

Keçilerde Progesteron Destekli Co-synch Senkronizasyon Metodu ve Tohumlama Dozunun Gebelik Oranı Üzerine Etkisi

Burcu ÜSTÜNER¹ Melih ERTÜRK¹ Selim ALÇAY¹ Bilginer TUNA²
Hakan ÜSTÜNER³ Zekariya NUR¹

Geliş Tarihi: 19.02.2010

Kabul Tarihi: 24.06.2010

Özet: Bu çalışma, medroksiprogesteron asetat (MAP) emdirilmiş sünger ile destekli co-synch protokolünün keçilerde sabit zamanlı suni tohumlama amacıyla kullanılabilirliğini belirlemek amacıyla gerçekleştirildi. Çalışmada, 45kg'ın üzerinde 25 baş sağmal Saanen ırkı keçi kullanıldı. Östrusun başlangıcı ve süresi arama tekeleri (n=3) ile belirlendi. Keçilerden 5 tanesi 60×10^6 donmuş motil spermatozoa içeren payetler ile tohumlanırken 20 tanesi ise $11,5 \times 10^6$ donmuş motil spermatozoa içeren payetler ile ikinci GnRH enjeksiyonu sırasında sabit zamanlı (intra-servikal ya da trans-servikal) tohumlandı. Sünger çıkarıldıktan sonraki 78 saat içinde keçilerin %100'ünde östrus belirlendi. Sünger çıkarıldıktan sonra östrusun başlangıcı, sonlanması ve süresi sırasıyla; 37.2 saat, 69.1 saat ve 31.9 saattir. Her iki tohumlama dozu arasında (60×10^6 motil spermatozoa/payet ve $11,5 \times 10^6$ motil spermatozoa/payet) sırasıyla geri dönmeme (NRR₃₀) ve gebelik oranı (%60 ve %25) ve (%40 ve %10) bakımından istatistiksel fark bulunmamıştır (P>0.05).

Sonuç olarak aşım sezonu içinde progesteron emdirilmiş intra vaginal sünger ile desteklenen co-synch protokolünün keçilerde östrusları senkronize etmek amacıyla kullanılabilirliği, progesteron kaynağının östrusları öne aldığı, östrusları daha kısa bir zaman diliminde toplulaştırdığı, sabit zamanlı tohumlamalarda yüksek oranda motil spermatozoa kullanımının daha uygun olduğu kanısına varılmıştır. Yüksek dozda (250×10^6 - 500×10^6 motil spermatozoa/payet) motil spermatozoa içeren tohumlama dozları kullanılarak, folliküler gelişmenin ve ovulasyonun ultrason ve hormon bulguları ile izlenerek en uygun sabit zamanlı tohumlama zamanının belirlenmesi ile fertilité sonuçları artırılabilir. Bu fikirlerin daha geniş saha çalışmaları ile doğrulanması gerekir.

Anahtar Kelimeler: Keçi, senkronizasyon, tohumlama dozu, co-synch, fertilité.

The Effect of Progesterone-Supplemented Co-synch Sencronization Metod and Insemination dose on Goat's Conception Rate

Abstract: This study was assessed to monitor the efficiency of co-synch synchronization protocol (combined with the medroksiprogesteron asetat containing vaginal sponge) on the estrous synchronization, and to generate fixed-time insemination in goats during the breeding season. The co-synch synchronization was applied to lactating Saanen doe (n=25) over than 45kg. Onset and duration of estrous (immobility reflex) were determined with teaser bucks (n=3). While five does were inseminated with 60×10^6 motile spermatozoa/straw and the remains (n=20) were inseminated with $11,5 \times 10^6$ motile spermatozoa/straw intra-cervically or trans-cervically with frozen thawed Saanen semen at pre-determined times (at the second GnRH injection). Estrus was identified in 100% at 78 h after sponge removal. The estrous onset and termination after sponge removal, and estrous duration were 37.2h, and 69.1h, and 31.9h respectively. There are no significant difference between two insemination dose (60×10^6 motile spermatozoa/straw, $11,5 \times 10^6$ motile spermatozoa/straw) with respect to NRR₃₀ (60% and 25%) and pregnancy rates (40% and 10%), respectively (P>0.05).

¹ Dölerme ve Suni Tohumlama A.B.D., Bursa, TÜRKİYE. bbaspinar@uludag.edu.tr

² Doğum ve Jinekoloji A.B.D., Bursa, TÜRKİYE.

