama 12–18 saat arasında değişmektedir. Ancak bazı hayvanlarda değişik faktörlerin etkisi altında 6 saatten az veya 24 saatten uzun sürebilmektedir (6, 18). Diğer evcil hayvanlara göre ineklerde östrus süresinin kısa ve değişken olması yetiştiricilerin östrus zamanını belirlemesini zorlaştırmasına rağmen doğru tespit edilmesi halinde kontrollü suni tohumlama uygulamaları ile yüksek oranda gebelik elde edilmesi sağlanabilir (11).

Östrusun belirlenmesinde yetiştiriciler tarafından kullanılan en önemli yöntem gözlem yöntemidir. İneklerde östrusun gözlem yöntemiyle belirlenebilen en önemli dış belirtisi bir boğanın veya başka bir ineğin kendisi üzerine atlamasına izin vermesi ve bu süre içerisinde hareketsiz durmasıdır. Bu belirtinin dışında gözlenen diğer tüm davranışsal belirtiler sekonder östrus belirtileri olarak tanımlanmakta olup, bunların çoğu östrus öncesi veya sonrasında gözlenebilir (Tablo 1). Bu yüzden bu belirtilere bakılarak bir ineğin gerçekten östrusta olduğunu tam olarak saptanamaz (8, 16).

Tablo 1. İneklerde gözlem yöntemiyle belirlenen östrus belirtilerinin görülme zamanı

Table 1. The appearance time of estrous signs determined by visual observation in cows

Östrus belirtileri	Proöstrus	Östrus	Metöstrus
Yem tüketimi ve süt veriminde azalma	+	+	-
Huzursuzluk, sinirlilik ve bağırma	+	+	-
Belirli bir grup oluşturma veya koklaşma	+	+	-
Diğer hayvanların üzerine atlama	+	+	-
Vulvanın hiperemik ve nemli olması	+	+	+
Vaginadan çara akıntısının gelmesi	-	+	+
Başka hayvanların kendi üzerine atlamasına izin vermesi	-	+	-

Ülkemizin doğu bölgelerinde sığır yetiştiriciliği yaygın olarak birkaç hayvan bulunan, aile tipi küçük işletmeler şeklinde yapılmakta olup bunlar oldukça dağınık bir yapı göstermektedir. Çoğu işletmelerde hayvanların sürekli ahırda kapalı ve bağlı tutulmaları nedeniyle östrus belirlenmesinde genellikle sekonder belirtilerinin dikkate alınması, yetiştiricilerin östrusu yanlış tespit etme oranını yükseltmektedir (2, 3). Saha şartlarında yapılan bazı çalışmalarda (3, 27) suni tohumlama uygulanan ineklerden % 13-32'sinin östrusta olmadığı halde tohumlandığı ve bu oranın bazı sürülerde % 50'lere kadar çıktığı bildirilmektedir. Ayrıca iyi bakım ve beslenme şartları uygulanan sürülerde gebe olmasına rağmen ineklerin % 5-15'inin östrus belirtilerini gösterdiği ve bu hayvanların tohumlanması sonucu yavru atmaların şekillendiği bildirilmektedir (14). Bu tür hataların önlenmesi için östrusun doğru tespit edilmesine yardımcı olacak pratik yöntemlerin saha koşullarına taşınması elde edilecek gebelik oranlarının artırılması açısından büyük önem taşımaktadır.

Sütte veya kanda yapılan progesteron testleri östrusun belirlenmesinde geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Östrus siklusunun değişik dönemlerinde progesteron düzeyinin farklı olması özellikle östrus dönemi boyunca 1,0 ng/ml'nin altına düşmesi östrus gösteren ineklerin belirlenmesi açısından büyük önem arz eder (7, 9). Ovulation Test[®], yarı kantitatif enzim immunoassay (EIA) ile kandaki progesteron seviyesini görsel okumaya dayanarak tespit eden bir progesteron testidir. Bu test kitleri sayesinde tohumlamadan hemen önce alınacak tek bir kan örneğinde progesteron seviyesindeki düşüş belirlenerek hayvanın östrusta olup olmadığı tespit edilebilir. Bu test, bireysel olarak kullanılabilirliği, kısa sürede sonuç vermesi, RIA tekniğine göre daha hassas ve ekonomik bir ölçüm metodu olması nedeniyle saha koşullarında uygulanabilmektedir. Yapılan progesteron testleri ile suböstrus gösteren inekler belirlenebildiği gibi gebelik kontrolü de mümkün olmaktadır. Ancak düşük progesteron sonuçlarının proöstrus sonunda ve metöstrus başlangıcında görülebileceği gibi foliküler kist ve hakiki anöstrus olgularında da tespit edilebileceği unutulmamalıdır (20, 22).

Bu çalışma, saha koşullarında progesteron test kitleri ile progesteron seviyesinin belirlenmesi ve gözlem yöntemi kullanılarak yapılan östrus tespitinin etkinliğini karşılaştırmak ve progesteron testlerinin ineklerin gebelik oranları üzerine olumlu bir etkisinin olup olmadığını araştırmak amacıyla yapılmıştır.

Materyal ve Metot

Bu araştırmanın materyalini Elazığ ve çevresinde yetiştirilen Esmer ve Esmer Melezi ırktan 136 inek oluşturdu. İneklerin, en az bir doğum yapmış ve doğum

sonrası herhangi bir hastalık geçirmemiş olması şartı arandı.

Gözlem yöntemine göre hayvanların gruplara ayrılması

Hayvanlar günde 3 kez (sabah ve öğleden sonra sağım sonrası ile akşam yemleme sonrası) kendi sahipleri tarafından takip edilerek gözlenen östrus belirtileri kaydedildi. Elde edilen bilgiler doğrultusunda östrusun davranışsal belirtilerinin görülme şiddetine göre hayvanlar 3 alt gruba ayrıldı (Tablo 2).

Tablo 2. Östrusun davranışsal belirtilerinin görülme şiddetine göre ineklerin alt gruplara ayrılması

Table 2. The division of cows into subgroups by the intensity of behavioural signs of estrous.

