

RESEARCH ARTICLE

J Res Vet Med. 2023; 42 (1) 32-36
DOI:10.30782/jrv.m.1250057

Doğu Friz Irkı Koyunlarda Farklı Tohumlama Dozlarının Gebelik Başarısı Üzerine Etkisi

● Ahmet AKTAR^{1*}, ● Hasan ÖZKAN¹, ● Kemal BAĞCI¹, ● Ümit Can UZUN¹,
● Mustafa AKKAŞOĞLU¹, ● Selvi ALIŞAN², ● Hakan SAĞIRKAYA¹, ● Selim ALÇAY¹

1 Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama A.D., Görükle Kampüsü, Bursa

2 Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Görükle Kampüsü, Bursa

Received 28-02-2023 Accepted 12-06-2023

Özet

Saha şartlarında sperma almak ve tohumlama yapmak her zaman aynı koşullarda ve temiz şartlarda yapılamamaktadır. Bu çalışmada saha şartlarında üç farklı dozda taze sperma ile intraservikal yolla suni tohumlama uygulaması sonucunda gebelik oranlarının araştırılması amaçlandı. Araştırmada Doğu Friz ırkı 60 adet koyun 3 gruba ayrıldı (n=20) ve 3 adet koç kullanıldı. Koyunlarda kızgınlıkların senkronize edilmesi amacıyla 20 mg flugeston asetat emdirilmiş süngerler 3 gruba da 12 gün süreyle yerleştirildi. Süngerlerin çıkarılacağı gün ovulasyonları senkronize etmek için tüm koyunlara 500 IU PMSG enjeksiyonu yapıldı ve 24 saat içerisinde tüm koyunların östrus gösterdiği tespit edildi. Aynı çiftlikteki aynı ırk 3 koçtan alınan spermalarla östrustaki koyunlar intraservikal yolla tohumlandı. Tohumlama dozları 1.grup için 100x10⁶ spermatozoa/ml, 2.grup için 200x10⁶ spermatozoa/ml, 3.grup için 400x10⁶ spermatozoa/ml olarak belirlendi. Tohumlamaların ardından toplamda 28 adet (%47) koyunda fertilizasyon olmadığı ve tekrar kızgınlık gösterdiği, diğer 32 adet (%53) koyunun gebe kaldığı tespit edildi. Gerçekleştirilen istatistiksel analiz sonucunda 3.Grup (400x10⁶) gebelik oranı 1. Gruba (100x10⁶) göre anlamlı olarak daha başarılı bulunmuştur (P<0.05). Sonuç olarak tohumlama dozları kıyaslandığında saha koşullarında 400x10⁶ spermatozoa/ml dozda sulandırılmış taze sperma ile tohumlamanın yüksek gebelik oranlarının elde edilmesinde etkili olduğu belirlendi.

Anahtar kelimeler: Doğu Friz, Koyun, Sperma, Senkronizasyon, PMSG, Progesteron

Abstract

Semen collection and insemination under field conditions may not always be done in similar and clean conditions. In this study, it was aimed to investigate the pregnancy rates as a result of intracervical artificial insemination at three different doses of fresh semen under field conditions. In the research, 60 East Frisian sheep were divided into 3 groups(n=20) and 3 rams were used. In order to synchronize the estrus in sheep, sponges impregnated with 20 mg flugestone acetate were placed in the all groups for 12 days. All sheep were injected with 500 IU PMSG to synchronize ovulation on the day the sponges were to be removed, and it was determined that all sheep showed oestrus within 24 hours. Sheep were inseminated intracervically with semen from 3 rams of the same breed in the same farm. Insemination doses were determined as 100x10⁶ spt/ml for the first group, 200x10⁶ spt/ml for the second group and 400x10⁶ spt/ml for the third group. After insemination, it was determined that 28 (43%) sheep did not have fertilization and showed heat again, and the other 32 (53%) sheep became pregnant. According to the statistical analysis results, the 3rd group (400x10⁶) was found to be significantly more successful than the 1st group (100x10⁶) (P<0.05). As a result, when the insemination doses were compared, it was determined that insemination with 400x10⁶ spermatozoa/ml diluted fresh semen was more effective in obtaining the high pregnancy rates.

