



**T.C.**  
**HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARKLI KRİYOPROTEKTAN SOLÜSYONLARININ BAL ARISI  
SPERMALARINDA DONDURMA SONRASI SPERM MOTİLİTE VE  
CANLILIĞINA ETKİLERİ**

**MUSTAFA TAŞDEMİR**

**ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HATAY**  
**KASIM-2019**



T.C.  
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI KRİYOPROTEKTAN SOLÜSYONLARININ BAL ARISI  
SPERMALARINDA DONDURMA SONRASI SPERM MOTİLİTE VE  
CANLILIĞINA ETKİLERİ

MUSTAFA TAŞDEMİR

ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY  
KASIM-2019

T.C.  
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI KRİYOPROTEKTAN SOLÜSYONLARININ BAL ARISI  
SPERMALARINDA DONDURMA SONRASI SPERM MOTİLİTE VE  
CANLILIĞINA ETKİLERİ**

**MUSTAFA TAŞDEMİR**

**ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Doç.Dr. Aziz GÜL** danışmanlığında hazırlanan bu tez 22 /11 /2019 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **OYBİRLİĞİ** ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Aziz GÜL  
Başkan

Prof.Dr. Kemal KARABAĞ  
Üye

Prof.Dr. Şerafettin KAYA  
Üye

**Kod No: 1219**

**Prof. Dr. Erdal SERTKAYA**  
Enstitü Müdürü

**Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.**

22.11.2019

## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.

**Mustafa TAŞDEMİR**

## ÖZET

### FARKLI KRIYOPROTEKTAN SOLÜSYONLARININ BAL ARISI SPERMALARINDA DONDURMA SONRASI SPERM MOTİLİTE VE CANLILIĞINA ETKİLERİ

Bu çalışma ile günümüzde oldukça önem kazanan bal arısı gen kaynaklarının korunması amacıyla spermlerinin farklı kriyoprotektanlar kullanılarak depolanması, çözdürülme sonrası motilite ve spermatozoa canlılığına etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla üç farklı solüsyon ve standart kriyoprotektan solüsyonu (kontrol) grubu kullanılmıştır. Çalışma sonunda en yüksek motilite Solüsyon 3, Solüsyon 4, Solüsyon 2, solüsyon 1 ve kontrol gruplarında sırasıyla ortalama  $4.60\pm 0.49$ ,  $4.47\pm 0.62$ ,  $3.87\pm 0.50$ ,  $3.73\pm 0.57$  ve  $2.67\pm 0.60$ , olarak belirlenmiştir. Motilitenin belirlenmesini takiben en fazla canlılık (%) oranı Solüsyon 4 grubunda % 59.80 olarak tespit edilmiştir. Solüsyon 4 grubunu % 58.15 ile Solüsyon 3 grubu, % 38.13 ile Solüsyon 2, % 34.05 ile Solüsyon 1 ve % 25.70 ile kontrol grubu takip etmektedir. Çalışmada tüm deneme gruplarının canlı spermatozoa ortalaması ise % 43.17 olarak belirlenmiştir. Uygulama gruplarında elde edilen ortalama motilite ve canlı spermatozoa değerleri kontrol grubuna oranla yüksek bulunmuştur ( $p<0.05$ ).

2019, 42 Sayfa

**Anahtar kelimeler:** Kriyoprotektan, DMSO, semen, dondurma solüsyonu, motilite

## ABSTRACT

### THE EFFECTS OF DIFFERENT CRYOPROTECTANT SOLUTIONS ON HONEY BEE SPERM MOTILITY AND VIABILITY FOLLOWING CRYOPRESERVATION PROCESS

In this study, it was aimed to determine the effects of motility and spermatozoa viability after thawing the storage of sperm using different cryoprotectants in order to preserve the genetic resources of bees, which are very important today.

For this purpose, Solution 1, Solution 2, Solution 3 and Solution 4 cryoprotectants were compared with the standard cryoprotectant solution (control) group. At the end of the study, the highest motility was determined as  $4.60\pm 0.49$ ,  $4.47\pm 0.62$ ,  $3.87\pm 0.50$ ,  $3.73\pm 0.57$  and  $2.67\pm 0.60$  in the Solution 3, Solution 4, Solution 2, Solution 1 and Control groups, respectively. Following the determination of motility, the highest viability (%) was found to be 59.80% in Solution 4 group. Solution 4 group was followed by solution 3 group with 58.15%, solution 2 with 38.13%, solution 1 with 34.05% and control group with 25.70%. In the study, the average the living spermatozoa of all experimental groups was 43.17%. The mean of motility and live spermatozoa values obtained in the application groups were higher than the control group ( $p < 0.05$ ).

2019, 42 Pages

**Key words:** Cryoprotectant, DMSO, semen, freezing solution, motility

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez konusunun belirlenmesinde, araştırılması ve yazımı sırasında sahip olduğu bilgi birikimi ve tecrübesi ile çalışmayı yönlendiren ve her türlü yardımı esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Aziz GÜL'e, tez çalışmalarım sırasında sıklıkla bilgilerine başvurduğum, yardımlarını ve katkılarını benden esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Şerafettin Kaya'ya ve isimlerini burada zikredemediğim ama yardımlarını esirgememiş herkese sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	VII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Bal Arısı.....	3
1.2. Bal Arısının Taksonomisi ve Kökeni.....	4
1.3. Bal Arısının Yaşam Döngüsü.....	5
1.4. Bal Arısının Morfolojisi.....	6
1.5. Bal Arısının Sosyal Yapısı.....	7
1.6. Bal Arılarında Üreme Sistemi.....	7
1.7. Sperma ve Bazı Spermatolojik Özellikler.....	13
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	15
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	20
3.1. Materyal.....	20
3.2. Yöntem.....	20
3.2.1. Erkek Arılar.....	20
3.2.2. Koruyucu Çözelti Karışımı.....	22
3.2.3. Spermilerin Dondurma İşlemi.....	23
3.2.4. Semende Ölçülen Kalite Parametreleri.....	24
3.2.4.1. Motilite Belirleme.....	24
3.2.4.2. Ölü/Canlı Sperm Sayısı.....	25
3.2.4.3. Verilerin Değerlendirilmesi.....	25
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	26
4.1. Motilite Belirleme.....	26
4.2. Ölü/Canlı Sperm Sayısı.....	30
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	36
KAYNAKLAR.....	37
ÖZGEÇMİŞ.....	43



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	Bal arısının taksonomik olarak sınıflandırılması.....	4
Çizelge 3.1.	Koruyucu çözeltiler ve içerikleri.....	22
Çizelge 3.2.	Semen- koruyucu çözelti karışım oranları.....	24
Çizelge 4.1.	Semen dondurma solüsyonları.....	27
Çizelge 4.2.	Motilite varyans analiz tablosu.....	27
Çizelge 4.3.	Canlı / Ölü sperm sayıları.....	31
Çizelge 4.4.	Canlı sperm oranı varyans tablosu.....	32



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Bal arısının yaşam döngüsü.....	5
Şekil 1.2.	Ana Arı Üreme Organları.....	9
Şekil 1.3.	Erkek Arı Üreme Organları.....	14
Şekil 1.4.	Erkek Arıda Penisin Yapısı.....	14
Şekil 3.1.	Çalışma için erkek arıların koloni önünden toplanması.....	20
Şekil 3.2.	Erkek arı toplama ve uçurma kafesleri.....	21
Şekil 3.3.	Semen Toplama işlemi.....	21
Şekil 3.4.	Toplanan semenin dondurma işlemi için hazırlanması.....	21
Şekil 3.5.	Payetlere doldurulmuş ve dondurulmaya hazır semen örnekleri.....	23
Şekil 3.6.	Spermlerin dondurma cihazında dondurması işlemi.....	24
Şekil 4.1.	Semen örneklerinin lam üzerine alınması.....	26
Şekil 4.2.	Solüsyon 1 grubuna ait spermlerin dairesel motilite testleri.....	28
Şekil 4.3.	Solüsyon 2 grubuna ait spermlerin dairesel motilite testleri.....	28
Şekil 4.4.	Solüsyon 3 grubuna ait spermlerin dairesel motilite görüntüsü.....	29
Şekil 4.5.	Solüsyon 4 grubuna ait spermlerin dairesel motilite görüntüsü.....	29
Şekil 4.6.	Kontrol grubuna ait spermlerin motilite görüntüsü.....	30
Şekil 4.7.	Solüsyon 1 grubuna ait spermlerin mikroskop altındaki canlılık görüntüsü.....	33
Şekil 4.8.	Solüsyon 2 grubuna ait spermlerin mikroskop altındaki canlılık görüntüsü.....	33
Şekil 4.9.	Solüsyon 3 grubuna ait spermlerin mikroskop altındaki canlılık görüntüsü.....	34
Şekil 4.10.	Solüsyon 4 grubuna ait spermlerin mikroskop altındaki canlılık görüntüsü.....	34
Şekil 4.11.	Kontrol grubuna ait spermlerin mikroskop altındaki canlılık görüntüsü.....	35

## **SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ**

### **SİMGELER**

°C : Celcius (derece)

g : Gram

μ : Mikrolitre

ml : Mililitre

### **KISALTMALAR**

DMSO : Dimetil sülfoksit

FAO : Dünya Gıda Örgütü (Food and Agriculture Organization)

TAB : Türkiye Arıcalar Birliği

SPSS : Statistical package for the social sciences (Sosyal Bilimler için istatistik programı)

## 1. GİRİŞ

Ülkemiz; zengin florası, topoğrafik ve klimatolojik özellikleri sayesinde Afrika, Avrupa ve Asya kıtaları arasında doğal bir köprü oluşturması nedeniyle birçok arı ırk ve ekotiplerini bünyesinde barındırabilen, dünyanın 12 gen merkezinden birisidir. Sahip olduğu zengin bitki örtüsü ve farklı iklim kuşakları arıcılığın gelişmesine de önemli katkılarda bulunmaktadır. Türkiye, bu özelliklerinden dolayı hem koloni varlığı, hem de bal üretimi açısından dünyada önemli bir konuma sahiptir. Dünya ülkeleri arasında koloni sayısı bakımından ikinci ve bal üretimi bakımından dördüncü sırada yer almaktadır (TAB, 2014; FAO, 2016). Bunun yanında dünyada belirlenmiş bal arısı ırklarından *Apis mellifera anatoliaca*, *Apis mellifera caucasica*, *Apis mellifera syriaca*, *Apis mellifera carnica*, *Apis mellifera meda* ve *Apis mellifera ligustica*'nın yanı sıra başta Muğla, Yığılca, Gökçeada gibi arı ekotipleri olmak üzere birçok bölgede o bölgeye adapte olmuş yerel bal arısı ekotiplerinin varlığı bilinmektedir (Genç ve Dodoloğlu, 2011).

Bal arıları, bal ve diğer arı ürünleri ile insan beslenmesine, tozlaşma ile de bitkisel üretime ve biyolojik çeşitliliğin korunmasına çok önemli katkılarda bulunmaktadır. Bal arılarının tozlaşma ile tarımsal üretime sağladığı katkı arı ürünlerinden doğrudan sağlanan 10-20 katı kadardır. Bunun yanında insanların tükettiği gıdaların 1/3'ü bal arıları tarafından tozlaşması sağlanan bitkilerden elde edilmektedir (Genç ve Dodoloğlu, 2011).