Gruplar	Östrus belirtileri
A3	Başka hayvanların üzerine atlamasına izin vermesi, vaginadan çara akıntısının gelmesi, diğer hayvanların üzerine atlama, huzursuzluk, sinirlilik ve bağırma, vulvanın hiperemik ve nemli olması, belirli bir grup oluşturma veya koklaşma, yem tüketimi ve süt veriminde azalma.
A2	Vaginadan çara akıntısının gelmesi, diğer hayvanların üzerine atlama, huzursuzluk, sinirlilik ve bağırma, vulvanın hiperemik ve nemli olması, belirli bir grup oluşturma veya koklaşma, yem tüketimi ve süt veriminde azalma.
A1	Diğer hayvanların üzerine atlama, huzursuzluk, sinirlilik ve bağırma, vulvanın hafif hiperemik ve nemli olması, belirli bir grup oluşturma veya koklaşma, yem tüketimi ve süt veriminde azalma.

Ovulasyon test sonuçlarına göre hayvanların gruplara ayrılması

Araştırmada progesteron düzeyinin belirlenmesi amacıyla progesteron test kitleri (Ovulation Test[®], BVT Company, Roma, FRANSA) kullanıldı. Yapılan muayenelerden sonra hayvanın boyun kısmının dezenfeksiyonu yapılarak steril bir kanül yardımıyla vena jugularis'ten steril cam tüplere kan alındı. Alınan kan örnekleri 3000 rpm de 10 dakika santrifüj edilerek serumları çıkarıldı. Progesteron test kitleri kullanılmadan en az 2 saat önce buzdolabından çıkarılarak oda sıcaklığında bekletildi. Bir pipet yardımıyla test kabının tam ortasına 8 damla serum damlatılarak 2 dakika beklendi. Üzerine 1 numaralı yıkama solüsyonundan 4 damla eklendi. Kırmızı kapaklı solüsyondan kabın tam ortasına 3 damla enzim eklenerek 1 dakika beklendi. Daha sonra kabın iç tarafındaki sınır çizgisine kadar (20 damla) 2 numaralı özel yıkama solüsyonundan ilave edildi. Mavi kapaklı karıştırma şişesine Substrat A ve Substrat B'den 15'er damla konularak yeni bir karışım hazırlandı. Hazırlanan yeni karışımdan test kabının ortasına 4 damla ilave edildi. Bu işlemden 9 dakika sonra test kabında oluşan renk, testin renk gösterge çizelgesi ile

karşılaştırılarak elde edilen sonuç kaydedildi. Renk sonuçları doğrultusunda hayvanlar 3 alt gruba ayrıldı (Tablo 3).

Tablo 3. Progesteron düzeylerine göre ineklerin gruplara ayrılması

Table 3. The division of cows into subgroups by the progesterone levels.

Gruplar	Renk	Progesteron düzeyi	Sonuç
T3	Mavi renk	<1 ng/ml	Östrus
T2	Açık mavi renk	1–2,5 ng/ml	Östrusu şüpheli
T1	Beyaz renk	>2,5 ng/ml	Östrusta değil

Hayvanların tohumlanması ve gebelik tespiti

Yapılan tohumlamalarda Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsünden temin edilen 0,25 ml'lik payetler içerisinde dondurulmuş 20×10^6 /motil spermatozoa yoğunluğuna sahip boğa sperması kullanıldı. Tohumlama öncesinde payetler 38°C'de 25 saniye bekletilerek çözdürüldü. Daha sonra inekler rekto-vaginal yöntemle tohumlandı. İnekler tohumlamadan 21 gün sonra gözlem yoluyla takip edilerek tekrar östrus gösterenler belirlendi. Geriye dönmeyenler ise tohumlama sonrası 55–60. günler arasında rektal palpasyonla muayene edilerek gebe olanlar saptandı.

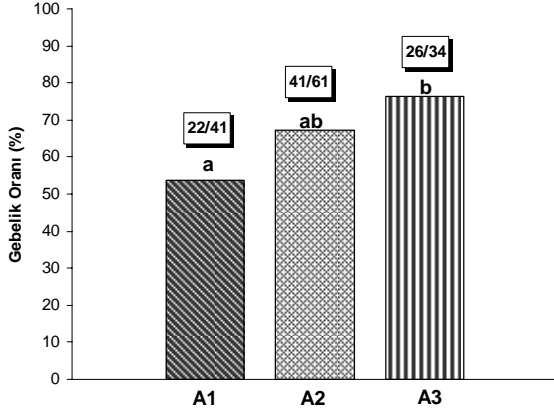
Elde edilen gebelik oranları yönünden gruplar içinde ve gruplar arasındaki farklılıklar istatistikî yönden SPSS (Versiyon 10.0) bilgisayar programında Pearson Ki-Kare (χ^2) testi ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Değerler arasındaki önemlilik derecesi $p < 0.05$ düzeyinde kuruldu.

Bulgular

Yapılan tohumlamalar sonucunda ortalama % 65.4 (89/136) gebelik oranı elde edildi. Gebelik oranlarının gözlem yöntemi bulgularına göre değerlendirilmesi Şekil 1'de gösterilmiştir. Elde edilen gebelik oranları östrusun davranışsal belirtilerinin tam olarak tespit edilemediği (A1 grubu) ineklerde % 53.7 (22/41) olarak belirlenirken, östrus belirtilerini gösteren (A2 grubu) ineklerde % 67.2 (41/61) ve östrus belirtilerini çok belirgin olarak gösteren (A3 grubu) ineklerde ise % 76.5 (26/34) olarak tespit edildi. Yapılan istatistikî değerlendirmede A3 grubu inekler ile A1 grubu inekler arasında gebelik oranları yönünden önemli derecede ($p < 0.05$) farklılık olduğu gözlemlendi.