Keywords: East Friesian, Sheep, Sperma, Synchronization, PMSG, Progesteron

Anahtar kelimeler: Doğu Friz, Koyun, Sperma, Senkronizasyon, PMSG, Progesteron

* Corresponding author: Ahmet AKTAR, Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama A.D., Görükle Kampüsü, Bursa (16059) Tel: +90 224 2941350 e-posta: ahmet1889@gmail.com

Giriş

Koyunlar mevsime bağlı poliöstrik hayvanlardır.¹ Koyunlarda aşım sezonunun başlangıcı ve süresi, ırk, gün uzunluğu, coğrafi bölge, beslenme, çevre ısısı, yaş ve koçla bir arada bulunma gibi etkenlere bağlı olmakla birlikte, daha çok günlerin kısaltmaya başladığı dönemlere denk gelmektedir. Östrus ve ovulasyon, bu tarihleri izleyen 60-120. günlerde gerçekleşir.² Keçilerde ve atlarda olduğu gibi koyunlarda da seksüel aktivite veya reproduktif siklus için fotoperiyodizm esansiyeldir. Koyunlarda östrus süresi 20-40 saat arasında değişmekte ve ovulasyon östrus süresinin sonunda gerçekleşmektedir. Koyunlarda uygun tohumlama zamanı östrusun başlangıcından 13-36 saatleri arasında değişmekte, östrus başlangıcından itibaren 8-12. saatlerde bir ve 12-18. saatlerde ikinci bir tohumlama yapılması tavsiye edilmektedir.³ Koyun sürüleri ineklere göre çok daha kalabalık ve östrus siklusu açısından çok daha fazla çeşitlilik göstermektedir. Koç katımı mevsimi başında östrus gösteren bir koyunla mevsim sonunda östrus gösterip çiftleşen bir koyun arasında aylarla ifade edilen bir süre farkı olabilir. Bu durum doğumların da aynı şekilde uzun aralıklarla gerçekleşeceğini ve ilk çiftleşenlerin doğum yaptığı sırada diğerlerinin daha yeni gebe kaldığını akla getirir. Koyunculukta en istenmeyen durumların başında gelen bu düzensizlikler sürüde tek tip bakım ve beslenme programını, barınağın doğumlara uygun bölümlere ayrılmasını, gebelik dönemine ve doğuma göre uygun mera ve içeride bakım programı yapılmasını imkânsız hale getirir. Bunun sonucunda, daha fazla işçilik, daha değişik yem ve yemleme tipleri ve daha çeşitli veteriner giderleri ortaya çıkararak üreticiye yüklü bir ekonomik gider oluşturur.⁴ Hayvanlarda östrusun ve ovulasyonun istenilen zamanda gerçekleşmesi için yapılan işlemlere "seksüel senkronizasyon" adı verilir. Bu işlemler sayesinde, sürü içerisindeki tüm hayvanların östrusları aynı tarihte gerçekleştirilebilmekte, tohumlamalar istenilen tarihe denk getirilebilmekte, bir koyundan bir yıl içerisinde daha çok kuzu elde edilebilmekte ve doğumların aynı zamana denk getirilmesiyle işletmelerin planlaması daha iyi yapılabilmektedir.⁵ Koyunlarda senkronizasyon, hormonal ve hormonal olmayan metotlarla uygulanabilmektedir. Hormonal olmayan metotlar arasında ısı-ışık ayarlaması, beslenmede yapılan değişiklikler ve koç katımı yer alır.⁶ Ancak, tüm bu hormonal olmayan uygulamalar kesin etkili olmayıp günümüzde daha pratik ve etkili olan hormonal yöntemler tercih edilmektedir. Bu amaçla progestagenler, östrojenler, PGF2a ve analogları, gonadotropinler, melatonin hormonu veya bunların kombinasyonları oral, parenteral, intravaginal veya subkutan implantlar şeklinde kullanılmaktadır.^{5,7,8,9,10} Östrus uyarımı ve senkronizasyonu

amacıyla en yaygın kullanılan progestagenler; flurogeston asetat (FGA) ve medroksiprogesteron asetat (MAP) içeren vajinal süngerlerdir. Vajinal sünger şeklinde kullanılan progestagenlerin uygulama süresi genellikle 12-14 gündür. Bu progestagenlerle yapılan östrus senkronizasyon prosedürleri gonadotropin ve prostaglandinlerle kombine edilebilmektedir. Bu şekildeki uygulamalar süngerlerin çıkartıldığı gün ya da 1-2 gün önce kas içi olarak PMSG ve PGF2a enjeksiyonu içerir. PMSG folliküler gelişime etki ederken, PGF2a korpus luteumun lizisinin garanti altına alınmasını sağlamaktadır.