Yaşadığımız ekosistem içerisinde sosyal böcekler olan bal arılarının (*Apis mellifera* L.) üreme sistemi diğer hayvanlardan farklılıklar göstermektedir. Ayrıca bal arıları, üreme ve üreme organları bakımından diğer birçok böcekten de farklılıklar gösterir. Genel olarak dişi böceklerin sperma depolaması, önemli bir üreme biyolojisidir. Kısa vadeli sperma depolama birçok böcekte yaygın olmasına rağmen bazı böceklerde özel sperma depolama organları vardır (Gobin ve ark., 2006). Yalnız yaşayan böceklerin dişileri spermaları birkaç günden birkaç aya kadar vücutlarında koruyabilmektedir. Ancak sosyal zar kanatlı böceklerin dişileri spermaları özel organları (spermateka) içerisinde birkaç yıla kadar saklayabilmektedirler. Depolama organları yapısal olarak koruyucu, besleyici, kimyasal olarak stabil bir çevre ve spermlerin canlılığını sağlayacak bir yapıdadır (Choe ve Crespi, 1997; Neubaum ve Wolfner,

1999). Bu özelliği ile böceklerde farklı zamanlarda çiftleşmeler olabilmekte ve spermalar aynı spermateka içerisinde depolanabilmektedir. Bu, daha fazla spermanın depo edilebilmesi ve daha fazla yumurtlama ile koloninin daha güçlü olması demektir.

Bal arılarında çiftleşme, diğer böceklerden farklı olarak ana arının yüksükten çıkmasını takiben bir hafta içerisinde olmaktadır. Normal şartlarda ilk uçuş ile tamamlanan çiftleşme, hava koşulları vb. sebeplere bağlı olarak depo organı (spermateka) için yeterli spermin sağlanamadığı durumlarda ikinci bir çiftleşme uçuşu da olabilmektedir. Erkek arılardan alınan spermalar yumurta kanalından geçerek spermatekaya ulaşır ve burada ana arının tüm yaşamı boyunca saklanır. Sosyal böceklerin yaşantıları ve vücutlarındaki bu özel yapılar incelenerek diğer hayvanlarda olduğu gibi böcek spermlerinin de depolanabilirliği yıllardır birçok bilim adamı tarafından araştırılmaktadır (Taber ve Blum, 1960; Harbo, 1976, 1979, 1983, 1985; Melnichenko ve Vavilov, 1976; Verma, 1983; Kaftanoğlu ve Peng, 1984; Hopkins vd., 2012; Wegener vd., 2014).

Bütün bunların yanı sıra dünyada son yıllarda giderek artan ve nedeni kesin olarak belirlenemeyen arı ölümleri “koloni çöküş hastalığı” CCD (Colony Collapse Disorder) olarak bilinen bir fenomen haline gelmiştir. Geçmişten bu yana bu şekilde hastalıklar, görünmezlik hastalığı, ilkbahar azalması, sonbahar azalması, kış kaybı gibi adlarla adlandırılmış ve kesin bir şekilde sebebi belirlenememiştir (Gül, 2014). Ancak ülkemizin de dahil olduğu ve dünya çapında büyük arı ölümlerinin yaşanması ve sebebinin kesin olarak belirlenememesinden dolayı bu hastalık 2006 yılında koloni çöküş hastalığı (CCD) olarak adlandırılmıştır. Hastalık ile ilgili kayıplar kuzey Amerika ile birlikte zamanla İsviçre, Belçika, Hollanda, Fransa, İtalya, Yunanistan, Portekiz ve İspanya da görülmeye başlanmıştır. Gün geçtikçe ülkemizin de içinde olduğu diğer birçok ülkede de kayıp raporları bildirilmiştir. Bu şekilde yaşanan yoğun koloni kayıplarının gelecekte tozlaşma problemine yol açabileceği saptanmış olup arı hastalık ve zararlıları ile mücadele ve bal arısı popülasyonlarının korunması ve ıslahı konularında kapsamlı araştırmalar başlatılmıştır (Gül, 2014). Bu çalışmaların başında bal arılarında spermlerin depolanması yer almaktadır. ABD ve Almanya başta olmak üzere birçok ülkede bal arısı genotiplerinin saklanması ve ıslah çalışmalarında

kullanılması için sperm depolama projeleri yürütülmüş ve önemli aşamalar kaydedilmiştir.

Bal arısı spermlerinin depolanmasında, diğer çiftlik hayvanlarında kullanılan yöntemlere benzer şekilde sıvı azot içerisinde yapılmaktadır. Ancak kriyoprotektan ve sulandırıcıların hazırlanmasında birçok farklı kimyasal kullanılmaktadır. Depolamanın başarısı üzerinde etkili olan kristalizasyonu engellemek amacı ile katılan koruyucuların konsantrasyonu ve çeşidi, soğuk şokun etkileri, genel sıcaklık duyarlılıkları önemli bir etkiye sahiptir (Hopkins ve Herr, 2010). Kriyoprotektanlar genelde hücre içi buzlanmayı engelleyici etkiye sahiptirler (Watson ve Fuller, 2001). Soğuk şok, spermaların hızlı dondurulması esnasında zarar gördüğü için kullanılan bir terimdir (Kaftanoğlu ve Peng, 1984). Bu yüzden spermalar yavaş yavaş kademeli dondurma cihazlarında kontrollü bir şekilde dondurulmalıdır.

Arıcılık sektöründe sperm depolama ıslah ve stok iyileştirilmesi için gen bankalarının hızlı ve verimli bir şekilde sürdürülmesini sağlamak sektör için günümüzde oldukça önemli hale gelmiştir. Çünkü bal arısı spermlerinin pratik bir şekilde depolanması ve sonrasında ana arıların tohumlanmasında kullanılması, arıcılık sektörüne ve akademik çalışmalara önemli faydalar sağlayacaktır. Bal arısı spermlerinin depolanması, arıcılık sektöründe karşılaşılan damızlık materyallerin korunması gibi birçok problemin çözümünde de etkili olacaktır. Özellikle, spermlerin depolanması, genetik materyalin ihracatı ve ithalatı esnasında çeşitli hastalıkların yayılmasına da engel olacaktır. Bal arısı spermlerinin pratik tekniklerle, farklı kriyoprotektanlar ile depolanması ve kullanılması ile istenen özelliklere sahip genotip ıslahının gelişmesinde ve popülasyondaki genetik farklılığın sürdürülmesine de katkı sağlayacaktır (Collins, 2000).

### **1.1. Bal Arısı**

Bal arısı (*Apis mellifera*) ekonomik, tarımsal ve çevresel olarak çok büyük öneme sahiptir. Bu sebeple bal arısı yetiştiriciliği Dünya'nın her tarafına yayılmıştır ancak *A. mellifera*'nın doğal habitatu Avrupa, Kuzey Afrika ve Orta Doğu olduğu düşünüldüğü ile beraber yapılan filogenetik analizler *A. mellifera*'nın kökeninin Asya olduğunu göstermiştir (Han ve ark., 2012).

Bal arısı dünyanın ihtiyaç duyduğu polinatör böcek türlerinden en önemlilerinden bir tanesidir. Yalnız diğer polinatör türlerin aksine bal arısı insan yaşamının bir parçası haline gelmiş ve insanların ilgisinin odağı olmuştur. Bal arılarının karmaşık sosyal yapıları insanların ilgisinin bir kısmını oluşturmasına rağmen bal arıları ne insanların kültüre aldığı nede sosyal yapı oluşturmuş tek böcek değildir. Bal arıları insanlarda merak uyandırmaktadır. O kadar ki Güney Doğu Asya medeniyetlerinde yaratılış bal arısı ile ilişkilendirilmiş ve birçok ilk çağ medeniyetinde bal arısından sıkça bahsedilmiştir. Orta çağ kilisesi bal arısını saflığın simgesi olarak kabul etmiştir. Orta çağda Kutsal Roma İmparatoru Charlemagne bal üzerinden alınan bir vergi sistemi oluşturmuştur (Johnson, 2011).

Bal arısı ekonomik değeri sebebiyle ıslahçılar tarafından değerli bir biyolojik materyal olarak görülmektedir (Tunca, 2009).

## 1.2 Bal Arısının Taksonomisi ve Kökeni

Dünya’da bilinen yaklaşık olarak 20,000 adet arı türü vardır (Zayed, 2009). *Apis mellifera*’nın ise bilinen coğrafi olarak izole olmuş 30 alttürü vardır (Ilyasov ve ark., 2015).

Çizelge 1.1. Bal arısının taksonomik olarak sınıflandırılması (Gupta, 2014)

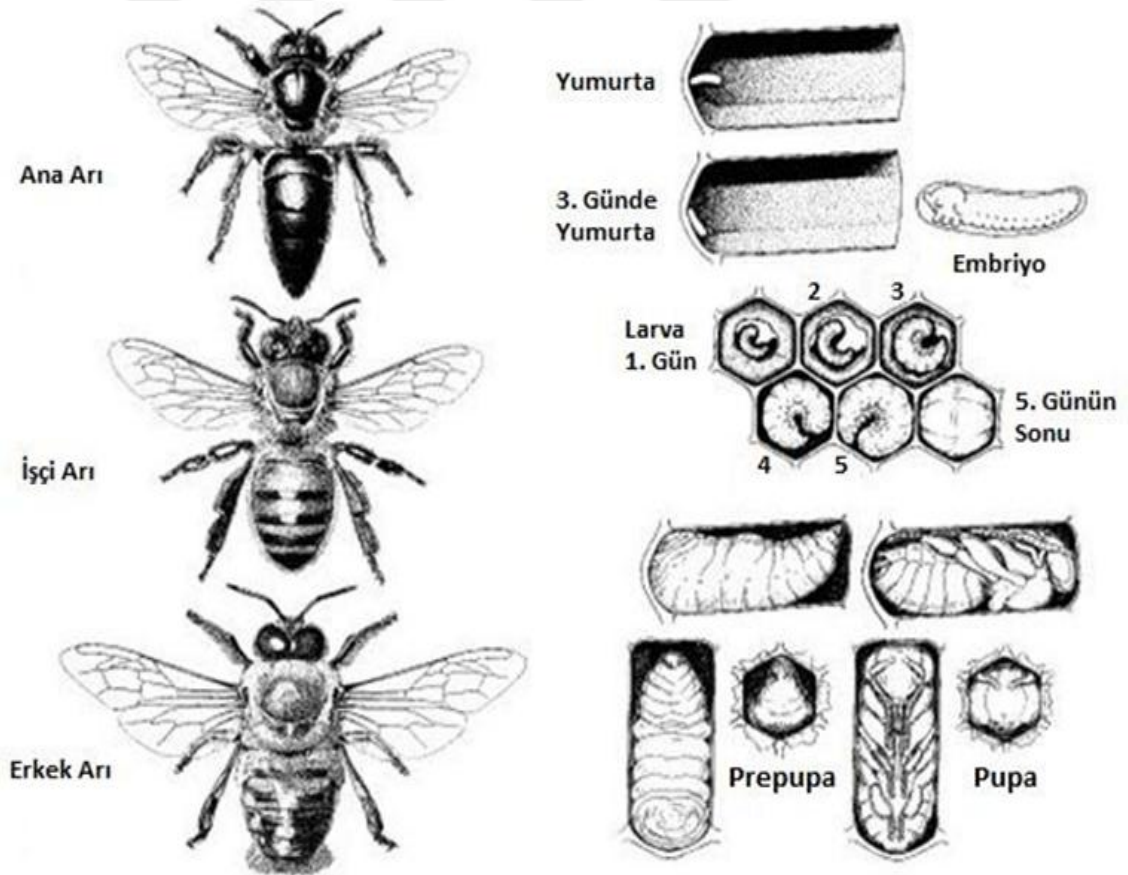
Alem	Hayvanlar ( <i>Animalia</i> )
Şube	Eklembacaklılar ( <i>Arthropoda</i> )
Altşube	Antenliler ( <i>Antennata</i> )
Sınıf	Böcekler ( <i>Insecta</i> )
Takım	Zar kanatlılar ( <i>Hymenoptera</i> )
Aile	Arılar ( <i>Apidae</i> )
Cins	Bal arıları ( <i>Apis</i> )
Tür	Bal Arısı ( <i>Apis mellifera</i> )

Bal arısının doğal yaşam bölgesi yukarıda bahsettiğimiz gibi Avrupa, Kuzey Afrika ve Orta Doğu’dur ayrıca *Apis* cinsi sadece Asya’da yaşayan 9 türe daha sahiptir. Bu sebeple genel olarak bal arısının Asya’dan bu bölgelere geldiği inanılmaktadır ancak

son zamanlarda Afrika kökenli bal arılarının üzerinde 1000'den fazla SNP markörü ile yapılan analizler, bal arısının Afrika üzerinden de yayılmış olabileceğini göstermektedir (Han ve ark., 2012).