Gebelik oranlarının progesteron düzeylerine göre değerlendirilmesi Şekil 2'de gösterilmiştir. Tohumlama sırasında progesteron düzeyi düşük (<1 ng/ml) olan (T3 grubu) ineklerin gebelik oranını % 78.5 (84/107) olarak belirlenirken, progesteron düzeyi orta seviyede (1–2.5 ng/ml) olan (T2 grubu) ineklerin gebelik oranı % 23.8

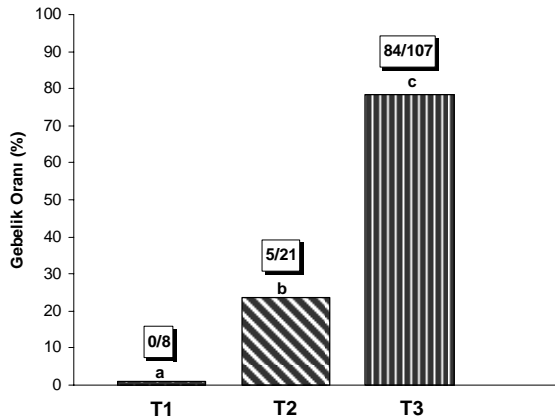
(5/21) olarak tespit edildi. Yapılan istatistikî değerlendirilmede T3 grubu ineklerin gebelik oranının T2 grubu ineklerinkine göre önemli derecede ($p<0.05$) yüksek olduğu saptandı. Progesteron düzeyi yüksek (>2.5 ng/ml) olan (T1 grubu) ineklerden ise gebelik elde edilemedi.



a,b: Değişik harf taşıyan çubuklar arasında önemli düzeyde ($p<0.05$) farklılık vardır.

Şekil 1. Östrusun davranışsal belirtilerinin görülme şiddetine göre alt gruplara ayrılan ineklerin gebelik oranları (A1: Östrus belirtilerini göstermeyen inekler, A2: Östrus belirtilerini gösteren inekler, A3: Östrus belirtilerini çok belirgin olarak gösteren inekler).

Figure 1. The conception rates of cows which were divided into subgroups by the intensity of behavioural signs of estrous. (A1: The cows with no signs of estrous, A2: The cows with some signs of estrous, A3: The cows with strong signs of estrous).



a,b,c: Değişik harf taşıyan çubuklar arasında önemli düzeyde ($p<0.05$) farklılık vardır.

Şekil 2. Progesteron düzeylerine göre gruplandırılan ineklerin gebelik oranları [T1: Progesteron düzeyi yüksek (>2.5 ng/ml) olan inekler, T2: Progesteron düzeyi orta seviyede ($1-2.5$ ng/ml) olan inekler, T3: Progesteron düzeyi düşük (<1 ng/ml) olan inekler].

Figure 2. The conception rates of cows which were divided into subgroups by the progesteron levels. [T1: The cows with high concentration of progesterone (>2.5 ng/ml), T2: The cows with intermediate concentration of progesterone ($1-2.5$ ng/ml), T3: The cows with low concentration of progesterone (<1 ng/ml)].

Tablo 4. Östrusun davranışsal belirtilerinin ve progesteron düzeylerinin birlikte değerlendirilmesi göre alt gruplara ayrılan ineklerden elde edilen gebelik oranları (%)

Table 4. The conception rates of cows which were divided into subgroups by considering both progesteron levels and behavioural signs of estrous (%)

		Progesteron düzeylerine göre kızgınlık derecesi			
		T1	T2	T3	Toplam
		%	%	%	%
Östrusun davranışsal belirtilerine göre kızgınlık derecesi	A3	-----	20.0 ^b (1/5)	86.2 ^a (25/29)	76.5 (26/34)
	A2	0 (0/3)	30.0 ^b (3/10)	79.2 ^a (38/48)	67.2 (41/61)
	A1	0 (0/5)	16.7 ^b (1/6)	70.0 ^a (21/30)	53.7 (22/41)
Toplam		0 (0/8)	23.8 (5/21)	78.5 (84/107)	65.4 (89/136)

a,b: Değişik harf taşıyan değerler arasındaki fark istatistikî olarak ($p<0.05$) önemlidir.

Gözlem yöntemi bulguları ve progesteron düzeylerinin birlikte değerlendirilmesi sonucu gruplandırılan ineklerden elde edilen gebelik oranları Tablo 4'de sunulmuştur. Buna göre en yüksek gebelik oranı progesteron düzeyi düşük olan ve östrusun davranışsal belirtilerinin en belirgin olarak gözlemlendiği (A3-T3 grubu) ineklerden (% 86.2) elde edilirken, progesteron düzeyi yüksek olan ve davranışsal belirtilerinin tam olarak belirlenemediği gruplardaki (A1-T1 ve A2-T1 grubu) ineklerden hiçbirisi gebe kalmadı. Öte yandan, östrus belirtilerinin belirgin olarak tespit edilemediği ancak progesteron seviyesi düşük olan ineklerde (A2-T3 ve A1-T3 grubu) gebelik oranının yüksek olduğu (% 79.2 ve % 70.0) gözlenirken, östrus belirtilerinin çok belirgin olarak görüldüğü fakat progesteron düzeyi orta seviyede olan ineklerde (A3-T2 grubu) gebelik oranının önemli ölçüde ($p<0.05$) düşük olduğu (% 20.0) saptandı.

Tartışma ve Sonuç

Ülkemiz hayvancılığının geliştirilmesi amacıyla yapılan ıslah çalışmalarının başarıya ulaşması ancak saha şartlarında suni tohumlamanın yaygın, bilinçli ve tekniğine uygun olarak yapılmasına bağlıdır. Suni tohumlama programlarının başarıya ulaşmasında ise ineklerde östrusun doğru olarak tespit edilmesi ve en uygun tohumlama zamanının ayarlanması oldukça önemli bir rol oynamaktadır (6, 18). Ülkemizde östrus tespitinde kullanılan başlıca yöntem gözlem yöntemidir (8). Yapılan çalışmada, gözlem yoluyla kızgınlıkta olduğu belirlenerek tohumlanan ineklerden ortalama % 65.4 oranında gebelik elde edilmiştir. Bu oran Xu ve ark.'nın (29) bildirdiği % 65,0 ve Rae ve ark.'nın (25) tespit ettiği % 60.5'lik değerlere benzerlik göstermektedir.

İneklerde kızgınlığın en açık belirtisi başka bir hayvanın kendisi üzerine atlanmasına izin vermesi ve çiftleşmeyi kabul etmesidir. Bunun yanında görülen diğer davranışsal belirtiler de östrusun tespitinde önemli derecede yardımcı rol oynamaktadır. Ancak östrus süresi ve şiddeti hayvanlar arasında çevre sıcaklığı (26), ineğin süt verimi (19), barındırma koşulları (17), beslenme şartları (15) ve bireysel farklılıklara (23) bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Bunun yanı sıra bazı davranışsal belirtilerin kızgınlık öncesi dönemde de (proöstrus) belirgin olarak görülmeye başlaması tohumlamaların yanlış zamanda yapılmasına yol açabilir (13, 16).