³ Zootekni A.B.D., Bursa, TÜRKİYE.

During the breeding season progesterone supplemented co-synch protocol were effective for estrous synchronization in doe. Also progesterone supplementation shortened the estrous onset and duration after sponge removal. Fertility result may be improved by increasing number of post-thaw motile spermatozoa (250×10^6 - 500×10^6 motile spermatozoa/straw) of insemination dose and also by determining the best time for fixed time insemination by monitoring follicular development and ovulation with ultrasound and hormone analyzing. Confirmation of this claim may, however, require a larger scale field study.

Key Words: Goat, synchronization, insemination dose, co-synch and fertility.

Giriş

Suni tohumlama, hayvancılık alanında genetik iyileşmeyi hızlandıran biyoteknolojik yöntemlerin başında gelir¹². Keçilerde, dondurulmuş sperma kullanılarak yapılan geniş çaplı suni tohumlama çalışmalarında östrus ve ovulasyonların senkronizasyonu, işçilik, yönetim, ve tedavi masrafları minimize edilebilir²³. Son yıllarda, hormon kullanılarak östrusları senkronize edilen keçilerde 5°C'ye soğutulmuş veya azot buharında dondurulmuş sperma kullanımı ile kabul edilebilir fertilitate sonuçları elde edilmiştir¹⁶.

Ülkemizde keçilerde suni tohumlama uygulamaları sığırcılık alanında olduğu kadar yaygın değildir. Yapılan çalışmaların çoğu akademik çalışma düzeyinden ileriye gidememiştir^{5-7,19,20}. Yurdumuzda küçük baş hayvanlarda suni tohumlama uygulamaları yetişmiş personel sayısının sınırlı olması ve olumsuz coğrafi koşullar nedeniyle istenilen düzeye ulaşamamıştır⁴. Bazı Avrupa ülkelerinde olduğu gibi suni tohumlama metotlarının standardize edilerek başarı oranını artırmaya yönelik çalışmaların sahaya aktarılması gerekmektedir¹³. Ayrıca küçükbaş hayvanlarda suni tohumlamanın yaygınlaştırılması; uygulama maliyetlerinin düşürülmesi ve veteriner hekimlere küçükbaş hayvanların suni tohumlama konusunda eğitimlerin verilmesi ile mümkün olabilir.

Keçilerde östrus senkronizasyonu amacıyla progestagen emdirilmiş intravaginal süngerler ve CIDR (Controlled Internal Drug Release) adı verilen silicone elastomerler aşım sezonu içinde ve aşım sezonu dışında yaygın şekilde kullanılmaktadır^{10,12,16,27}. Progesterona dayalı bu çalışmalar östrusu senkronize ederken folliküler dalgayı dolayısıyla ovulasyonu senkronize edememektedir^{10,12}. Pursley ve ark.²² tarafından ineklerde folliküler dalganın kontrolü amacıyla uygulanan "Ovsynch" protokolü olarak bilinen GnRH-prostoglandin F2 α -GnRH metodunun keçilerde de uygulanabileceği bildirilmiştir¹³.

Co-synch senkronizasyon metodu ovsynch gibi ineklerde ovulasyonları senkronize etmeye yönelik bir protokoldür. Ovsynchten

farklı olarak, co-synch protokolünde 2.GnRH enjeksiyonu ile birlikte sabit zamanlı bir tohumlama yapılmaktadır¹¹. Ovsynch ve co-synch protokollerinde GnRH-PGF2 α arasındaki 7 günlük sürede progesteron kaynağı kullanarak PGF2 α enjeksiyon öncesi östrusların oluşumu engellenebilmekte ve folliküler gelişimin senkronizasyonu sağlanabilmektedir^{11,15,25}.

Sunulan çalışmada; ineklerde uygulanan progesteron destekli co-synch protokolünün keçilerde uygulanabilirliğinin ortaya konması ve farklı tohumlama dozları kullanımı ile yapılan sabit zamanlı suni tohumlama sonrası elde edilen fertilitate sonuçlarının karşılaştırılması amaçlanmaktadır.