### 1.3. Bal Arısının Yaşam Döngüsü

Bal arısının yaşam basamakları yumurta, larva, pupa ve ergin olmak üzere 4 kısımdan oluşur. Bir bal arısı yumurtadan erginliğe 21 günde ulaşır. Bu 21 günün 3 gününü yumurta formunda, 5 gününü larva formunda beslenerek, 1 gününü prepupa ve 12 gününü ise pupa formunda geçirir. Ana arının pupa formunda kaldığı süre 7, gün erkek arının pupa formunda kaldığı süre ise 15 gündür.



Şekil 1.1 Bal arısının yaşam döngüsü.(Winston,1991)



Bal arısı kapalı gözden çıktıktan sonra ise ilk 21 günlük ömrünü deneme uçuşları haricinde kovana içinde çeşitli görevler yaparak geçirir ve 22. Günde bal arısı tarlacı arı olur. İşçi arıların ömrü zamana göre değişir; kovanın aktif olduğu bahar ve yaz aylarında 5 ila 6 hafta kadar kış aylarında ise 5 ila 6 ay ya da daha fazla yaşayabilir. Ana arı ise depoladığı sperm miktarına göre 1 ila 2 yıl arasında yaşayabilir. Erkek arının ömrü ise bahar aylarında 21 ila 32 gün arasında, yaz aylarında 90 gün ya da çiftleşmeye kadardır (Winston, 1991). Şekil 1.1'de bal arısının başkalaşımı resimler ile gösterilmektedir.

#### 1.4. Bal Arısının Morfolojisi

Diğer tüm böceklerde olduğu gibi bal arısının vücudu da baş, gövde ve karın olmak üzere 3 kısımdan oluşmaktadır. Kafalarında iki adet petek göz bulunmaktadır. Bu iki adet petek gözde 3000 ile 5000 arasında nokta göz bulunmaktadır. Bu gözler şekilleri iyi algılayamaz ancak renkleri iyi algırlar. Bal arılarının gözleri ultraviyole ışığa karşı duyarlıdır ancak kırmızıya karşı daha az duyarlıdır. Arılar mavi, sarı, beyaz ve siyahı algılayabilirler. Başın hemen tepesinde bulunan 3 adet basit göz ise ışığın yoğunluğunu, dalga boyunu ve süresini algılar. Güneş batarken yaklaşan karanlığı algılayıp arıların kovana dönmelerine sebep olur. Antenler ise koku ve tat için önemli ve aşırı derecede uçucu maddeleri analiz eder. Ayrıca antenler titreşimleri, hava hareketlerini, sesleri, sıcaklığı ve nemi algılar. Bal arısı karmaşık bir ağız yapısına sahiptir. Bal arılarının ağız sıvı besinleri emebilmesini sağlayacak şekilde gelişmiştir. Bal arıları polen gibi katı nesnelere yönetilmesi ve diğer arılarla iletişim kurmak için çenelerini kullanırlar (Winston, 1991).

Gövde bacakları ve kanatları barındırır. Her bacağın ucunda tat almaya yarayan yapılar bulunur. Her bacağın ucunda düz ve bozuk zeminlere kolayca tutunma sağlayan yapılar bulunmaktadır. Ön bacaklar antenlerin temizlemeye yarayan yapılara, ikinci çift kovana getirilen polenlerin boşaltılmasını sağlayan yapılara ve son çift ise polen taşımaya yarayan polen keselerine sahiptir (Winston, 1991).

Bütün arı türleri kanatlarındaki damar yapısı ile birbirlerinden ayrılabilir. *Apis mellifera*'nın ırklarının kanatlarındaki damar yapıları arasındaki küçük farklar

ayrımamada yardımcı olabilir. Ön kanatlar her zaman arka kanatlardan büyüktür ve bu kanatlar yaklaşık olarak 20 adet kanca ile birbirine bağlanmıştır (Winston, 1991).

Karın yedi kısımdan oluşmaktadır. İlk kısım çok daralmıştır ve arının belini oluşturur. Yedinci kısımda dişi bireylerde iğne bulunur. Karın önemli sindirim ve üreme organlarına ve bal mumu bezlerine ev sahipliği yapar (Winston, 1991).

### **1.5. Bal Arısının Sosyal Yapısı**

Bal Arıları sosyal böceklerdir bu sebeple sosyal organizasyonun gelişimini anlamada model organizma olarak görülmektedir (Tunca, 2009). Bal arılarında yaşa bağlı iş paylaşımı vardır. Gözlerden yeni çıkmış arılar tam gelişmiş değildir. Bu arılar uçamazlar ve sokamazlar. Arılar yaşamlarının ilk dört gününü bu özellikleri kazanmaya ve gözleri temizlemeye harcarlar. Bu arılara göz temizleyicileri denir. 4 ile 12 gün arası yaştaki arılar yavruları ve ana arıyı beslerler ve bunlarla ilgilenirler. Bu arılara bakıcı arılar denir. 12 ile 21 gün arası yaştaki arılar ise 2 gruba ayrılırlar. Bu grubun geçeri daha çok petek yapımı ve kovanın bakımı ile ilgilenirken daha yaşlı olanları nektarın alınması ve işlenmesi ayrıca kovan girişinin koruması ile ilgilenirler. Bu arılara orta yaşlı arılar denir. Arılar yaşlarının 22. Gününe geldiklerinde kovan dışına çıkarak tarlacı olurlar ve kovanın 4 temel ihtiyacı olan propolis, su, nektar ve poleni kovana taşırlar (Johnson, 2010).

### **1.6. Bal Arılarında Üreme Sistemi**

Erkek arı üreme sistemi; abdomenin her iki yanında 1 çift testis, testislerin çıkış kanalları olan 1 çift vas deferens, bu kanallara bağlı ve kısmen genişlemiş 1 çift seminal kese (vesicula seminalis), 1 çift mukus bezi, ejakülasyon kanalı (ductus ejaculatorius) ve çiftleşme organı (endophallus)'nı içermektedir (Mackensen ve Tucker, 1970).

Testisler abdomenin her iki tarafında bulunan bir çift yassı organdır. Testislerin her birinde vas deferensin anterior ucunda bir odacığa açılan 200 civarında küçük tüpçük (testiol) bulunmaktadır. Sperm hücreleri gelişmelerini testis tüpçüklerinde sürdürürler ve sonra ejakülasyona kadar kalmak üzere seminal keselere geçerler. Her bir testis vas deferens olarak isimlendirilen bir kanala açılmaktadır. Vas deferens, testisi uzun

ve genişlemiş kısım olan seminal keseye bağlayan kıvrımlı bölgedir. Her iki seminal kese arka uçlarından abdomenin iki tarafında bulunan bir çift büyük mukus bezinin aşağı kısmına girmekte ve her iki bez birlikte ejakülasyon kanalına, ejakülasyon kanalı ise endofallusa açılmaktadır. Endofallus; ejakülasyon kanalının açıldığı soğan, ortada serviks ve genital açıklığın son bulunduğu vestibulum olmak üzere 3 bölgeden oluşan bir organdır (Snodgrass, 1956). Çiftleşme sırasında abdomen içerisinde paketlenmiş haldeki endofallus ters-yüz olarak (eversiyon) abdomen dışına çıkar.

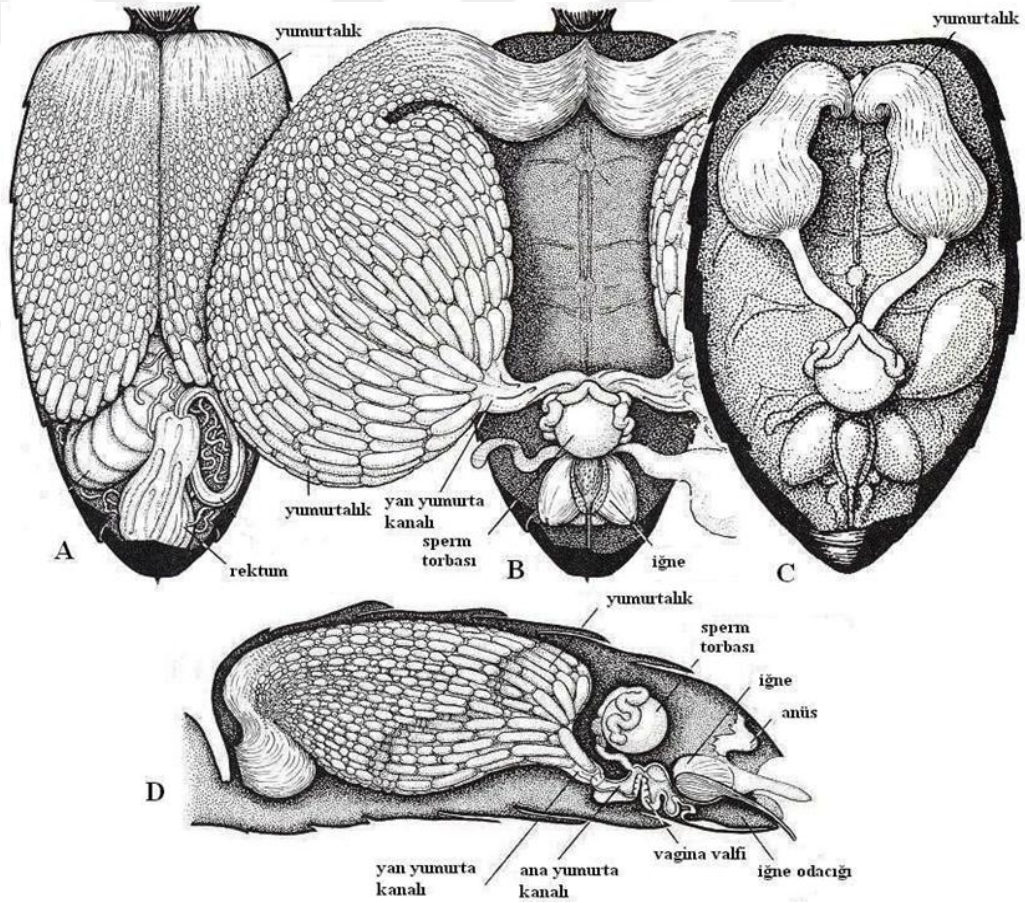
Erkek arıda testislerin gelişimi ve spermatogenez pupa aşamasında gerçekleşir. Spermatogenez erkek arının pupa döneminin 8. gününde başlar (Milne 1986). Bir erkek arı ergin birey olarak petek gözünden çıktığında spermatogenez tamamlanmıştır. Petek gözünden yeni çıkmış bir erkek arının testisleri abdomeninin neredeyse üst yarısını kaplar. Ergin yaşamın ilk haftasında spermler testislerden seminal keselere göç etmektedirler. Spermlerin testislerden seminal keselere geçişi 2-3 günlük yaşta başlayarak 12 günlük yaşa kadar sürer (Mackensen ve Tucker, 1970). Ergin çıkış sonrası sıcaklığı 35 °C, oransal nemi %25-30'a ayarlanmış bir kabinde işçi arılar ile birlikte tutulan erkek arıların seminal keselerinde 3-4 günlük yaşa ulaştıklarında 0.13 milyon, 5-6 günlük yaşa ulaştıklarında 8.69 milyon, 7-8 günlük yaşa ulaştıklarında 9.89 milyon, kolonide olgunlaşmasını tamamlayan erkek arıların seminal keselerinde ise 10.4 milyon sperm saptanmıştır (Mackensen, 1955).