Yapılan çalışmada, östrus belirtileri gözlem yoluyla açıkça belirlenen ineklerde (A3 grubu) gebelik oranı % 76.5 olarak tespit edilirken, östrusta olduğu şüpheli görülen grupta (A1 grubu) bu oran % 53.7 olarak bulunmuş ve aradaki farkın istatistikî olarak önemli olduğu ($p < 0.05$) kaydedilmiştir. Gebelik oranındaki bu azalmanın sebebi, östrusun davranışsal belirtilerinin tam saptanamamasına bağlı olarak tohumlama zamanlarının erken ya da geç olmasından kaynaklanabilir. Nitekim Xu ve ark. (29) östrusun kısa sürmesi ve davranış belirtilerinin hafif şekillenmesi durumunda sadece gözlem yoluyla östrusun doğru tespit edilmesinin zorlaşacağını ve bu durumun gebelik oranını olumsuz yönde etkileyeceğini bildirmiştir.

Üreme programlarında progesteron test kitlerinin kullanılması özellikle östrusun doğru tespit edilmesi ve tohumlamaların yanlış zamanda yapılmasının önlenmesinde önemli rol oynamaktadır (7, 9). Sunulan çalışmada, yapılan progesteron test sonucu progesteron düzeyi orta seviyede (1-2.5 ng/ml) çıkan ineklerin % 15.4 (21/136) oranında olduğu ve bu ineklerin tohumlanması neticesinde elde edilen gebelik oranının önemli derecede düştüğü (% 23.8 5/21) görülmektedir. Bu sonuçlar, Toleng ve ark.'nın (28) tohumlanan inekler içerisinde kan progesteron düzeyi orta seviyede seyredenlerin (1-3 nmol/L) oranının % 11.2 olduğunu bildirdiği ve Nebel ve ark.'larının (21) progesteron düzeyi 1-2.5 nmol/L arasında bulunan östrusları şüpheli hayvanların % 25.4 oranında olduğunu tespit ettiği çalışma sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Proöstrus olarak adlandırılan dönemde gelişen follikülden salgılanan östrojenin etkisiyle östrusta gözlenen bazı davranışsal belirtiler ortaya çıkması hayvan sahipleri tarafından hayvanın östrusta olduğu şeklinde yorumlanabilir. Oysa bu dönemde hayvan çiftleşmeyi kabul etmez. Ancak bu ayırıcı tanı birçok işletmede kabul testi yapılmadığı için kontrol edilememekte ve inekler erken dönemde tohumlanmaktadır. (6, 18). Yapılan çalışmada, östrus belirtilerinin açıkça görülmesine rağmen progesteron seviyesi orta seviyede olan ineklerde (A3-T2 grubu) gebelik oranının

düşük olması bu hayvanların proöstrus döneminde tohumlanmasından kaynaklanabilir. Diğer taraftan bazı ineklerde östrusta olmalarına rağmen davranışsal belirtiler tam olarak ortaya çıkmayabilir (13). Bu gibi hayvanlarda progesteron tayininin yapılması ineğin östrusta olup olmadığının belirlenmesinde oldukça önemli rol oynamaktadır (20). Yapılan çalışmada, östrusun davranışsal belirtilerinin tam olarak belirlenemediği ineklerde (A1 grubu) gebelik oranı % 53.7 olarak tespit edilirken, bu grup içerisinde progesteron test sonucu düşük çıkanların (A1-T3 grubu) gebelik oranının artış gösterdiği (% 70.0) kaydedilmiştir.

McCaughey ve Cooper (20), progesteron düzeyinin özellikle tohumlamanın doğru zamanda yapılıp yapılmadığının belirlenmesinde etkili olduğunu bildirdiği çalışmada, östrusta olduğu saptanan ineklerin % 7.7'sinin progesteron düzeyinin yüksek çıktığını ve bunların hatalı olarak tohumlandığını tespit etmiştir. Nebel (22) ise, östrusların hatalı teşhis edilme oranını % 10.2 olarak bildirirken, progesteron test kitlerinin kullanılmasının özellikle östrusta olmayan ineklerin belirlenmesinde etkili olduğunu ileri sürmektedir. Benzer şekilde, Toleng ve ark.'da (28) tohumlanan ineklerin % 11.6'sının luteal dönemde olduğunu ve yanlış zamanda tohumlandığını bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada da, tohumlanan ineklerin % 5.9'unun progesteron düzeyinin yüksek olduğu tespit edilmiş olup bildirilen çalışma sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

İneklerde foliküler büyüme dalgalar halinde şekillenir. Bunlardan birisi diöstrusun ortalarında meydana gelir. Diöstrusun 10-12. günleri arasında ovaryumlarda bulunan foliküllerden birinin fazla gelişmesine bağlı olarak yüksek düzeyde östrojen salgılanması hayvanlarda yalancı kızgınlık belirtilerinin ortaya çıkmasına yol açar. Siklus ortasında görülen bu durum, hayvanın diöstrus esnasında tohumlanmasına neden olabilir. Oysa ineklerin ovaryumunda aktif bir korpus luteum vardır. Kan progesteron düzeyi yüksek olup büyüyen folikülde ovulasyon şekillenmediği için gebelik şansı yoktur (10, 12). Bu çalışmada da, yapılan test sonucu progesteron seviyesi yüksek bulunan ineklerin hiçbirinden gebelik elde edilememiştir.

Sonuç olarak, ülkemiz koşullarında yetiştiriciler tarafından gözlem yöntemiyle östrusta oldukları belirlenen hayvanların veteriner hekim ve teknisyenler tarafından tohumlanması şeklinde gerçekleştirilen suni tohumlama uygulamaları sonucu elde edilen gebelik oranlarını düşüren sebeplerin başında davranışsal östrusun belirtilerinin hafif şekillenmesine bağlı olarak östrusun doğru tespit edilememesi gelmektedir. Bu nedenle özellikle gözlem yoluyla östrusun davranışsal belirtileri tespit edilemeyen ineklerde, östrus tespitindeki hataların önlenmesi ve gebelik oranının artırılması amacıyla progesteron test kitleri kullanılabilir.