Materyal Metot

Araştırma Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Merkezi Keçi Yetiştirme Ünitesi'nde ve aşım sezonu içinde (Eylül-Aralık) gerçekleştirildi. Bu çalışmada klinik olarak sağlıklı ve bir kez doğum yapmış, 2-4 yaşlı, ağırlıkları 45-60 kg 25 baş Saanen ırkı keçi ve östrusları teşhis etmek için 3 adet Saanen ırkı arama tekesi kullanıldı. Arama tekelere östrus taramalarında değişimli olarak kullanıldı. Çalışmada kullanılan keçilerin beslemesinde işletmede uygulanan besleme programı izlendi.

Keçilere 0. gün i.m. olarak 0.004 mg GnRH analogu Buserelin (1 ml Receptal[®], Intervet) enjeksiyonu ile birlikte 60 mg medroksiprogesteron asetat içeren intravaginal sünger (Esponjavet[®], HIPRA, İspanya) uygulandı. Çalışmanın 7. gününde PGF2 α analogunun (1ml Juramete[®]) enjeksiyonu yapılarak süngerler çekildi. Keçilere 9. günde 0.004 mg Buserelinin 2. enjeksiyonu yapılarak intraservikal veya intra-uterin olarak 1 defa transservikal tohumlama yapıldı. Çalışmada kullanılan 20 baş keçi $11,5 \times 10^6$ motil donmuş spermatozoa içeren 0.25 ml'lik payetler ile tohumlanırken, 5 baş keçi ise 60×10^6 motil donmuş spermatozoa içeren 0.25 ml'lik payetlerle tohumlandı.

Östrus başlangıcını ve süresini tespit edebilmek amacıyla sünger çekildikten sonra 84.

saate kadar 6 saat aralıklarla yarım saat süreyle arama tekesi kullanarak östruslar tarandı. Teke- nin altında sabit duran keçiler östrusta olduğu kabul edilerek kayıt edildi. Östrus başlangıcı hayvanın arama tekesinin ilk atlamasına izin verip hareket etmemesi olarak kabul edilirken, bitişi ise arama tekesini ret ettiği ilk tarama kabul edildi. Geri dönmeme (NRR₃₀) oranını hesaplamak için tohumlamadan 17-30. günler arasında sabah ve akşam östruslar taranarak kızgın olan keçiler kaydedildi. Tohumlamadan 1 ay sonra gebelik oranlarını saptamak için 4-8 MHz endocavital proba ultrason muayenesi yapıldı.

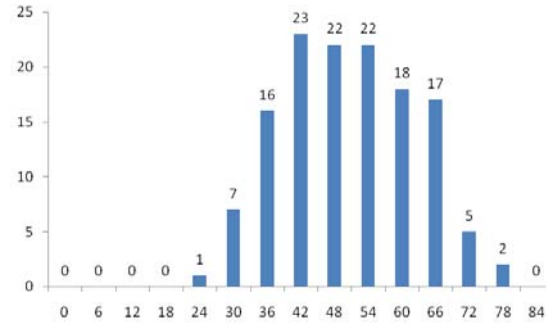
Çalışmada farklı doz kullanarak yapılan tohumlamalardan elde edilen geri dönmeme ve gebelik oranlarının karşılaştırılmasında instat programından faydalanılarak “Fisher’in Chi-square testi” kullanıldı.

Bulgular

Progesteron destekli co-synch senkronizasyon metodunda süngerin çekilmesinden sonraki 78 saat içinde çalışmada kullanılan hayvanların tümü (%100) östrus göstermiştir. Çalışmada kullanılan 25 baş keçinin senkronizasyonu sonrası 84 saatlik zamana diliminde arama teke- leri ile yapılan kızgınlık taramalarında teke kabul refleksine göre dağılımları Şekil 1’de gösterilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi kızgınlıklar süngerin çekilmesinden 36. saat ile 66. saatler arasında yoğunlaşarak 42-54. saatlerde en yüksek orana ulaşmıştır. Yapılan senkronizasyon metodunda östrusların sünger çekilmesinden ortalama 37.2 saat sonra başladığı, 31.9 saat sürdüğü ve 69.1 saat sonra bittiği kaydedildi. Çalışmada 60×10^6 ve $11,5 \times 10^6$ motil spermatozoa içeren payetlerle yapılan tohumlamalardan elde edilen NRR₃₀ sırasıyla %60 ve %25; gebelik oranları ise sırasıyla %40 ve %10 olarak belirlendi.