Cinsel olgunlaşmış bir erkek arının testisleri küçülerek yeşilimsi sarı bir renk alır (Snodgrass, 1956). Testislerdeki küçülme ile birlikte seminal keseler ve mukus bezleri de dolmaktadır. Seminal keselerde bulunan epitel hücreler spermlerin olgunlaşması sürecinde toplam semen hacminin yaklaşık yarısını oluşturacak kadar seminal sıvı salgısı üretmektedirler (Verma ve Shuel, 1973). Sperm hücreleri seminal keselerin epitel duvarına başları ile tutunurlar ve olgunlaşmaya devam ederek motil bir yapı kazanırlar. Bu arada seminal keselerin epitel duvarındaki epitel hücreleri küçülür (Page ve Peng, 2001).

Mukus bezlerinde kas tabaka, epitel doku ve lumen olmak üzere 3 farklı katman bulunmakta ve bu katmanların kalınlığı yaşa göre değişmektedir. Seminal keseler mukus bezlerinin proksimal ucuna açılmaktadır. Mukus bezinin proksimal ucunda kas tabaka ve epitel doku kalın, lumen ise dardır. Distal uçta ise kas tabaka ve epitel doku ince, lumen geniştir. Epitel doku salgı hücrelerinin aktiviteleri ergin yaşamın ilk

günlerinde en yüksek düzeye ulaşır. Böylece mukus bezlerinde mukus üretimi erkek arının ergin çıkışından hemen sonra başlar ve 6 günlük yaşta tamamlanır. Bu yaşlarda erkek arının mukus bezlerinin lumeni beyaz renkli mukus salgısı ile dolarak şişkinleşmiştir (Moors ve ark., 2005).

Çiftleşme sırasında erkek arının karın kasları kasılarak üreme organlarında baskı meydana getirmekte endofallusun tersyüz olarak ana arının genital kanalına girmesine neden olmaktadır (Koeniger, 1986). Seminal keseler ve mukus bezlerindeki kasılmalar semenin ana yumurta kanalına ve yan yumurta kanallarına geçmesine yardımcı olmaktadır. Semen ejakülasyonunu mukus izlemektedir. Eversiyon ve ejakülasyon sonrasında erkek arı felç olarak yere düşmektedir (Woyke ve Ruttner, 1958).



Şekil 1.2 Ana Arı Üreme Organları (Dade, 1977). A, B, D yumurtlayan ana arı, C, çiftleşmemiş ana arı.

Ana arı üreme organları, sindirim kanalının hemen üzerinde, dorso-lateralde bulunan yumurtalıklar, yan yumurta kanalları, ana yumurta kanalı ve sperm torbasından oluşmaktadır. Meroyistik politrofik tipteki bir çift yumurtalıktan her biri yüzden fazla (160-180) yumurta tüpü (ovariol) içermektedir. Yan yumurta kanallarının birleşmesiyle oluşan ana yumurta kanalı kısa bir vagina ile sona ermektedir. Vaginanın üzerinde yer alan sperm torbası ise geniş ve küresel yapıya sahiptir. Sperm torbasının üzeri spermateka bezleri ile kaplıdır ve sperm torbası kısa bir kanal ile vaginaya açılır (Snodgrass, 1984).

Herrmann (1969) ana arının pars intercerebralis'inde bulunan nörosekretori hücrelerinin aktivitesinde 2 aşama belirlemiştir. İlk aşama cinsel olgunlukla aynı zamana rastlayan 6-20 günlük yaşta meydana gelmektedir. Bu dönemde nörosekretori hücrelerinin aktivitesi yüksektir. İkinci aşama ise ana arının yumurtlamaya başlamasından kısa bir süre önce gerçekleşir. Bu dönemde nörosekretori aktivitesinde azalma gözlenmektedir (Koeniger, 1986; Szabo ve ark., 1987).

Ana arıların yüksükten çıkışından sonra ilk birkaç günlük previtellogenik dönemde (3. güne kadar) henüz gelişmemiş durumdaki yumurtalıklarda folikül gelişimi engellenmektedir. Yumurta tüplerinin tüm uzantıları boyunca çapları aynı kalır ve sadece filament sonlarında daralma görülür. Yumurta tüpleri birbirlerine oldukça yakındır ve birlikte geniş bir ağ ile korunurlar. Bu genel morfoloji çiftleşmemiş ana arılarda çıkıştan 14. güne kadar devam etmektedir. Ana arıların yumurtlaması ve yumurtalık gelişimi çiftleşmeyle uyarılmaktadır. Çiftleşmelerden sonra foliküllerin büyük bir kısmı gelişmeye başlamakta ve her bir yumurta tüpünden 3-5 saatte bir olgun yumurta ovüle edilmektedir (Tanaka ve Hartfelder, 2004).

Diğer böceklerde gözlendiği gibi, ana arılarda da çiftleşmelerin beklenen doğal çiftleşme zamanını aşması durumunda vitellogenenez veya olgun yumurta hücresi üretimi başlamamaktadır. Çiftleşme ya da yumurtlamamanın engellenmesi, ana arı yumurtalıklarının küçülmesine neden olmaktadır. Ana arıların kafeslenerek yumurtlamalarının önlenmesi halinde yumurta tüplerinde dejenerasyonlar gerçekleşmektedir (Patricio ve Cruz-Landim, 2003).

Yumurtlayan ana arıların yumurtalıkları yumurtlamayan ana arıların yumurtalıklarına göre morfolojik farklılıklar gösterir. Yumurtlayan bir ana arının yumurta tüpleri daha geniş alan kaplar ve daha iyi ayırt edilebilir (Patricio ve Cruz-

Landim, 2003). Shehata ve ark., (1981)' a göre yumurtlayan ana arıların yumurtalıkları çiftleşmemiş ana arıların yumurtalıklarına göre 8 kat daha gelişmiştir.

Ana arılarda yumurtalıkların morfolojisi mevsime göre de değişebilmektedir. Yoğun yumurtlama faaliyeti ile aynı zamana rastlayan erken yaz mevsiminde yumurtalıklar nispeten daha ağır ve geniştir. Yumurtlama faaliyetinin durduğu kasım ve ocak ayları arasında ana arılar daha hafif ve küçük, yumurtalıklar ise az gelişmiştir. Erken ilkbahar döneminde yumurtlama faaliyetinin başlaması ile yumurtalıkların gelişimine paralel olarak yağ doku lipitlerinde artış, yağ doku proteinlerinde ise azalma gözlenmektedir. Yumurtlamanın yoğun olduğu yaz döneminde yağ doku stoku az, yumurtlamanın durduğu kış aylarında ise yağ doku stoku fazladır (Shehata ve ark., 1981).

Ana arı çiftleşme sırasında erkek arılardan aldığı spermleri yaşamı boyunca sperm kesesinde koruyarak yumurtladığı yumurtaların büyük çoğunluğunu bu stok sperm ile dölemektedir. Aktif yumurtlama döneminde iki yumurtlama arasında geçen süre 8-19 saniye arasında değişmekle birlikte ortalama 13 saniyedir. Ana arıların döllenmiş bir yumurta yumurtlaması için sperm torbasındaki stoktan 1-7 adet sperm salınmaktadır (Yu ve Omholt, 1999).

Ana arılar genellikle bir çiftleşme uçuşunda 7-17 erkek arı ile çiftleşirler (Woyke, 1962). Alber ve ark. (1955)'a göre ana arılar 3, 4 hatta 5 çiftleşme uçuşu yapabilmesine karşın en sık karşılaşılan çiftleşme uçuşu 2'dir (Snodgrass 1984). Ruttner (1954) ana arıların aynı gün içerisinde 2 kez çiftleşebildiklerini saptamıştır (Snodgrass 1984).

Ana arıların ilk çiftleşmeden sonra sperm torbasında bulunan sperm miktarı ikinci ve üçüncü kez çiftleşmelerin gerçekleşmesini etkilemektedir. Woyke (1962)'ye göre sperm torbasında 3 milyondan az sperm bulunan ana arıların %86'sı, 3 milyondan fazla sperm içerenlerin ise %31'i yeniden çiftleşmişlerdir. İlk çiftleşme sonrasında sperm torbasında ortalama 5.3 milyon sperm içeren ana arılar ikinci çiftleşme uçuşuna çıkmazlarken, iki kez çiftleşen ana arıların sperm torbasındaki sperm sayısı ortalama 3.5 milyon olarak bulunmuştur. Woyke (1966)'nin yürüttüğü bir başka araştırmada ise sperm torbasında ortalama 4.6 milyon spermatozoa bulunan ana arılar ikinci çiftleşme uçuşuna çıkarken, 5.9 milyon spermatozoa bulunan ana arılar ikinci kez çiftleşmemişlerdir (Koeniger, 1986). Woyke (1962)'ye göre bir kez çiftleşen ana arıların

sperm torbasında 5.057 milyon, 2 kez çiftleşenlerde 5.979 milyon, 3 kez çiftleşenlerde ise 6.975 milyon sperm bulunmaktadır.

Çiftleşme uçuşundan dönen bir ana arının döl yollarında ortalama 87 milyon sperm bulunmakta, ancak sperm torbasına sadece 5.5-5.7 milyon sperm göç edebilmektedir. Doğal çiftleşme sırasında ana arının çiftleşmeden sonra yumurta kanallarına boşaltılan semenin çok az bir kısmı sperm torbasına göç ederken geriye kalan büyük kısmı 10-20 saat içerisinde dışarı atılmaktadır. Çiftleşmeden 10 saat sonra ise sperm torbasına sperm göçü oldukça yavaşlamaktadır. İkinci çiftleşme uçuşundan dönen ana arıların üreme kanallarındaki semen miktarı, ilk çiftleşme uçuşunda aldıkları semen miktarıyla aynıdır (Woyke 1962).

Çiftleşme öncesi dönemde ana arının hemolenfinde bulunan serbest amino asit seviyesi çiftleşme ile birlikte artmaya başlamaktadır. Yumurtlamaya başlama ile birlikte yüksek bir seviyeye ulaşan serbest amino asit seviyesi tüm aktif yumurtlama dönemi boyunca sabit kalmaktadır. Çiftleşmemiş ve yumurtlayan ana arılarda amino asit seviyesi bakımından gözlenen bu değişimin, ana arının mandibula bezleri tarafından salgılanan feromonların üretiminde de oldukça benzer seyrettiği ifade edilmektedir (Hrassnigg et al. 2003).

Hermann (1969) çiftleşmemiş ana arılarda nerosekretori hücrelerinden ve Corpora allata'dan salgılanan juvenil hormonun çiftleşme uçuşlarının gerçekleşmesini etkilediğini ortaya koymuştur (Koeniger 1986).