Kaynaklar

1. **Akın Aİ** (1999): *Sığırlarda dölvürimi özellikleri*. Türk Vet Hek Derg, **11**, 22–26.
2. **Akın Aİ** (1998): *Sığırlarda östrusun belirlenmesi*. Türk Vet Hek Derg, **10**, 44–47.
3. **Aksoy M, Alan M, Tekeli T, Semacan A, Çoyan K** (1993): *İnek ve diüvelerde östrus belirleme hataları ve suni tohumlama uygulamasındaki önemi*. Hay Arş Derg, **3**, 28–30.
4. **Alpan O, Yoksunkaya H, Alç K** (1973): *Türkiye'ye ithal edilen Esmer, Holştayn ve Simental sığırlar üzerinde karşılaştırmalı bir adaptasyon çalışması*. Lalahan Zoot Araşt Ens Derg, **16**, 3–17.
5. **Anonim** (2001): *Hayvancılık Özel İhtisas Raporu. 8. Beş Yıllık Kalkınma Planı*. Yayın No: DPT: 2574, ÖİK: 587, Ankara.
6. **Bearden HJ, Fuquay JW, Willard ST** (2004): *Applied Animal Reproduction*. Prentice Hall, New Jersey, USA.
7. **Claycomb RW, Delwicle MJ, Munro CJ, BonDurant RH** (1998): *Rapid enzyme immunoassay for measurement of bovine progesterone*. Biosensors and Bioelectronics, **13**, 1165–1171.
8. **Çoyan K, Aksoy M** (1992): *Östrus tespitinde kullanılan pratik yöntemler*. Hay Arş Derg, **2**, 53–54.
9. **Çoyan K, Özsar S, Güven B, Tekeli T** (1991): *Östrusun tanısı amacıyla pratik süt progesteron testinin kullanımı*. Hay Arş Derg, **1**, 33–35.
10. **Çoyan K, Tekeli T** (1996): *İneklerde Suni Tohumlama. 1. Baskı Bahçivanlar Basım San. A.Ş. Konya*.
11. **De Silva AW, Anderson GW, Gwazdauskas FC, McGilliard ML, Lineweaver JA** (1981): *Interrelationships with estrus behavior and conception in dairy cattle*. J Dairy Sci, **64**, 2409–2418.
12. **Demirci E** (2002): *Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon. Suni Tohumlama ve Androloji Ders Notları Fırat Üniv Veteriner Fak Yayınları No:53 Elazığ*.
13. **Diskin MG, Sreenan JM** (2000): *Expression and detection of estrus in cattle*. Reprod Nutr Develop, **40**, 481–491.
14. **Erb RE, Morrison RA** (1958): *Estrus after conception in a herd of Holstein-Friesian cattle*. J Dairy Sci, **41**, 267–274.
15. **Ferguson JD** (1991): *Nutrition and reproduction in dairy cows*. Vet Clin North Am, **7**, 483–507.
16. **Foote RH** (1975): *Estrus detection and estrus detection aids*. J Dairy Sci, **58**, 248–256.
17. **Gwazdauskas FC, Lineweaver JA, McGilliard ML** (1983): *Environmental and management factors affecting estrous activity in dairy cattle*. J Dairy Sci, **66**, 1510–1514.
18. **Hafez ESE, Jainudeen MR**(2000): *Reproductive cycles: cattle and buffalo*. 159–171. Hafez ESE, Hafez B (Ed), Reproduction in Farm Animals. 7th ed. Williams & Wilkins, Lippincott, USA.
19. **Lopez H, Satter LD, Wiltbank MC** (2004): *Relationship between level of milk production and estrus behavior of lactating dairy cows*. Anim Reprod Sci, **81**, 209–223.
20. **McCaughey WJ, Cooper RJ** (1980): *An assessment by progesterone assay of the accuracy of estrus detection in dairy cows*. Vet Rec, **107**, 508–510.
21. **Nebel RL, Whittier WD, Cassell BG, Britt JH** (1987): *Comparison of on-farm laboratory milk progesterone assays for identifying errors in detection of estrus and diagnosis of pregnancy*. J. Dairy Sci, **70**, 1471–1476.
22. **Nebel RL** (1988): *On-farm milk progesterone tests*. J Dairy Sci, **71**, 1682–1690.
23. **Orihuela A** (2000): *Some factors affecting the behavioural manifestation of estrus in cattle*. App Anim Behav Sci, **70**, 1–16.
24. **Özbeyaz C** (1996): *Hayvansal üretimde sığırcılığın yeri ve önemi*. Türk Vet Hek Derg, **8**, 5–7.
25. **Rae DO, Chenoweth PJ, Giangreco MA, Dixon PW, Bennett FL** (1999): *Assessment of estrus detection by visual observation and electronic detection methods and characterization of factors associated with estrus and pregnancy in beef heifers*. Theriogenology, **51**, 1121–1132.
26. **Sönmez M, Demirci E, Türk G, Gür S** (2005): *Effect of season on some fertility parameters of dairy and beef cows in Elazığ province*. Turk J Vet Anim Sci, **29**, 821–828.
27. **Sturman H, Oltenacu EAB, Foote RH** (2000): *Importance of inseminating only cows in estrus*. Theriogenology, **53**, 1657–1667.
28. **Toleng L, Sonjya H, Yusuf M** (1999): *The use of progesterone RIA to increase efficiency and quality of artificial insemination services of beef cattle in sount sulawesi, Indonesia*. 37–43. Proceedings of a Final Research Co-ordination Meeting, Uppsala, Sweden.
29. **Xu ZZ, McKnight DJ, Vishwanath R, Pitt CJ, Burton LJ** (1998): *Estrus detection using radiotelemetry or visual observation and tail painting for dairy cows on pasture*. J Dairy Sci, **81**, 2890–2896.

Geliş tarihi: 23.06.2006 / Kabul tarihi: 13.10.2006

Yazışma adresi

Mustafa Sönmez

Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı

Elazığ

Effects of different serum types in *in vitro* culture of *in vitro* fertilized rabbit oocytes*

Necmettin TEKİN¹, Serpil SARIÖZKAN², Ongun UYSAL¹, Ergun AKÇAY¹

¹ Department of Artificial Insemination, Faculty of Veterinary Medicine, Ankara University, Ankara, Turkey. ² Lalahan Livestock Central Research Institute, Ankara, Turkey.