Koyunlarda doğal siklusun 13- 14. günlerinde 500 IU PMSG enjeksiyonlarının ikizlik ihtimalini %30-70 artırdığı bildirilmiştir.¹¹ Koyun suni tohumlamasında amaç en iyi erkek damızlıkların geniş bir popülasyonda kullanılmasını sağlamaktır.

Bu çalışmada üreme mevsiminde flurogeston asetat içeren vajinal sünger ile östrus senkronizasyonunu takiben, sulandırılmış farklı yoğunluktaki sperma ile yapılan intra-servikal tohumlamaların gebelik üzerine etkisinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışma, üreme mevsiminde ekim kasım ayları arasında özel bir çiftlikte yürütüldü. Çalışmada aynı bakım ve besleme şartlarına tabi, klinik olarak sağlıklı, Doğu Friz ırkı toplam 60 adet koyun kullanıldı. Koyunlar her grupta 20 baş olacak şekilde rastgele 3 gruba ayrıldı. Farklı siklus dönemlerinde olan koyunlara progesteron emdirilmiş sünger uygulaması yapıldı. İlk uygulamanın yapıldığı gün 0. gün olarak kabul edildi ve 12 gün vajinada bırakıldı. Süngerler çıkarılmadan 24 saat önce 5mg PGF2a enjeksiyonu, çıkarıldığı gün 500 IU PMSG enjeksiyonu yapıldı. 24-48 saat içerisinde koyunların tamamının kızgınlığa geldiği gözlemlendi. Koyunlar çalışma öncesinde ve sırasında koçlardan ayrı olarak barındırıldı. 3 koçtan da elektro-ejakülasyon yöntemi ile bir sefer sperma alındı (14. gün) ve üç gruptaki 20 hayvan koçlardan alınan sperma ile tohumlanacak şekilde dozlama yapıldı. Kızgınlıkların senkronize olmasıyla birlikte aynı çiftlikteki aynı ırk koçlardan alınan taze spermalar sulandırılarak suni tohumlama yöntemi ile kızgın koyunlar tohumlandı. (Etik Kurul No: 2021-04/03)

Sperma Alınması

Sperma almak için aynı çiftlikte aynı şartlarda barındırılan 3 adet Doğu Friz ırkı koç kullanıldı. Koçlardan spermaları, suni tohumlamanın yapılacağı gün (14. gün) elektro-ejakülatör (12 cm prob uzunluğu, 2,5 cm çapında ve 12

volt) kullanılarak alındı. Alınan sperma ılık su banyosuna (28-32 °C) alındı ve zaman kaybetmeden incelemeye geçildi.

Sperma Muayenesi

Faz kontrast mikroskopunda 100x büyütme altında +++ kitle hareketi (0-5 ölçekte) ve üzeri olan sperma örnekleri ile x400 büyütmede incelenip % olarak değerlendirilen motilite değeri %75 ve üzerinde bulunan spermalar kullanıldı. Tohumlama dozunu belirlemek için koçlardan alınan spermanın spermatozoa yoğunluğu hemositometrik yöntemle belirlendi.12

Spermanın Sulandırılması

Çalışmada Alçay ve ark. (2019) teke spermasını dondurmada kullandıkları tek aşamalı sulandırma prosedürü [%1,5 yumurta sarısı, 223.7 mM Tris, 66.6 mM sitrik asit, 55.5 mM Fruktoz, 1mM sistein, 4.03 mM EDTA, 100.4 mM Trehaloz, 3 g/L dihidrostreptomisin ve 4g/L penisilin G] kullanıldı. 3 koçtan 2 farklı günde alınan sperma bireysel olarak kullanılacak şekilde on eşit hacme bölünerek 1. gruptaki koyunlar için nihai konsantrasyon 100x106 (spermatozoa/ml), 2. gruptaki koyunlar için nihai konsantrasyon 200x10⁶ (spermatozoa/ml), 3. gruptaki koyunlar için nihai konsantrasyon 400x10⁶ olacak şekilde sulandırıldı.13

Suni Tohumlama

Koyunlar suni tohumlama işlemi yapılmak üzere sırasıyla suni tohumlama sehpasına 45 derecelik açıyla arka ayakları yukarıda kalacak şekilde bağlandı. Her koyunun işlem öncesi vulva bölgesi temizlenerek vulvanın hiperemi durumu ve akıntı karakteri değerlendirildi. Suni tohumlama için hazırlanan payetler, vulvadan ışıklı spekulum yardımıyla girilerek koyunlar için geliştirilmiş suni tohumlama kateteriyle intraservikal olarak uygulandı.