Tartışma ve Sonuç

Memeli spermasının dondurulması, hayvancılık sektöründe özellikle genetik değerlendirme ve seleksiyon programlarının yürütülmesinde çok sayıda avantaj sağlamaktadır²⁶. Çoğu memelilerde olduğu gibi, donmuş teke sperması ile yapılan tohumlamalardan elde edilen fertilitte sonuçları, taze sperma ile karşılaştırıldığında oldukça düşüktür^{8,14,16,21,23}. Bazı türlerde fertilitedeki bu düşüklük, tohumlama dozunun artırılması ile az da olsa yükseltilebilmektedir²⁶.



Şekil 1:

25 baş keçinin 84 saatlik zamana dilimindeki kızgınlık dağılımları

Figure 1:

The estrous distribution of 25 goats in 84 hours.

Keçilerde östrusun senkronizasyonu ve suni tohumlama amacıyla progesteron emdirilmiş sünger, CIDR gibi çok sayıda yöntem kullanılmıştır^{10,12,16,27}. Donmuş sperma ile transservikal veya intra-uterin yolla yapılan suni tohumlama sonrası elde edilen gebelik oranları %3-%70 arasında değişkenlik göstermektedir³. Fertilitedeki bu geniş varyasyon spermanın dondurma yöntemi, payetteki motil spermatozoa sayısı, kullanılan senkronizasyon metodu, tohumlama tekniği ve tohumlama zamanına bağlanabilir^{2,18,24}.

Progesteron destekli co-synch senkronizasyon metodunda sünger çekildikten sonraki 78 saat içinde çalışmaya alınan hayvanların tümü (%100) teke kabul refleksi göstermiştir. Bu bulgu progesteron destekli ovsynch metodunu kullanan Nur ve ark.²⁰ ve Nak ve ark.¹⁹ ile uyumlu iken Holtz ve ark.¹³'ün progesteron kullanmaksızın yaptıkları ovsynch senkronizasyon çalışmasından daha yüksek bulundu. Progesteron uygulamalarının hipofizden gonadotropinlerin salınımını baskıladığı, bu baskının ortadan kaldırılmasıyla gonadotropin salınımının normalden daha yüksek olduğu bildirilmiştir^{1,10,17}. Sunulan çalışmada elde edilen teke kabul refleksi oranının yüksek olması progesteronun gonadotropinlerin salınımı üzerindeki bu etkisiyle açıklanabilir.

Senkronizasyon sonrası östrus başlangıcı ve süresi bakımından çebiçler ve keçiler arasında farklılıklar bulunmaktadır²⁰. Nur ve ark.²⁰'nin gerçekleştirdiği progesteron destekli co-synch çalışmasında östrusların ortalama 31. saatte başladığı ve 34 saat sürdüğü bildirilmiştir. Sunulan çalışmada östrusların sünger çekildikten ortalama 37 saat sonra başladığı ve 32 saat sürdüğü belirlendi. Nak ve ark.¹⁹'ün çalışması

ile karşılaştırıldığında östrusların daha geç başladığı görülürken östrus uzunluğu benzerlik göstermektedir. Holtz ve ark.¹³'ün progesteron kullanmaksızın yaptıkları çalışmada teke kabul refleksine göre östrusların ortalama 45. saatte başladığı ve 40 saat sürdüğü bildirilmiştir. Sunulan çalışmada progesteronun östrusları daha erken başlattığı ve daha fazla toplulaştırdığı gözlemlenmiştir.

Uygulanan senkronizasyon yöntemi, tohumlama yöntemi, tohumlama zamanı ve tohumlamada kullanılan motil spermatozoa sayısı gebelik oranını etkiler^{18,26}. Çalışmada 60×10^6 ve $11,5 \times 10^6$ motil spermatozoa içeren payetlerle yapılan tohumlamalardan elde edilen NRR₃₀ sırasıyla %60 ve %25 gebelik oranları ise sırasıyla %40 ve %10 olarak belirlendi. Sunulan çalışmada tohumlama dozunun artırılmasıyla NRR₃₀ ve gebelik oranlarının arttığı gözlemlendi. Nur ve ark.²⁰ $11,5 \times 10^6$ motil spermatozoa içeren tohumlama dozu kullanarak çepiçlerde yaptıkları progesteron destekli co-synch çalışmasında laparoskopik tohumlama sonrası elde ettikleri NRR₃₀ ve gebelik oranları sırasıyla %62 ve %38'dir. Fertilitide elde ettikleri bu farklılığın tohumlama yöntemi ve kullanılan hayvanların daha doğum yapmamış olmasından kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Holtz ve ark. (13) özel bir serviks pensu yardımıyla 200 milyon spermatozoa içeren tohumlama dozu kullanarak yaptıkları tohumlama sonrasında %58 gebelik oranı elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bu bulgu kullanılan tohumlama tekniğinin, tohumlama dozunun ve tohumlama zamanının fertilitite üzerine olan etkisi ile açıklanabilir.