Summary: In this study 33 New Zealand White does and 2 bucks were used. After induction of ovulation by human chorionic gonadotrophin (hCG) injection, oocytes were collected by flushing of oviduct. Oocytes and spermatozoa were incubated for 5 hours in Modifie Defined Medium (mDM) for fertilization and cultured in Ham's F-10 medium supplemented with 20 % Fetal Calf Serum (FCS) and 20 % Rabbit Serum (RS) for 18-21 hours, to evaluate the effect of serum in fertilization. Fertilization was assessed by detection of oocytes cleavage rates. The fertilization rates were recorded as 70.4 %, 73.8 %, 60.6 % in oocytes incubated in culture mediums with FCS or RS or without any serum respectively ($p>0.05$). Data were evaluated via Chi-square test. These data suggest that the differences between group averages were not statistically significant, although the fertilization rate in Ham's F-10 with rabbit serum was higher.

Key words: *In vitro* culture, *in vitro* fertilization, oocyte, rabbit, serum.

In vitro fertilize tavşan oositlerinin *in vitro* kültüründe farklı serum tiplerinin etkileri

Özet: Bu çalışmada 33 Yeni Zelanda Beyaz dişi ve 2 erkek tavşan kullanıldı. HCG enjeksiyonu ile ovulasyonun uyarılmasının ardından ovidukt yıkanarak oositler toplandı. Oosit ve spermatozoa fertilizasyon için mDM'da 5 saat inkübe edildi. Kültürde serumun etkisinin araştırılması amacıyla % 20 FCS ve % 20 Tavşan Serumuna katılmış Ham's F-10 mediumunda 18-21 saat kültüre edildi. Fertilizasyon oositlerin bölünme oranları saptanarak tespit edildi. Fertilizasyon oranları FCS veya RS veya hiç serum ilave edilmemiş kültür mediumunda inkübe edilen oositlerde sırasıyla % 70.4, % 73.8, % 60.6 olarak kaydedildi ($p>0.05$). Verilerin değerlendirilmesinde ki-kare testi kullanıldı. Tavşan serumu ilave edilmiş olan Ham's F-10 mediumunda fertilizasyon oranının daha yüksek olmasına karşın grup ortalamaları arasında istatistiki açıdan fark yoktur.

Anahtar sözcükler: *In vitro* fertilizasyon, *in vitro* kültür, oosit, serum, tavşan.

Introduction

Protein supplementation of culture medium is beneficial for embryo development (5). A fixed nitrogen source is essential for implantation embryo development whether this is provided by aminoacids, albumin, or serum. Suboptimal culture conditions can block development. Modifying culture conditions can lead the embryos to develop through this block (10). Serum and serum albumin are two commonly used protein sources in media for the *in vitro* culture of mammalian embryos (11). It is thought to induce chemical alterations with possible detrimental implications for the culturing of embryos (2, 11). Serum was not effective in the formation of the male pronucleus. However, serum contains a low molecular weight, heat stable factor(s) that acts on the oocyte to stimulate cumulus expansion (7).

Serum is an undefined, or in some cases semidefined biological product that most likely provides other physiological active materials such as energy substrates, amino acids and vitamins, all of which may act in concert with growth factors to enhance embryo development *in vitro* (19). Serum has a biphasic effect, suppressing the first cleavage but enhancing morula compaction (3). Protein effect is more evident in a latter stage of embryo development. Serum not only stimulates blastocyst development, but also increases the percentage of hatched blastocysts (19). The BME/ Ham's F10 medium including 10% newborn calf serum is highly supportive of rabbit embryonic development following *in vitro* fertilization, relatively small changes in medium composition can have major effects (9). Tajik et al. (17) stated that different protein supplements might affect spermatozoa penetration in cattle *in vitro* fertilization and

* This research was funded by Scientific Research Projects of Ankara University (Project Number: 20010810027).

protein additive was not required when the oocytes were enclosed in cumulus cells, however, it was required if they were cumulus free.

The aim of this study was to investigate the effect of the fetal calf serum and rabbit serum added to culture medium in *in vitro* culture of rabbit oocytes fertilized *in vitro*.

Materials and Methods

Animals

In this study, 33 New Zealand White does (6-12 months) were used to collect oviductal oocyte and 2 New Zealand White bucks (10-12 months) were used to collect semen. The rabbits were fed rabbit chow and provided with water ad libitum. The female rabbits were taken into individual cages with the aim of preventing pseudopregnancy, 21 days before being used.

Media and culture conditions

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS, D-5773, Sigma) supplemented with 3 mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA, A-9418, Sigma) was used in flushing of oviducts and in the initial washings of the collected oocytes. Modified Defined Medium (mDM) was used for the selection of motile spermatozoa. Capacitating of motile spermatozoa was carried out in mDM containing 20 µg/ml heparin (H-3149, Sigma). The rabbit serum was prepared by allowing whole blood to clot, decanting off the serum, centrifuging at 3000 rpm and heating to 56°C for 30 min. Oocytes and spermatozoa were coincubated for fertilization procedure in mDM. *In vitro* culture was carried out in Nutrient Mixture F10 (N-6635, Sigma). 20 % FCS (F-9665, Sigma) or 20 % RS were added to medium on the using day. All mediums were equilibrated for minimum 1 hour before usage at 38°C in a 90 % humidified incubator in 5 % CO₂ in air.

Collection of oocytes

For superfolliculation of does, 75 IU Pregnant Mare Serum Gonadotrophin (PMSG, Folligon, Intervet) was given intramuscularly 3 times, 24 hours intervals. In order to induce ovulation, 100 IU HCG (Pregnyl, Organon) was applied intravenously 24 after the last PMSG injection. Under general anesthesia, oviducts were flushed and oocytes were collected 13-15 hours after the application of hCG. The oocytes were washed twice in PBS supplemented with 3mg/ml BSA. Collected oocytes were examined in stereo microscope and oocytes which have regular cumulus cells and homogenous ooplasm were selected (Figure 1).