Vitellogen yumurta hücresi gelişiminde aktif olarak kullanılan bir proteindir. Böceklerde yumurta sarısı proteini vitellinin öncüsü olan vitellogenin temel işlevi oosit gelişiminde embriyo için enerji kaynağı olmasıdır (Guidugli et al. 2005). Vitellogenin esas olarak yağ doku tarafından sentezlenip hemolenfe salınmaktadır. Yağ doku hücrelerine göre daha düşük oranlarda olmak üzere yumurtalıklarda da sentezlenebilmektedir (Lensky ve Skolnik, 1980). Ana arılarda ilk olarak pupa aşamasında hemolenfte ecdysteroid seviyesinin azalması ve juvenil hormon seviyesinin artmasıyla birlikte yağ doku hücreleri tarafından vitellogen sentezi için mRNA transkribe edilmeye başlamaktadır. Çıkıştan sonraki ilk 1 haftalık dönemde vitellogen sentezi artmaya devam etmekte ve yüksek bir platoya ulaşmaktadır. Tüm ergin yaşam ve yumurtlama faaliyeti süresince vitellogen yüksek seviyede olmaktadır (Miranda ve ark., 2003).

Ana arının beyninden salgılanan dopamin ve metabolitleri miktarının çiftleşme öncesi ve sonrası değişiminin araştırıldığı bir çalışmada; çiftleşmiş ana arıların 12 günlük yaşta iken dopamin ve metabolitlerinin miktarı, çiftleşmemiş ana arıların 6 ve 12 günlük yaştaki dopamin ve metabolitlerinin miktarından daha düşük olduğu saptanmıştır. Ana arısız kalmış işçi arıların dopamin diyeti ile beslenmesi vitellogenin sentezi ve yumurtalık gelişimini engellemektedir. Beyinde yüksek seviyedeki dopamin salgısı ve sentezinin previtellogenik dönemde yumurtalık foliküllerinin gelişimi ve yağ dokuda vitellogen sentezi üzerine doğrudan etkisi olabileceği bildirilmiştir (Harano ve ark., 2005). İşçi arılar üzerinde yapılan bir çalışmada ise düşük juvenil hormon (pyriproxyfen) seviyesinin vitellogen sentezine izin verdiği, yüksek seviyelerinin ise vitellogen sentezini engellediği ortaya konmuştur (Pinto ve ark., 2000).

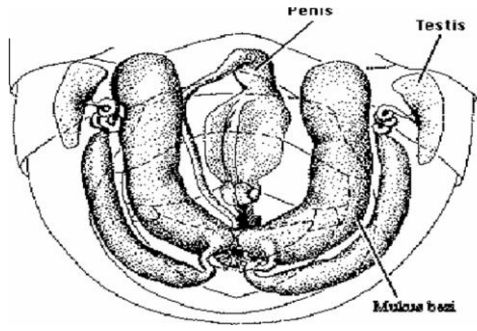
Yumurtlama faaliyetinde proktolin yumurta kanallarının kasılmalarına neden olarak yumurtlama aktivitesi üzerine önemli etkide bulunmaktadır. Ayrıca vitellogen sentezini de artıran proktolinin, yumurta gelişimi üzerinde de doğrudan etkisi bulunmaktadır (Holman ve Cook 1985; Miranda ve ark., 2003).

### **1.7. Sperma ve Bazı Spermatolojik Özellikler**

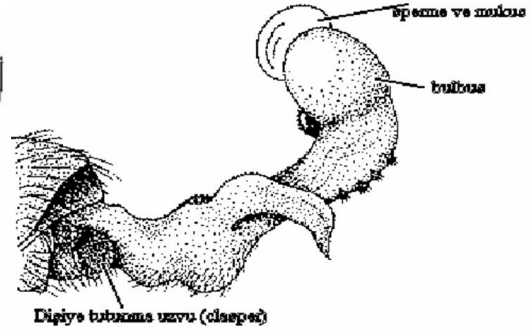
Erkek arılar hacim olarak orta büyüklüktedir. Yaşam süresi baharda 21-32 gün, yaz mevsiminde 90 gündür. Temel görevi anaarı ile çiftleşmektir. Erkek arıların üreme organları bir çift testis, vasa deferens, seminal vezikül, bir çift iri müköz salgı bezi, ejakülasyon kanalı ve penis veya endophallusdan oluşur. Spermatozoa üretimi henüz pupa dönemindeyken testislerde başlar. Genç erkek arıların abdomenleri iridir ve spermatozoa testisten henüz ayrılmadığı için ejakülasyon yetenekleri yoktur. Ergin hale geldikten birkaç gün sonra spermatozoa testislerden sperma kesesine iner ve burada depo edilirler (Akyol ve ark., 1995; Collins, 2000; Verma, 1974).

Çiftleşme sırasında sperma ejakülasyon kanalından çiftleşme organı olan endophallus'a geçer. Endophallus'un ereksiyonu (Şekil 1.4) ve mukus bezlerinden salgılanan mukusun basıncıyla sperma anaarının üreme organına bırakılır. Çiftleşme sırasında erkek arılar Endophallus'un bir kısmını anaarının abdomeninde bırakırlar ve anaarı ile çiftleşen erkek arılar çiftleştikten hemen sonra ölürler (Akyol ve ark., 1995; Verma 1974).





Şekil 1.3 Erkek Arı Üreme Organları  
(Akyol E, Şahinler NK 1995)



Şekil 1.4 Erkek Arıda Penisin Yapısı  
(Akyol E, Şahinler NK 1995)

Genel olarak erkek arıdan sperma almak kolaydır. Ancak erkek arı cinsel olgunluğa ulaşmış olmalı ve sperma kesesinde yeterince sperma bulunmalıdır. Olgun sperma sarı-krem renklidir ve 12 günlükten daha yaşlı erkeklerde bulunur. Sperma alma yöntemleri olarak el ile masaj, elektriksel uyarım, kloroform ya da eter verilmesi metodlarından birisi kullanılır. Spermadan sonra sümüksü bir madde salgılanır. Bu madde doğal çiftleşme sırasında anaarının dölyolunu tıkama işlevi görmektedir. Erkek arıdan sperma almak için en uygun zaman hava şartları eğer müsaitse öğleden sonralarıdır. Çünkü bu saatler erkek arının en aktif olduğu zamandır. Bir erkek arıdaki sperma miktarı ortalama  $1.7 \text{ mm}^3$  olup,  $1.5-1.75 \text{ mm}^3$  arasında değişmektedir (Cobey, 2003; Collins, 2000; Gençer, 1998; Schley, 1982).

Spermatozoa yoğunluğu ise ortalama  $7.5 \times 10^9$  spermatozoon/ml olup diğer hayvanlardan daha yüksektir. Erkek arıların büyüklüğü ile sperma miktarı arasında doğru orantı bulunduğundan iri gövdeli arılar tercih edilmektedir. Spermanın saklanması üzerine yapılan ilk çalışmalar, spermatozoonların yaklaşık 60 dakika sonra hareketliliğini kaybetmesinden dolayı kesintiye uğramıştır. Bu durumun spermatozoonların ölümünden değil, yalnızca hareketsiz bir döneme girmesinden kaynaklandığı sonradan anlaşılmış ve konuyla ilgili çalışmalar devam ettirilerek büyük ilerlemeler sağlanmıştır (Collins ve ark. 2000; Schley, 1982).

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

İlk olarak 1960 yılında bal arısı spermleri oda sıcaklığında 68 gün boyunca depolandıktan sonra ana arılar bu spermlerle suni olarak tohumlanmıştır. Tohumlama sonucunda sonuçların başarılı sayılabilmesi için o dönemin şartlarında ana arıların % 50'sinin döllenmiş yumurta bırakması gerektiği bildirilerek yapılan çalışmada, depolanmış spermalar ile döllen 105 ana arıdan 31 tanesinin ancak döllen yumurta bıraktığı tespit edilmiştir (Taber ve Blum, 1960).

Ana arıların taze toplanmış veya oda sıcaklığında kısa süre tutulmuş semenle suni tohumlaması günümüzde mümkündür. Balarısı semeninin oda sıcaklığında (+25 °C) veya bir buzdolabı içerisinde (+12 °C) dondurulmadan bir yıl bekletilmesi sonucu spermaların canlılık limitleri incelenmiştir (Collins, 2000). Çalışmada dondurulmadan bekletilen spermaların belli aralıklarla ölü/canlı testleri SYBR-14 ve propodium iodide boya kullanılarak dual fluorescent boyama tekniği ile yapılmıştır. Çalışma sonucunda depolanan spermaların ilk hafta sonraki canlılık kaybı önemli bulunmamıştır. Çalışmanın 6 ve 9 haftalarında canlılık %80'den %58'e düşmüş ve 39 haftaya kadar bu seviyede kalmıştır. Ancak oda sıcaklığında bekletilen spermaların 52 haftadaki canlılık oranlarının %18'e kadar düştüğü belirtilmektedir (Collins, 2000).

Oda koşullarında kısa süreli bekletilen spermaların kullanılabilirliğini takiben Kaftanoğlu ve Peng 1984 yılında bal arısı spermalarının sıvı nitrojende bir yıl veya daha uzun süre ile depolanabileceğini tespit etmişlerdir. Ancak depolanmış spermalar ile dölenen ana arıların koloninin ana arısı olması için verimli olmadığı ve depolama için daha etkili depolama solüsyonların geliştirilmesi gerektiğini bildirmişlerdir.

Hindistan cevizi suyu ve farklı doku kültürlerinin kullanılması ile oda sıcaklığında bal arısı semeni depolama çalışmasında Hindistan cevizi suyunun spermalar için kısa süreli koruyucu bir ortam olduğu bildirilmiştir. Çalışma ile bal arısı spermleri Hindistan cevizi suyunda 120. güne kadar depolanmıştır. Ancak çalışma sonunda bal arısı spermalarının 80. güne kadar canlı kaldıkları yalnızca 15 güne kadar depolanan spermaların damızlık olarak kullanılabileceğini belirtilmiştir (Almedia ve Soares., 2002). Araştırmacılar çalışma sonucunda bu yöntemin in vitro olarak bal arısı spermalarının kısa süreli depolanmasında kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Bu hipoteze destek olarak

birçok araştırmacı oda sıcaklığında bal arısı spermlerinin maksimum 2 hafta saklanabileceğini bildirmiştir (Hopkins ve Herr, 2010; Cobey, 2007).

Ana arı yüksükten çıktıktan sonraki bir haftalık yaşa ulaştığında uygun hava koşullarında koloniden ayrılarak çiftleşme uçuşuna çıkar. Çiftleşme normal şartlarda ilk uçuşta gerçekleşir ve ana arı koloniye döner. Ancak çiftleşme tamamlanmadığı takdirde (yeterli miktarda sperm alınmadığı zaman) ana arı 1 ile 4 arasında çiftleşme uçuşuna çıkabilir (Roberts, 1944). Ana arı çiftleşme uçuşunda kendisini takip eden 7 ile 44 arasında erkek arı ile çiftleşir ve koloniye döner (Taber, 1954; Moritz ve ark., 1996). Ana arılarda gerek doğal çiftleşmede ve gerekse suni tohumlamada spermler “main” ve “lateral” yumurtalık kanalı (oviduct) içerisine bırakılır ve spermler çiftleşmeden sonraki 24-48 saat içerisinde spermateka içerisine taşınır (Ruttner ve ark., 1971). Spermlerin spermatekaya taşınması ana arının abdomen kasılmaları, sperm motilitesi ve spermatekal sıvının varlığı ile mümkün olmaktadır. Çiftleşme ile erkek arılardan alınan spermlerin ancak % 3-5 gibi bir kısmı spermateka içerisinde alınarak depo edilir ve geri kalan kısmı ise ana arı tarafından dışarı atılır. Doğal çiftleşme veya suni tohumlamadan 4 saat sonra ortalama sperm canlılık oranları lateral yumurtalık kanalında % 77.3-95, spermateka içerisinde ise % 95.7-100 arasında değiştiği tespit edilmiştir (Gençer ve Kahya, 2011).