Küçük ruminantlarda senkronizasyon amacıyla kullanılan progesteron kaynağı östrus ve fertilitite oranını etkilemektedir⁹. Nak ve ark.¹⁹ sunulan çalışmada belirtilen tohumlama dozunun kullanarak progesteron (FGA) destekli bir senkronizasyon çalışmasında yaptıkları trans-servikal veya intra-servikal suni tohumlama sonrası %27 gebelik oranı elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bu farklılığın tohumlama zamanı ve progesteron kaynağının farklı olmasından ileri geldiği düşünülmektedir.

Karatzas ve ark.¹⁴ Saanen keçilerinde progesteron içeren süngerlerin çekilmesinden 50 ile 55 saat sonra $500-600 \times 10^6$ spermatozoa içeren tohumlama dozu kullanarak yaptıkları tohumlama sonrası %46.8 gebelik oranı elde etmişlerdir. Sunulan çalışmada daha düşük oranda motil spermatozoa (60×10^6 motil spermatozoa/payet) ile yapılan tohumlama sonrası elde edilen gebelik oranı (%40) ile benzer

olduğu belirlenmiştir. Progesteron destekli co-synch uygulamaları sünger kullanarak yapılan senkronizasyon metodlarıyla karşılaştırıldığında; co-synch uygulamasının düşük tohumlama dozu (60×10^6 motil spermatozoa/payet) kullanılsa bile fertilitite oranlarını arttırdığı söylenebilir.

Sonuç olarak

Co-synch protokolünde; progesteron kaynağının kullanılmasının östrusların daha erken başlamasına ve toplulaşmasına neden olduğu belirlenmiştir. Donmuş sperma kullanarak yapılacak tohumlamalarda; $11,5 \times 10^6$ motil spermatozoa içeren tohumlama dozunun yetersiz olduğu, sayının artırılması ile gebelik oranının daha da artırılacağı düşünülmektedir. Ayrıca sabit zamanlı tohumlama uygulamaları sonrası daha yüksek gebelik oranı elde etmek için daha geniş ve kapsamlı çalışmaların yapılması gerektiği kanısına varılmıştır.

Kaynaklar

1. Bretzlaff, K.N., Madrid, N., 1989. Clinical use of norgestomet ear implants or intravaginal pessaries for synchronization of estrus in anestrus dairy goats. *Theriogenology*, 31, 419-423.
2. Cameron, A.W.N., Batt, P.A., 1991. PMSG may directly stimulate ovulation in female goats. *Anim.Reprod.Sci*, 25, 233-239.
3. Corteel, J.M., 1973. Artificial insemination in goats: physiological basis, present and future (Fransızca). *Word Rev.Anim.Prod*, 9, 73-99.
4. Daşkın, A., Tekin N., 1996. The effect of egg-yolk on the quality of frozen Angora buck semen. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 20, 395-398.
5. Dogan, I., Nur, Z., Gunay, U., Soylu, M.K., Sonmez, C., 2004. Comparison of fluorogestone and medroxyprogesterone intravaginal sponges for oestrus synchronization in Saanen does during the transition period. *South African Journal of Animal Science*, 34 (1), 18-22.
6. Dogan, I., Nur, Z., Gunay, U., Sagirkaya, H., Soylu, M.K., Sonmez, C., 2005. Estrous synchronization during the natural breeding season in Anatolian black does. *Vet.Med-Czech*, 50 (1), 33-38.
7. Dogan, I., Konyali, A., Gunay, U., Yurdabak, S., 2008. Comparison of the effect of cronolone sponges and PMSG or cloprostenol on estrous induction in Turkish Saanen goats. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 11 (1), 29-34.
8. Dorado, J., Rodriguez, I., Hidalgo, M., 2007. Cryopreservation of goat spermatozoa:

- comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. *Theriogenology*, 68, 168-177.
9. Evans, G., Maxwell, W.M.C., 1987. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Butterworth, London.
 10. Gordon, I., 2004. Controlled Reproduction in Sheep&Goats. CABI Publishing, USA.
 11. Greary, T. W., Whittier, J. C. , Hallford, D. M., MacNeil, M. D., 2001. Calf removal improves conception rates to the Ovsynch and Co-Synch protocols. *J. Anim. Sci.*, 79, 1-4.
 12. Hafez, E.S.E, Hafez, B., 2000. Reproduction in Farm Animals, 7th Ed., Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, Penny.
 13. Holtz, W., Sohnrey, B., Gerland, M., Driancourt, M.-A., 2008. Ovsynch synchronization and fixed-time insemination in goats. *Theriogenology*, 69, 785-792.
 14. Karatzas, G., Karagiannidis, A., Varsakeli, S., Brikas, P., 1997. Fertility of fresh and frozen-thawed goat semen during the nonbreeding season. *Theriogenology*, 48, 1049-1059.
 15. Kojima, F. N., B. E. Salfen, J. F. Bader, W. A. Ricke, M. C. Lucy, M. F. Smith, and D. J. Patterson, 2000. Development of an estrus synchronization protocol for beef cattle with short-term feeding of melengestrol acetate: 7-11 synch. *J. Anim. Sci.*, 78, 2186-2191.
 16. Lebouf, B., Restall, B., Salamon, S., 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, 62, 113-141.
 17. Leboeuf, B., Forgerit, Y., Bernelas, D., Pougard, J.L., Senty, E., Driancourt, M.A., 2003. Efficiency of two types of vaginal sponges to control onset of oestrus , time of preovulatory LH peak and kidding rate in goats inseminated with variable numbers of spermatozoa. *Theriogenology*, 60, 1371-1378.
 18. Lucidi, P., Barboni, B., Mattioli, M., 2001. Ram-induced ovulation to improve artificial insemination efficiency with frozen-thawed semen in sheep. *Theriogenology*, 55, 1797-1805.
 19. Nak, Y., Nur, Z., Nak, D., Sagirkaya, H., Tuna, B., Simsek, G., Ustuner, B., 2009. Sifat sezonundaki sütçü keçilerde FGA içeren vaginal sünger+PGF2 α +PMSG ve vaginal sünger ile birlikte ovsynch'in bir kombinasyonunun fertilitite ve östrus senkronizasyonu üzerine etkilerinin karşılaştırılması. V.Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi, 92-95.
 20. Nur, Z., Nak, Y., Nak, D., Ustuner, B., Tuna, B., Simsek, G., Sagirkaya, H., 2009. Saanen keçilerinde progesteron destekli co-synch ve ovsynch protokollerinin östrus senkronizasyonu ve sabit zamanlı suni tohumlama üzerine etkileri. V.Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi, 94-95.
 21. Peterson, K., Kappen, M.A.P.M., Ursem, P.J.F., Nöthling, J.O., Colenbrander, B., Gadella, B.M., 2007. Microscopic and flow cytometric semen assessment of Dutch AI-bucks: Effect of semen processing procedures and their correlation to fertility. *Theriogenology*, 67, 863-871.
 22. Pursley, J.R., Mee, M.O., Wiltbank, M.C., 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 α and GnRH. *Theriogenology*, 44, 915-923.
 23. Ritar, A.J., Ball, P.D., O'May, J., 1990. Artificial insemination of Cashmere goats: effects on fertility and fecundity of intravaginal treatment, method and time of insemination, semen freezing process, number of motil spermatozoa and age of females. *Reprod.Fertil.Dev.*, 2, 377-384.
 24. Thatcher, W.C.R., Staples, G., Danet-Desyoner, B., Oldick, B., Schmidt, E.P., 1994. Embryo health and mortality in sheep and cattle. *J.Anim.Sci.*, 72, 16-30.
 25. Twagiramungu, H., Guilbault, L. A., Dufour, J. J., 1995. Synchronization of ovarian follicular waves with a gonadotropin-releasing hormone agonist to increase the precision of estrus in cattle: A review. *J. Anim. Sci.*, 73, 3141-3151.
 26. Watson, P.F., 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod.Sci.*, 60-61, 481-492.
 27. Wildeus, S., 1999. Current concepts in synchronization of estrus: Sheep and goats. *Proceedings of the American Society of Animal Science.*