Preparation of sperm

Semen was collected by artificial vagina from bucks and then the gel part was removed. Swim-up method was

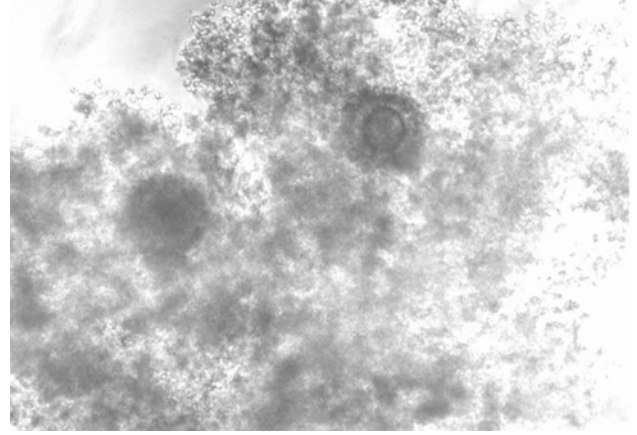


Figure 1. Rabbit oocytes with cumulus cells
Şekil 1. Kumulus hücreli tavşan oositleri

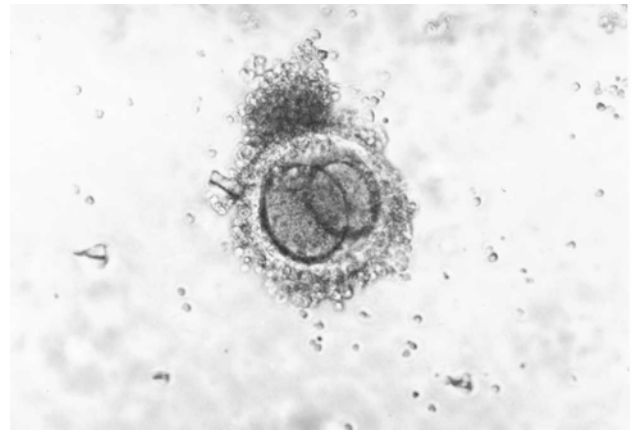


Figure 2. Two-cell stage rabbit ova
Şekil 2. 2 hücreli tavşan ovumu

applied with the aim of selecting motile spermatozoa. Sperm was incubated for 15 minutes in CO₂ incubator by being diluted with capacitating medium so as to be 10⁵/ml in fertilization medium.

In vitro fertilization

Selected oocytes were washed twice in mDM before being taken into fertilization medium. 5-10 oocytes were placed separately into each micro drop. Oocytes and spermatozoa were incubated for 5 hours in a 90 % humidified incubator at 38°C in 5 % CO₂ in air. At the end of this period, oocytes taken from the fertilization medium were transferred to Ham's F 10 culture medium supplemented by 20 % FCS or 20 % RS or medium without any serum and oocytes were cultured for 18-21 hours in 5 % CO₂.

Assessment of fertilization

Fertilization was assessed by detection of oocytes cleavage rates. After the culture period, the embryos were examined by taking into consideration their development conditions, homogeneity of cleavage, sizes

of blastomers, healthy appearances of cytoplasm and degenerative changes in the microscopic examinations (Figure 2). According to these criterias, it was accepted that normal cleavage was observed and fertilization was realized in ova that have reached two-cell stage with regular blastomers (1).

Results

Collected oocytes

At the end of superovulation applications, total 229 unruptured follicles (6.969 ± 0.91 per animal) at various development phases and 289 ovulation points (8.697 ± 1.02 per animal) were counted in the ovaries. Total 236 oocytes (7.121 ± 0.84 per animal) were obtained from 33 does as a result of oviducts flushing. In vivo matured 203 out of 236 oocytes collected were selected. Oviducts flushing after superovulation and observed results in ovaries are given in Table 1.

Table 1. Oviducts flushing after superovulation and observed results in ovaries.

Tablo 1. Süperovulasyon sonu ovidukt yıkaması ve ovaryum-larda gözlenen sonuçlar.

Animals	Unruptured follicle	Corpora hemoragicum	Collected oocytes
(n)	33	229	236
($X \pm Sx$)	33	$6,969 \pm 0,91$	$7,121 \pm 0,84$

In vitro fertilization rates

At the end of incubation period, the fertilization rate was recorded as 70.4 % (50/71), and 73.8 % (45/61), 60.6 % (43/71) in oocytes incubated in culture mediums with FCS or RS or without any serum, respectively. It was observed that addition of FCS and RS increased in *in vitro* fertilization rate of *in vivo* matured rabbit oocytes, however, it was determined that this positive effect was not statistically significant ($p > 0.05$). *In vitro* fertilization results in rabbit oviductal oocytes are given in Table 2.

Table 2. *In vitro* fertilization results of rabbit oviductal oocytes
Tablo 2. Tavşan oviduktal oositlerinin *in vitro* fertilizasyon sonuçları

Medium Type	Oocyte		
	Selected (n)	Fertilized (n)	(%)
Ham's F-10+FCS	71	50	70,4
Ham's F-10	71	43	60,6
Ham's F-10+RS	61	45	73,8
Grand total	203	138	68,0

($\chi^2=2,92$, $df=2$, $p > 0,05$)

Discussion and Conclusion

In this study, RS was better than FCS as a protein source for supporting rabbit embryo development during *in vitro* culture. Although the fertilization rate in Ham's F-10 supplemented with RS was higher, the differences between group averages were not statistically significant. The rabbit embryos were capable of being exposed to 3 or more cleavage without any energy source addition to the medium, because of having endogenous energy sources (4,8). Sellens et al. (16), stated that amino acid transport system was required in order to be able to use free amino acids in the culture medium of especially blastocyst stage embryo and that embryonic growth at this phase depended on exogenous protein source.

Saito et al. (15), stated that in the 24-hours culture in Ham's F-10 medium of mouse embryos, there was no difference between medium with and without serum in embryonic development, moreover, it was required to ensure at least 10 % serum concentration in culture in order to obtain optimal result. It was determined that blood serums of some types (fowl, goat, sheep, cattle, human) carried an oviduct factor having a characteristic inciting embryonic development while some of them (rabbit, horse, dog, guinea pig, rat) didn't carry this factor (6). Rabbit embryos were hard depending on the zona pellucida thickness, hatching and existence of mucin layer and used bovine serum and rabbit serum in culture thereof from 2-4 cell to blastocyst stage. It was stated that development to morula stage was higher when bovine serum was used in culture of rabbit embryos, however, development to blastocyst was significantly higher when rabbit serum was used. Both rabbit and bovine serum are capable of supplying the necessary requirements for 2 and 4 cell stage rabbit ova to develop into a high proportion of blastocysts (14).