Fenotipik işaretleyiciler kullanılarak yapılan genetik çalışmalar ana arının çiftleştiği tüm erkek arılardan alınan spermlerin spermateka içerisinde rastgele dağıtıldığını göstermiştir (Page ve ark., 1984). Aynı şekilde ana arı yumurtaları dölemek için spermateka içerisindeki spermleri rastgele kullanmakta ve bu ergin hale gelen işçi arılarda net olarak görülmektedir. Her erkek arıdan farklı miktarda canlı sperm alınmasına rağmen spermatekadaki spermatozoalar arasında herhangi bir rekabet yoktur veya yok denecek kadar azdır (Woyke ve Jasinski, 1978).

Spermlerin dondurulması esnasında birçok faktör etkilidir. Bu faktörlerden kriyoprotektan toksitesi, sıcaklık hassasiyetleri, donma oranı ve soğuk şokun etkileri ile ilgili yapılan çalışma sonucunda en fazla sperma canlılığının (% 93), donma oranını 2 °C/dak. Azalarak ve % 10 DMSO kullanılan grupta olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca spermlerin +4 °C üzerindeki sıcaklıklara toleranslı olduğu bildirilmiştir (Hopkins ve Herr, 2010).

Bal arısı semeni depolama konusunda son zamanlarda yapılmış en kapsamlı çalışmalardan biri olan ve 0.25'lik plastik payetler içerisinde dondurulan bal arısı spermleri ile döllenmiş ana arılarda % 95.6 oranında işçi arı elde edilmiştir (Hopkins ve ark., 2012).

Erkek arılarda bulunan semen miktarı erkek arıların yetiştirilme şekline, miktarına ve koloninin gücüne göre değişir. Güçlü kolonilerde iyi besleme ortamı sağlanmış erkek arılardaki semen miktarı da buna bağlı olarak artmaktadır. Bu konuda yapılan bir çalışma normal vücut yapılı erkek arılar ile küçük cüsseli erkek arılarda sperm miktarları belirlenmiştir. Çalışma sonucunda normal erkek arılarda sperm miktarı 11.9 milyon olarak belirlenmişken, küçük cüsseli erkek arılarda bu miktar 7.5 milyon olarak tespit edilmiştir (Schlüns ve ark., 2003).

Bal arılarının model olarak alındığı bir çalışmada (Stürup, 2013) asosyal bal arısı erkeklerindeki sperm kalitesinin belirlenmesi amacıyla, bal arısı erkekleri üzerinde strese sebep olan erkek arıların yaşı, ortam sıcaklığı, cinsel olgunlaşma dönemindeki yetersiz beslenme ve bağışıklık sistemi düşüklüğü gibi faktörler incelenmiştir. Çalışma sonucunda gruplar bazında yaş ile sperm canlılığının yaşlı arılarda %50 oranda azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca çalışmada bağışıklık sistemi ile ilgili olarak erkek arıların bir iğne ile iğnelenmesinde sonraki 24 saatte sperm canlılığında kontrol grubuna göre önemli düşüşler gözlemlendiği bildirilmiştir (P=0.0021). Çalışmada incelenen diğer bir konu olan sıcaklığın erkek arılar üzerinde önemli etkiler gösterdiği bildirilmiştir. Bir gün süresinde 40 °C'de tutulan tüm erkek arıların öldüğü, 4 saat boyunca 42 °C'de tutulan erkek arıların % 72'sinin öldüğü bildirilmiştir (Stürup, 2013).

Bu çalışmalara benzer olarak Wegener vd., (2014) sperm depolama konusunda izledikleri farklı bir yöntem ile bal arısı semenlerini doğrudan kriyoprotektan ile karıştırma, diyaliz tüplerine alma ve diyaliz+santrifüj olmak üzere 3 farklı şekilde dondurmuş ve sonuçlarını kontrol grubu ile karşılaştırmışlardır. Çalışma sonucunda kontrol, kriyoprotektan ile karıştırma, diyaliz tüplerine alma ve diyaliz+santrifüj gruplarında işçi arı pupa oranları ortalaması sırasıyla % 100, % 45.7 (29.2-77,8), % 47.5 (25.6-72.5) ve % 27.0 (0.5-65.3) olarak bulmuşlardır. Kriyoprotektan ile doğrudan karıştırma ve diyaliz tüplerine alınan gruplarda % 77.8 ve % 72.5' e varan oranlarda işçi arı pupası elde edilmiştir.

Bal arılarında spermilerin dondurulması ve çözündürülmesi sonucunda motilitelerini test etmeye yönelik yürütülen bir çalışma ile final konsantrasyonu 1/5 olacak şekilde spermier % 0 kriyoprotektan içermeyen (kontrol), % 6 gliserol, % 6 etilen glikol ve % 6 1,2 Propanediol ile iki aşamalı sulandırılmıştır. Çözündürülme sonrası motilite ve plazma membran bütünlüğüne bakıldığında kullanım öncülüğüne göre en iyi sonucu veren kriyoprotektanlar DMSO, Etilen Glikol, Gliserol ve 1,2 Propanediol olarak belirlenmiştir. Eritme sonrası motilite ve plazma membran bütünlüğü bakımından DMSO ile dondurulan sperma, kontrol, gliserol, etilen glikol, 1,2 propanediol gruplarıyla karşılaştırıldığında en iyi sonucu vermiştir (Alçay ve ark., 2015).

Dadkhah ve ark., (2016) yaptıkları çalışmada; bal arısı sperm kalitesini farklı semen genişleticiler ve modifiye bir kriyoprezervasyon protokolü kullanarak geliştirilmesi amaçlamışlardır. Araştırmacılar çalışmalarında üç farklı genişletici kullanmışlardır. Bunlar: (1) yumurta sarısı (YS); (2) % 0.5 soya lesitini (SL0.5); ve (3) % 2 soya lesitini (SL2). Semenler toplandıktan sonra deneysel uzatıcılar ile seyreltilmişlerdir. Seyreltilen semenlerin payetlere yüklenmesi, sıvı azot ile dondurulmasını takiben motilite ve canlılık verileri, SAS yazılımının GENMOD ve GLM prosedürü kullanılarak analiz edilmiş. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, Soya lesitini (SL) tabanlı genişleticiler ile karşılaştırıldığında yumurta sarısı (YS) bazlı genişleticilerin, donma sonrası çözme işleminden sonra bal arısı semen hareketliliğini ve canlılığını daha iyi koruyabileceği sonucuna ulaşmışlardır.

Sayfutdinova, (2018) Rusya'da yaptığı bir çalışmada Merkezi Rusya Arılarının Gen Havuzundaki Erkek Arı Spermierini dondurmuş ve bu spermier ile ana arıları dölleyerek uygun sperm dondurma ve spermierin dölleme etkilerini belirlemiştir. Araştırmacı bu çalışmasında test edilmiş Kakpakov medyumuna içerisine kriyoprotektan ekleyerek dondurma ve uzun süreli saklama tekniğini uygulamıştır. Çalışma sonucunda spermier saklama ve kraliçelerin yapay tohumlama için en uygun hacimlerini belirlemiştir. Deneme sonunda araştırmacı sıvı nitrojende uzun süreli (30 aydan daha fazla) saklamada spermierin canlılık oranı %90, dölleme oranını %60 olarak tespit etmiştir.

Başta Kafkas bal arısı ırkı olmak üzere ülkemizin çeşitli bölgelerine adapte olmuş ekotiplerin (Muğla, Yığılca, Gökçeada vb.) bölgesel gen kaynakları olarak

korunması ve gelecek nesillere taşınması ülkemiz için önem arz etmektedir. Bu sebeple ülkemizde bal arısı spermasının depolanması çalışmaları bilimsel açıdan büyük bir eksiklik olarak görülmektedir.

Bu çalışmanın amacı bal arısı spermalarının dondurulması için ideal bir koruyucu çözeltinin belirlenmesidir. Bu amaçla günümüzde referans olarak kabul edilen kiev solüsyonu kontrol grubu kabul edilerek dört farklı solüsyonun arı spermalarının depolama, depolama sonrası motilite ve canlılığa etkileri test edilmeye çalışılmıştır.



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Çalışma gereçleri olan bal arısı kolonileri ve diğer semen dondurma alet ve ekipmanları (kademeli dondurma cihazı, suni tohumlama aleti, azot tankları, mikroskop vb.) ile sarf malzemeler Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fak. Zootečni Bölümü Arıcılık ve Suni Tohumlama Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

#### 3.2. Yöntem

##### 3.2.1. Erkek Arılar

Çalışmada kullanılan erkek arıların üretimi için ilkbaharda kolonilerin gelişmeye başlaması ile kolonilere boş çerçeveler verilmiş ve erkek arı petekleri elde edilmiştir. Koloniler erkek arılar cinsel olgunluğa gelinceye kadar her gün şurup ile beslenmiştir(Harbo, 1986). Erkek arılardan cinsel olgunluğa erişen ve uçuşa geçenleri toplamak üzere kolonilerin önüne ızgara konulmuş ve koloniye geri dönenleri toplanmıştır (Şekil 3.1 ve 3.2). Toplanan erkek arılar bekletilmeden laboratuvara getirilerek Schley suni tohumlama seti yardımıyla mikroskop altında semen toplama işlemi gerçekleştirilmiştir(Şekil 3.3). Toplanan semenler steril plastik eppendorf tüpler içerisine alınmıştır.