İstatistiksel Analiz

Sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesinde SPSS (Windows için SPSS 28.0; SPSS, Chicago, IL, ABD) programından yararlanılmıştır. Gruplar arasındaki gebelik oranlarının karşılaştırılması için Ki-kare (Chi-square) testi kullanıldı.

Bulgular

Senkronizasyon uygulamasının ardından çalışmada kullanılan hayvanların tümü (%100) 48 saat içerisinde östrus göstermiştir. Östrus gösteren hayvanların payet başına 100x10⁶, 200x10⁶ ve 400x10⁶ adet spermatozoon içeren sulandırılmış taze koç spermasıyla tohumlanmasının ardından 28 koyun (%47) 16 gün sonra tekrar östrus göstermiştir. Tohumlanan toplam 60 koyundan 32 tanesi (%53)

gebe kalmıştır. Gerçekleştirilen istatistiksel analiz sonucunda 3. grubun (400x10⁶) diğer tohumlama dozlarının uygulandığı gruplara göre anlamlı bir üstünlüğü olduğu bulunmuştur (P<0.05). Tablo 1'de elde edilen gebelik oranları gösterilmektedir.

Tablo 1: Suni tohumlama dozlarına göre senkronizasyon uygulanan grupların gebelik oranları

Gruplar	n	Tohumlama Dozu	Östrus Oranı (%)	Gebelik Oranı (%)
1.Grup	20	100x10 ⁶	%100	7 (%35) ^a
2.Grup	20	200x10 ⁶	%100	11 (%55) ^{ab}
3.Grup	20	400x10 ⁶	%100	14 (%70) ^b

Farklı üst simgeler (a, b) istatistiksel farklılıkları göstermektedir.

Tartışma ve Sonuç

Koyunlarda suni tohumlama uygulaması taze ve donmuş sperma ile olmak üzere iki şekilde yapılabilmektedir. Koç spermasının dondurulması aşamasındaki zorluklar ve çözdürdükten sonra spermatolojik parametrelerdeki düşüşler donmuş sperma kullanımını kısıtlayan faktörlerdendir. Taze sperma ile tohumlanmış koyunların gebelik oranı donmuş sperma ile tohumlanan koyunların gebelik oranlarından yüksektir.¹⁴ Kullanmış olduğumuz koçların spermatolojik özellikleri literatürde bildirilen optimum parametreler ile uyum göstermektedir.¹⁵ Spermanın dondurulması genetik ilerleme ve seleksiyon için kullanılabilen bir yöntemdir. Ancak koyun yetiştiriciliğinde dondurulmuş sperma ile tohumlama daha sınırlıdır.¹⁶ Soğutulmuş veya dondurup çözülmüş spermanın koyun genital kanalındaki hızı taze spermaya göre daha düşük olmaktadır.¹⁷ Bu yüzden koyunlarda genellikle taze sperma kullanılmaktadır ve taze sperma ile tohumlanan koyunlarda %70 ile %82 arasında gebelik oranı elde edilmiştir.^{18,19} Zeleke ve ark. (2005) östrus senkronizasyonu uygulanan Dorper ırkı koyunlarda yaptığı çalışmada 0,1 ml hacimde sulandırılmış taze sperma (200x10⁶ sperm/ml doz) ile tohumlandıktan sonra %75 oranında gebelik ve %94,6 oranında doğum elde etmiştir.⁹ Koyun başına sperm konsantrasyonu 60 ila 100 milyon arasında olan taze sperma ile koyunların vajinal suni tohumlanmasından sonra ve Naim ve ark. %59 gebelik oranı bulmuşlardır.²⁰ Cueto ve Gibbons (2010) 0.2 ml'de 100-150 milyon dozda sulandırılmamış taze sperma ile tohumlanan koyunlarda aynı üreme indeksi için aynı sonuçları elde etmişlerdir.²¹ Yaptığımız çalışmada farklı tohumlama dozlarının kıyaslaması esnasında belirtilen çalışmalara paralel değerler elde edilmiştir. Koyunlarda intraservikal suni tohumlama uygulamasında 100x10⁶ spermatozoa/ml tohumlama dozunun istenen oranda gebelik için yeterli olmadığı, 200x10⁶ ve 400x10⁶ spermatozoa/ml dozlarının ise hormonal ya da fiziksel faktörlerden kaynaklanan bir engel oluşmadığı sürece gebelik oranlarını yukarı yönlü revize edeceği görülmüştür.