Al-Hasani et al. (1), obtained 82% cleavage rate following *in vitro* culture in Ham's F-10 medium including 20% FCS of follicular oocytes that they aspirated from ovaries following hCG application in rabbits. These results were higher than our results. The difference can be emerged from the use of *in vivo* capacitated spermatozoa by researchers stated above. Keefer et al. (9), used tubal ova and *in vivo* capacitated rabbit spermatozoa in media with heat-treated 10% newborn calf serum to obtain *in vitro* culture of 92% morulae stage embryo. Zeng et al. (20), obtained 29.3% cleavage rate following newly ejaculated rabbit spermatozoa were used to fertilize superovulated oocytes after capacitation *in vitro* with isotonic defined medium including heparin. Tekeli et al (18), observed *in vitro* fertilization rate in 47/ 236 (19.91) rabbit tubal ova in Brackett's medium supplemented 20% rabbit serum and 10% serum solution. Mills et al. (13) obtained cleavage

rate as 52.3% for follicular rabbit ova when the defined medium with 20% rabbit serum. Our results were higher than results stated above. The difference can be emerged from *in vivo* matured rabbit ova used. Menezo et al. (12), tried the medium to some part of which they added human heart serum and human serum albumin to the other part, during human *in vitro* fertilization, embryo culture and embryo transfer. It was stated that there was no difference during *in vitro* fertilization, embryo culture and embryo transfer between both mediums, 16% pregnancy rate was obtained in both mediums, however, cleavage rate was better in medium to which serum was added. It was stated that serum had no beneficial effect during human *in vitro* fertilization and embryo transfer and that serum addition should be avoided to the medium to be used from the aspect of homogeneity of results.

As a result, one of the important factor that effects *in vitro* embryo development is contents of culture medium. In this study it was indicated that serum addition to culture medium in *in vitro* embryo development has positive effect however, this effect at 2 cell stage embryo after fertilization was not statistically significant.

References

1. **Al-Hasani S, Trotnow CS, Hahn J** (1986): *In vitro* fertilization and embryo transfer of pre-ovulatory rabbit oocytes. *Eur J Obstet Gyn Reprod Biol*, **21**, 187-195.
2. **Bavister BD** (1995): *Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts*. *Hum Reprod Update*, **1**, 91-148.
3. **Bavister BD, Rose-Hellekant TA, Pinyopummintr T** (1992): *Development of in vitro matured/ in vitro fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media*. *Theriogenology*, **37**, 127-146.
4. **Brinster RL** (1970): *Culture of two cell rabbit embryos to morulae*. *J Reprod Fertil*, **21**, 17- 22.
5. **Carolan C, Lonergan P, Van-Langendonck A, Mermillod P** (1995): *Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization in vitro*. *Theriogenology*, **4**, 1115-1128.
6. **Chang MC** (1949): *Effect of heterologous sera on fertilized rabbit ova*. *J Gen Physio*, **32**, 291-295.
7. **Daen FP, Sato E, Nakayama T, Toyoda Y** (1995): *Serum factor(s) stimulating cumulus expansion in porcine oocyte-cumulus complexes matured and fertilized in vitro*. *Cell Struct Funct*, **20**, 223-231.
8. **Kane MT** (1987): *Minimal nutrient requirements for culture of one cell rabbit embryos*. *Biol Reprod*, **37**, 775-778.
9. **Keefer CL, Fayrer-Hosken RA, Brown LM, Brackett BG** (1988): *Culture of in vitro fertilized rabbit ova*. *Gamete Res*, **20**, 431-436.
10. **Loutradis D, Drakakis P, Kallianidis K, Sofikitis N, Kallipolitis G, Milingos S, Makris N, Michalas S** (2000): *Biological factors in culture media affecting in vitro fertilization, preimplantation embryo development and implantation*. *Ann of New York Ac of Sci*, **900**, 325-335.
11. **Maurer HR** (1992): *Towards serum- free, chemical defined media for mammalian cell culture*. 15-46. In: RI Freshney (Ed), *Animal Cell Culture: A Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford.
12. **Menezo Y, Testart J, Perrone D** (1984): *Serum is not necessary in human in vitro fertilization, early embryo culture and transfer*. *Fertil Steril*, **42**, 750- 755.
13. **Mills JA, Jeitles GG, Brackett BG** (1973): *Embryo transfer following in vitro fertilization of rabbit ova*. *Fertil Steril*, **24**, 602-608.
14. **Onuma H, Maurer RR, Foote RH** (1968): *In vitro culture of rabbit ova from early cleavage stages to the blastocyst stage*. *J Reprod Fertil*, **16**, 491- 493.
15. **Saito H, Berger T, Mishell DR, Marrs RP** (1984): *Effect of variable concentration of serum on mouse embryo development*. *Fertil Steril*, **41**, 460-464.
16. **Sellens MH, Stein S, Sherman M** (1981): *Protein and free aminoacid content in preimplantation mouse embryos and in blastocysts under various culture conditions*. *J Reprod Fertil*, **61**, 307- 315.
17. **Tajik P, Niwa K, Murase T** (1993): *Effect of different protein supplements in fertilization medium on in vitro penetration of cumulus- intact and cumulus free bovine oocytes matured in culture*. *Theriogenology*, **40**, 949-958.
18. **Tekeli T** (1984): *Investigations on in vitro fertilization of rabbit ova*. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, **31**, 186-196.
19. **Wang S, Liu Y, Holyoak GR, Bunch TD** (1997): *The effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on the development of pre- and postcleavage- stage bovine embryos cultured in modified CR2 and M199 media*. *Anim Reprod Sci*, **48**, 37-40.
20. **Zeng SM, Zhu SE, Wang YS, Chen XJ, Zhang ZC, Chen YF** (1999): *An efficient method for in vitro fertilization in rabbits*. *Anim Biotechnol*, **10**, 15-23.

Geliş tarihi: 06.06.2006 / Kabul tarihi: 28.11.2006

Address for correspondance

Doç.Dr. Ongun Uysal
Department of Artificial Insemination,
Faculty of Veterinary Medicine,
Ankara University, 06110 Dışkapı,
Ankara, Turkey.
e-mail: onuysal@veterinary.ankara.edu.tr