Şekil 3.1. Çalışma için erkek arıların koloni önünden toplanması



Şekil 3.2. Erkek arı toplama ve uçuş kafesleri



Şekil 3.3. Semen Toplama işlemi



Şekil 3.4. Toplanan semenin dondurma işlemi için hazırlanması



### 3.2.2. Koruyucu Çözelti Karışımı

Çalışma için kullanılan olan koruyucu solüsyonlar ve içerikleri Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Koruyucu çözeltiler ve içerikleri

Adı	İçeriği	g/100 mL Su
Kiev solüsyonu (Kontrol)	Na citrate	2.430 g
	NaHCO <sub>3</sub>	0.210 g
	KCL	0.040 g
	Sulfanilamide	0.030 g
	Glucose	0.300 g
Solüsyon 1 (Taylor, 2009)	Na citrate	2.430 g
	NaHCO <sub>3</sub>	0.210 g
	KCL	0.060 g
	Gentamisin	0.030 g
	Lysine	0.010 g
	Arginin	0.010 g
	Glucose	0.300 g
Solüsyon 2 (Taylor, 2009)	Na citrate	2.430 g
	NaHCO <sub>3</sub>	0.210 g
	KCL	0.040 g
	Streptomisin	0.030 g
	Katalaz	200 µL
Solüsyon 3 (Hopkins, 2012)	TES buffer	0.68775 g
	Tris base 30 mM	0.3634 g
	EDTA 0.01 mM	0.00037 g
	Sodium phosphate <u>dibasic</u>	0.014196 g
	Sodium citrate	0.02941 g
	Streptomycin	0.011 g
	Sucrose	0.017115 g
	Trehalose	0.01891 g
	Glucose	0.0535 g
	Arginine	0.0099 g
	Glycine	0.00075 g
	Proline	0.04950 g
	KCl	0.6113 g
NaCl	0.04850 g	
NaHCO <sub>3</sub>	0.04200 g	
Solüsyon 4 (Wegener, 2014)	Na-citrate	2.43 g
	NaHCO <sub>3</sub>	0.21 g
	KCl	0.41 g
	Trehalose	1.15 g
	HEPES	0.48 g

### 3.2.3. Spermilerin Dondurma İşlemi

Semenlerin dondurulması için kullanılan karışımlar Çizelge 3.1’de verildiği şekilde hazırlandıktan sonra her grup semen 2 ml’lik eppendorf tüpler içerisinde Çizelge 3.2’de verilen oranlarda Dimetil sülfoksit ile karıştırılarak 0.25’lik plastik payetler içerisine çekilmiş ve dondurma işlemi yapılmıştır(Şekil 3.4). Dondurma işlemi için steril bir eppendorf tüp içerisinde tüm çözeltilerle karışım yapıldıktan sonra payetlere çekilme işlemine başlanmıştır. Daha sonra payet alınarak herhangi bir şırınga ucuna takılmış ve sırasıyla; ilk önce 5 mikrolitre kiev çözeltisi çekilmiş, 4 mm boşluk bırakılarak eppendorf içindeki tüm çözeltilerle karıştırılmış olan semenden 10 mikrolitre çekilmiş, semenden sonra 4 mm boşluk bırakılarak tekrar 5 mikrolitre kiev çözeltisi çekilmiş ve şırınganın ucundan çıkarılarak her iki tarafı sıcak baskı ile kapatılmıştır(Şekil 3.5). Kapatma işlemini takiben payetler 2 saat +5 °C buzdolabında bekletilmiştir.



Şekil 3.5. Payetlere doldurulmuş ve dondurulmaya hazır semen örnekleri.

İnkübasyon süresi olan iki saatin sonunda payetler alınarak kademeli dondurma cihazına yerleştirilmiş ve sıcaklık dakikada 2 °C düşecek şekilde -40 °C’ye kadar düşürülmüştür. Sıcaklık -40 °C’ye düşünce 5 dakika bekletilmiş ve seri bir şekilde kademeli dondurma cihazından alınarak azot tankına yerleştirilmiştir(Şekil 3.6).

Spermlerin dondurulma işlemi bu şekilde tamamlandıktan sonra ana arılara suni olarak aktarılmaya kadar azot tankında bekletilmiştir. Payetler azot tankından çıkarılarak 35 °C sıcaklıktaki su içerisinde 20 saniye kadar bekletilmiştir. Bekleme sürecinde payetler sürekli sallanmış ve 20 saniyelik sürenin sonunda payetlerin semen bulunan kısmının iki ucu steril bir makas ile kesilerek suni tohumlama şırıngasına takılmış ve semen kalite testleri yapılmıştır.



Şekil 3.6. Spermlerin dondurma cihazında dondurması işlemi

Çizelge 3.2. Semen- koruyucu çözelti karışım oranları

Karışımlar	Semen	Koruyucu çözelti	DMSO	Toplam
Miktar (µl)	6	3	1	10
%	60	30	10	100

### 3.2.4. Semende Ölçülen Kalite Parametreleri

#### 3.2.4.1. Motilite Belirleme

Çalışma kapsamında erkek arılardan taze olarak toplanan spermler, mikroskop altında incelenerek motilitesine bakılmış ve değerlendirme 0 ile 5 arasında puanlanarak yapılmıştır. Çalışma için taze toplanmış spermaların hareketliliği incelenerek gözlenen

motilite 5 olarak kabul edilmiş ve buna göre uygulama gruplarının semen motilitesi görsel olarak skorlanmıştır. Buna göre ;

- 0- Hareketsiz
- 1- Çok Zayıf
- 2- Zayıf
- 3- Orta
- 4- İyi Hareketli
- 5- Çok iyi hareketli

şeklinde skollama yapılmıştır.

#### **3.2.4.2. Ölü/Canlı Sperm Sayısı**

Semen örneklerinin mikroskop altında motilitesi belirlendikten sonra spermilerin ölü ve canlılık testleri yapılmıştır. Canlılık testleri, SYBR-14 ve propidium iodide (PI) ilavesi yapıldıktan sonra örneklerin ölü/canlı oranları fluoresan bir mikroskop altında belirlenmiştir. Örneklerin hazırlanması esnasında 1 µL semen alınarak üzerine 200 µL dondurma solüsyonu, 1 µL of SYBR-14 solüsyonu, 1 µL PI eklenmiş ve 30 °C karanlık bir odada 10 dakika inkübasyon için bekletilmiştir. İnkübasyon süresinden sonra, 5 µL örnek bir lam üzerine alınarak invert mikroskop (Nikon ECLIPSE TE300, Japonya) altında incelenmiştir (Hopkins ve ark., 2012). Her grup için 3 farklı örnek alınarak lamel üzerine alınmış ve lamel üzerinde 5 farklı yerden görüntü resmi çekilerek ImageJ programı ile ölü ve canlı sperm sayıları belirlenmiştir (Rasband, 2016).

#### **3.2.4.3. Verilerin Değerlendirilmesi**

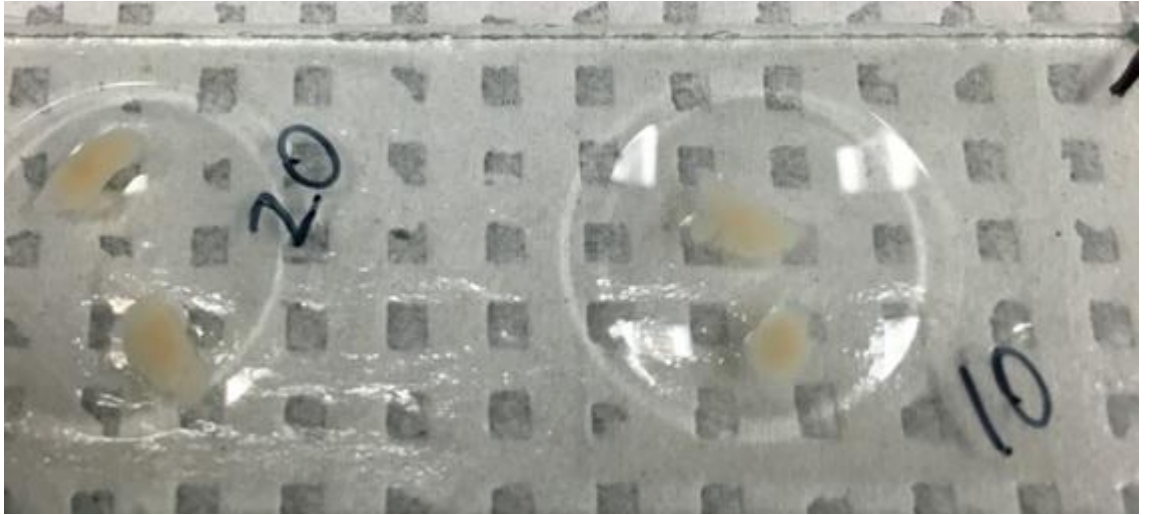
Çalışma tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuş (Bek ve Efe, 1988), sonuçları SPSS (SPSS, 2019.) paket programında yapılarak, grup ortalamaları arasındaki farklılık Duncan çoklu karşılaştırma testi ile yapılmıştır.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Motilite Belirleme

Günümüzde gerek omurgalı ve gerekse omurgasızların spermelerinin dondurulması ve çözündürülmesi sonrasında dondurma işlemi spermelerin hareketliliğine, DNA'sına ve sperm canlılığına ve motilitesine zarar vermektedir (Taylor ve ark., 2009; Soylu ve ark., 2007; Paasch ve ark., 2004). Günümüzde bal arısı spermelerinin sıvı azotta muhafaza edilmesi için çeşitli çalışmalar yapılmış ve spermelerin dondurulmasında çeşitli sulandırıcılar ve yöntemler geliştirilmiştir (Gül ve ark., 2017) .

Bu çalışmada da bal arısı spermelerinin dondurulmasında kullanılan bazı sulandırıcıların bal arısı spermelerinin motilitesi ve canlılıklarına etkilerini belirlemek amacıyla 5 farklı solüsyonun dondurma sonrası etkileri incelenmiştir. Bal arısı erkeklerinden toplanan semenin dondurma ve çözündürme işlemlerinin ardından kalite parametreleri incelenmiştir. Bunun için dondurulan her payetten 3'er mikrolitre semen alınarak şekil 4.1'de görüldüğü şekli ile bir çukur lam üzerine konulmuş ve mikroskop altında motiliteleri belirlenmiştir.



Şekil 4.1. Semen örneklerinin lam üzerine alınması

Semen örneklerinin kalite parametrelerinin incelenmesi sonucunda motilite değerleri çizelge 4.1.'de verilmiştir. Çizelge incelendiğinde en fazla motilitenin

4.60±0.49 ile 3 numaralı solüsyonda olduğu görülmektedir. Bu solüsyonu 4.47±0.62 ile 4 numaralı solüsyon takip etmektedir. Bu solüsyonları solüsyon 2, solüsyon 1 ve kontrol grubu solüsyonlar sırasıyla 3.87±0.50, 3.73±0.57 ve 2.67±0.60 ortalama değerleri ile takip etmektedir. Çözme işlemini takiben yapılan motilite testlerinde uygulama gruplarının tamamı kontrol grubuna oranla yüksek bulunmuştur.

Çizelge 4.1. Semen dondurma solüsyonları

Koruyucu çözeltiler	Motilite
Solüsyon 1	3.73±0.57 b
Solüsyon 2	3.87±0.50 b
Solüsyon 3	4.60±0.49 a
Solüsyon 4	4.47±0.62 a
Kontrol	2.67±0.60 c

Çalışmada elde edilen motilite değerlerine ait verilerde yapılan istatistiki analizler (Çizelge 4.2.) sonucunda gruplar arasındaki farklılığın önemli olduğu belirlenmiştir (P<0.05).