Prostoglandin emdirilmiş süngerlerin koyunların vajinasına 12 gün uygulanması, östrusları senkronize etmek için kullanılan bir metottur. Uygulama sonunda ovulasyonları senkronize etmek için PMSG enjeksiyonu yapılır. Bu teknik 20 mg flugeston asetat içeren sünger ve 500 IU PMSG kullanıldığında Doğu Friz ırkı koyunların kızgınlık gösterme oranı %100 olarak bulunmuştur. Yapılan bir başka çalışmada ise süngerlerin çıkarılmasından sonraki 24-48 saat içinde hayvanların %90'ında kızgınlık görülmüştür, bu bilgiler de bizim ulaştığımız sonuçlara paralellik göstermektedir.²² PMSG'nin farklı dozları (300 IU, 450 IU ve 600 IU) 40 mg flurogeston asetat emdirilmiş süngerin 14 gün uygulanmasının ardından kullanılmış ve gebelik oranı PMSG enjeksiyonu yapılmayan kontrol grubundan (%57,5) belirgin şekilde yüksek (%81.2-%84.3) bir sonuç elde edilmiştir.²³

Progesteron emdirilmiş süngerlerin 12 gün boyunca vajinada kalması, koyunların ovaryumunda gelişmekte olan folikülün ovule olması için gereken süreyi sağlamaktadır. Bu nedenle üreme sezonunda sünger ve PMSG uygulamasıyla senkronize edilen Doğu Friz ırkı koyunlarda kızgınlık tespitinden sonra yapılan intraservikal suni tohumlama işleminde 100×10^6 spermatozoa/ml, 200×10^6 spermatozoa/ml ve 400×10^6 spermatozoa/ml dozlarının kullanılması arasında istatistiksel olarak etkili olanın 400×10^6 spermatozoa/ml dozu olduğu belirlenmiştir. 100×10^6 ve 200×10^6 dozları arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Yüksek dozda taze sperma kullanılarak gebelik oranlarının arttırılabileceği gösterilmiştir. Eldeki imkanların kısıtlı olduğu saha şartlarında minimum etkin tohumlama dozunun araştırılması ileriki çalışmalarda faydalı olacağı düşünülmektedir.

Kaynakça

1. Kalkan, C., Horoz, H.K., Pubertas ve Seksüel Sikluslar. In: Alaçam, E. (Ed.), Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite (5. Baskı). Ankara, Medisan, pp. 23-40, 2005.
2. Pineda, M.H., Reproductive Patterns of Sheep and Goat. In: McDonald, L.E., Pineda, M.H. (Ed.), Veterinary Endocrinology and Reproduction (4th ed.). Philadelphia, London, Lea&Febiger, pp. 428-445, 1989.
3. Karaca, F. "Üreme Mevsiminde vajinal sünger ve kulak İmplantı uygulamalarıyla senkronize edilen kıl keçilerinde farklı zamanlarda yapılan servikal tohumlamaların gebelik oranlarına etkisi." Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi 12.1 (2017): 63-70.
4. Ataman MB., 2002. Koyun ve keçilerde reproduksiyon ve suni tohumlama. In "Evcil Hayvanlarda Dölerme ve Sun'i Tohumlama", Ed., K Çoyan, 137-154, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayın Ünitesi, Konya.
5. Alaçam, E., Üremenin Kontrolü. In: Alaçam, E. (Ed.), Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite (5.Baskı). Ankara, Medisan, pp. 71-80, 2005.
6. Hafez, E.S.E., Hafez, B., Reproductive Cycles. In: Hafez, E.S.E., Hafez, B. (Ed.), Reproduction in Farm Animals (7th ed.). Oxford, WileyBlackwell, pp. 55-67, 2000.
7. Fukui, Y., Ishikawa, D., Ishida, N., Okada, M., Itagaki, R., Ogiso, T., Comparison of fertility of estrous synchronized ewes with four different intravaginal devices during the breeding season. Journal of Reproduction and Development 45(5), 337-343, 1999
8. Husein, M.Q., Kridli, R.T., Effect of progesterone prior to GnRH-PGF2a treatment on induction of oestrus and pregnancy in anoestrous Awassi ewes. Reproduction in Domestic Animals 38, 228-232, 2003.
9. Zeleke, M., Greyling, J.P.C., Schwalbach, L.M.J., Muller, T., Erasmus, J.A., Effect of progestagen and PMSG on oestrous synchronization and fertility in Dorper ewes during the transition period. Small Ruminant Research 56, 47-53, 2005.
10. Brunet, A.G., Sebastian, A.L., Picazo, R.A., Cabellos, B., Goddard, Z., Reproductive response and LH secretion in ewes treated with melatonin implants and induced to ovulate with the ram effect. Animal Reproduction Science 39(1), 23-34, 1995.
11. Daşkın, Ali. "Östrusları senkronize edilen Akkaraman koyunlarında PMSG enjeksiyonlarının dölvürimine etkisi." Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 48.02 (2001): 165-167.
12. Hafez ESE., Semen evaluation. In: Hafez ESE (ed) Reproduction in Farm Animals, Lea & Febiger, Philadelphia, USA, pp: 405-423, 1993.
13. Alçay S, Ustuner B, Aktar A, Mulkpınar E, Duman M, Akkasoglu M, Cetinkaya M. Goat semen cryopreservation with rainbow trout seminal plasma supplemented lecithin-based extenders. Andrologia, 52(4), 2019.
14. Langford, G. A., Marcus, G. J., Hackett, A. J., Ainsworth, L., Peters, H. F., & Wolynetz, M. S. A comparison of fresh and frozen semen in the insemination of confined sheep. Canadian Journal of Animal Science, 59(4), 685-691, 1979.
15. Alçay, S., Hücre içine girebilen bazı kriyoprotektanlarla dondurulan koç spermasının in vitro embriyonik gelişim üzerine etkisi (Doctoral dissertation, Bursa Uludağ University (Turkey)), 2015.
16. Salamon, S. & Maxwell, W. M. C., Storage of ram semen. Animal Reproduction Science, 62(1-3), 77-111, 2000.

17. Fernández, A. D., Bonilla, R. C., Bonilla, R. R., Villegas, N. & Ibañez, W. Efecto de la refrigeración del semen de carnero a 4-5°C sobre el transporte espermático. *Producción Ovina SUL*. 14, 55-63, 2001.
18. Donovan, A., Hanrahan, J. P., Lally, T., Boland, M. P., Lonergan, G. P. & O'Neil, D. J., AI for sheep using frozen-thawed semen. ARMIS 4047 Project report, under the Research Stimulus Fund; OPARDF measure 5b, 1-43, 2001. ISBN 1 84170 152.
19. Ehling, C., Wirth, P., Schindler, L., Haderler, K-C., Döpke, H-H., Lemme, E., Herrmann, D. & Niemann, H. Laparoscopic intrauterine insemination with different doses of fresh, conserved, and frozenthawed semen for the production of ovine zygotes. *Theriogenology*, 60(4), 777-787, 2003.
20. Naim, P., M. Cueto, and A. Gibbons. "Timed artificial insemination with ram chilled semen." *Archivos de Zootecnia* 58.223, 435-440, 2009
21. Cueto, M. & Gibbons, A., Conservación seminal e inseminación artificial en ovinos. *Actualización en Producción Ovina*, 61-77, 2010.
22. Erohin, A.S., *Sovremennye metody sinhronizacii jooestrusa u ovec* [Modern methods of oestrus synchronization in sheep]. *Ovcy, kozy, sherstjanoe delo*, 4, 4-8, 2011.
23. Wildeus, S. Current concepts in synchronization of estrus: Sheep and goats. *J. Anim. Sci*, 77(1), 47-53., 2000.