Çizelge 4.2. Motilite varyans analiz tablosu

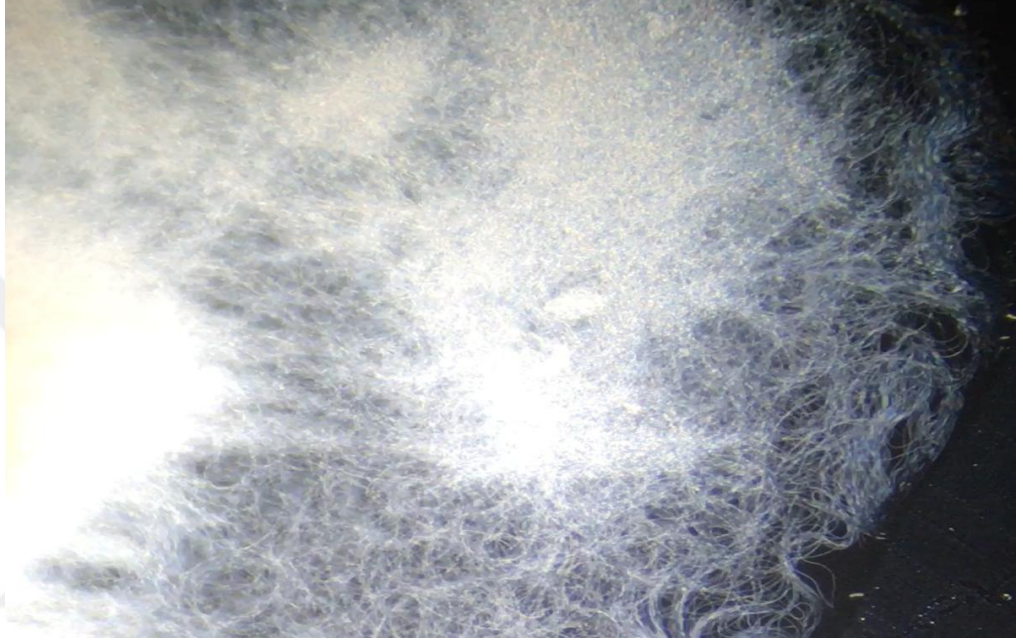
Kaynak	Tip III		Kareler		F	Sig.
	Kareler	sd	Ortalaması			
Düzeltilmiş Model	35.333 <sup>a</sup>	4	8.833	26.500	.000	
Sabit	1121.333	1	1121.333	3364.000	.000	
Grup	35.333	4	8.833	26.500	.000	
Hata	23.333	70	.333			
Toplam	1180.000	75				
Düzeltilmiş Toplam	58.667	74				

a. R Kare = .602 (Düzeltilmiş R kare = .580)

Çalışmamızda solüsyon-3 ve solüsyon-4 gruplarında elde ettiğimiz motilite değeri Gül ve ark., (2017)'nin yapmış oldukları çalışmalarında kullandıkları semenin motilitesi ile benzer bulunmuştur. Diğer 3 grup olan solüsyon-1, solüsyon-2 ve kontrol grubu motilite değerleri ise araştırmacıların kullandıkları semen motilitesinden düşük bulunmuştur.



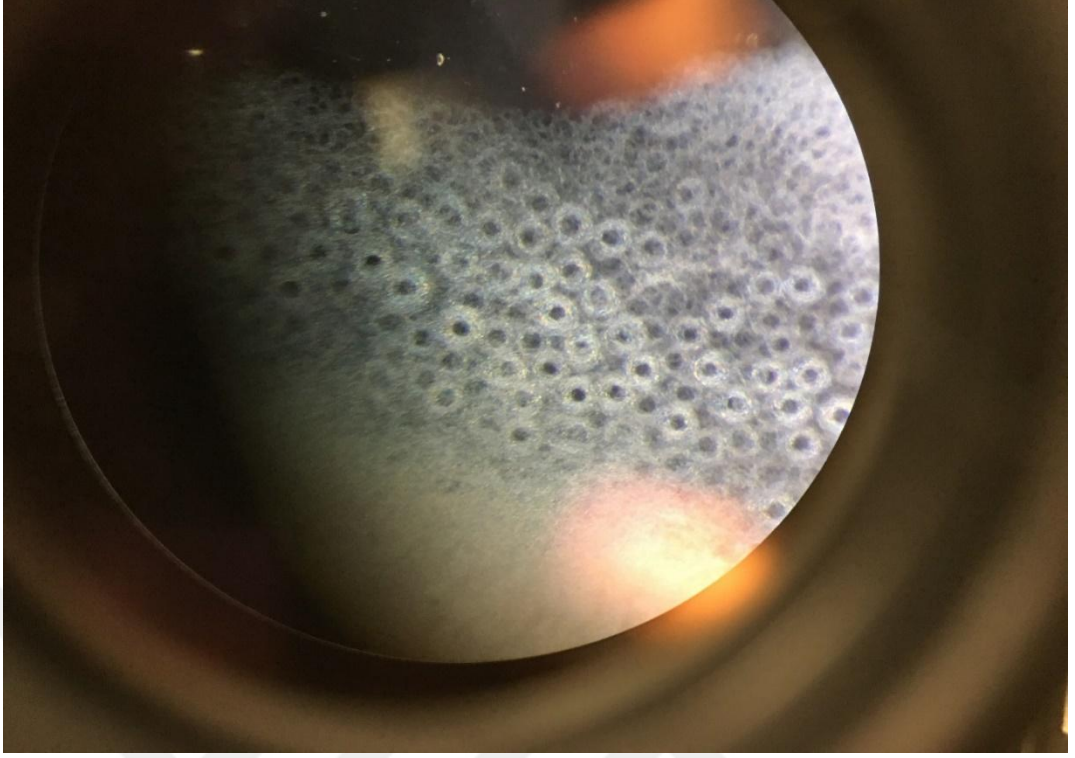
Alçay ve ark., (2014) yaptıkları çalışmada kontrol, gliserol, etilen glikol, 1,2 propandiol ve DMSO grubunda dengelenmiş semen motilitesini sırasıyla. 2.2, 3.0, 3.7, 3.4 ve 3.8 olarak bulmuşlardır. Araştırmacıların elde ettikleri motilite değerleri bu çalışmadaki kontrol, solüsyon 1 ve solüsyon 2 gruplarında tespit edilen değerlere benzer, solüsyon 3 ve solüsyon 4 gruplarından ise düşük bulunmuştur.



Şekil 4.2. Solüsyon 1 grubuna ait spermelerin dairesel motilite testleri



Şekil 4.3. Solüsyon 2 grubuna ait spermelerin dairesel motilite testleri



Şekil 4.4. Solüsyon 3 grubuna ait spermilerin dairesel motilite görüntüsü



Şekil 4.5. Solüsyon 4 grubuna ait spermilerin dairesel motilite görüntüsü





Şekil 4.6. Kontrol grubuna ait spermilerin motilite görüntüsü

#### 4.2. Ölü/Canlı Sperm Sayısı

Bal arısı spermelerini sıvı azotta dondurarak depolama başarısı üzerine kullanılan solüsyon, metot, donma ve çözme hızı, kullanılan koruyucular son derecede etkilidir. Dolayısı ile doğru metod ile birlikte diğer faktörlerinde doğru seçilmesi dondurma başarısını artırmaktadır (Gül ve ark., 2017). Bal arılarında sperm depolama çalışmaları oldukça zor bir işlem gerektirdiğinden Dünya’da çok fazla çalışma yapılmayan bakir bir alan olarak kalmıştır. Ancak, son yıllarda teknolojinin gelişmesi ile birlikte bal arılarında da semen depolama çalışmalarında yükselen bir ivme görülmüştür. Her ne kadar fizyolojik ve anatomik yapıları farklılık gösterse de bal arısının semen depolama çalışmalarında diğer memeli hayvanların semen depolama çalışmalarında kullanılan yöntemlerden faydalanılmıştır. Diğer alanlarda da olduğu gibi semen dondurma ve çözme işlemi sonunda motilitenin veya % canlılığın iyi olması başarılı bir dondurma işleminin olduğu anlamını taşımaz. Özellikle bal arılarında motilite ile canlılığın çok iyi olması ve bununla birlikte DNA hasarının da olmaması gerekmektedir. Bilindiği üzere diğer çiftlik hayvanlarında milyonlarca sperm tek bir yumurtayı dölemek için bir performans gösterir. Ancak bu durum bal arılarında farklıdır. Ana arı abdomeninde sperm kesesinde biriktirmiş olduğu spermelerden her yumurta için sadece 10-20 tane kullanır. Dolayısı ile bal arısında sperm dondurma işleminin kusursuz ve büyük bir

başarı ile yapılması gerekmektedir. Diğer çiftlik hayvanlarında dondurma başarısı çok düşük olsa bile yumurtayı dölleme şansı çok yüksektir. Bu çalışmada da diğer çalışmalardaki bazı veriler ışığında yapılan dondurma işlemi sonucunda spermilerin Ölü/Canlılık oranları belirlenmiş ve Çizelge 4.3’de verilmiştir. Çizelge incelendiğinde en fazla % canlılık oranının Solüsyon 4 grubunda % 59.80 oranında olduğu görülmüştür. Solüsyon 4 grubunu % 58.15 ile solüsyon 3 grubu, % 38.13 ile solüsyon 2, % 34.05 ile solüsyon 1 ve % 25.70 ile kontrol grubu takip etmektedir. Çalışmada tüm deneme gruplarının ortalaması ise % 43.17 olarak belirlenmiştir. Çözme işlemi takiben yapılan ölü/canlı spermatozoa testlerinde canlı spermatozoa sayısı bakımından uygulama gruplarının tamamı kontrol grubuna oranla yüksek bulunmuştur.

Çizelge 4.3. Canlı / Ölü sperm sayıları

Gruplar	Canlı sperm sayısı	Ölü sperm sayısı	Canlı Sperm Oranı %
Solüsyon 1 (Taylor, 2009)	57.13±0.64 bc	110.66±0.99 b	34.05
Solüsyon 2 (Taylor, 2009)	61.87±0.98 b	100.40±0.64 c	38.13
Solüsyon 3 (Hopkins, 2012)	116.33±1.06 a	83.73±1.20 d	58.15
Solüsyon 4 (Wegener, 2014)	106.13±0.42 a	71.33±1.17 e	59.80
Kontrol (Kiev solüsyonu)	47.20±1.05 c	136.20±1.05 a	25.70
Ortalama ± S.Hata	77.03±0.83	100.47±1.01	43.17

Çalışmada elde edilen ölü/canlı sperm oranlarına ait verilerde yapılan istatistiki analizler sonucunda gruplar arasındaki farklılığın önemli olduğu belirlenmiştir ( $P < 0.05$ ). Bal arılarında semen depolamada günümüzde genel olarak kriyoprotektif ajan olarak dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılmaktadır. Ancak DMSO’nun spermatozoanın genetik materyalinde hasara neden olduğu düşünülmektedir (Wegener, 2012). Bütün bu faktörlere rağmen DMSO, dondurma- çözülme sonrası sperm canlılık oranının yüksek olmasını sağlamaktadır. Yani bu güne kadar sperm dondurmada en fazla kullanılan ve en iyi sonucu veren kriyoprotektif ajan DMSO olmuştur (Collison, 2012; Alçay, ve ark., 2014; Gül ve ark., 2107). Bu çalışmada tüm gruplarda kriyoprotektif ajan olarak DMSO kullanıldığından tüm gruplar üzerindeki etkisi eşittir. Dolayısı ile çalışmada kullanılan solüsyonlar sperm canlılığı ve motilitesi üzerinde değişik etkiler göstermiştir. Özellikle

solüsyon 3 ve solüsyon 4 günümüzde kullanılan en etkili solüsyonlar olduklarından bu çalışmada da en yüksek motilite ve canlılık sonuçlarını vermiştir.

Çizelge 4.4. Canlı sperm oranı varyans tablosu (%)

Kaynak	Bağımlı Değişken	Tip III Kareler Toplamı	sd	Kareler Ortalaması	F	Önemlilik
Grup	% Canlılık	14117,699	4	3529,425	264,828	,000
	Canlı sperm sayısı	58573,733	4	14643,433	73,066	,000
	Ölü sperm sayısı	37645,067	4	9411,267	73,007	,000
Hata	% Canlılık	932,907	70	13,327		
	Canlı sperm sayısı	14028,933	70	200,413		
	Ölü sperm sayısı	9023,600	70	128,909		
Toplam	% Canlılık	152889,386	75			
	Canlı sperm sayısı	525788,000	75			
Düzeltilmiş Toplam	Ölü sperm sayısı	803685,000	75			
	Canlılık	15050,606	74			
Düzeltilmiş Toplam	Canlılık ham	72602,667	74			
	Ölü ham	46668,667	74			

a. R Kare = ,938 (Düzeltilmiş R Kare = ,934)

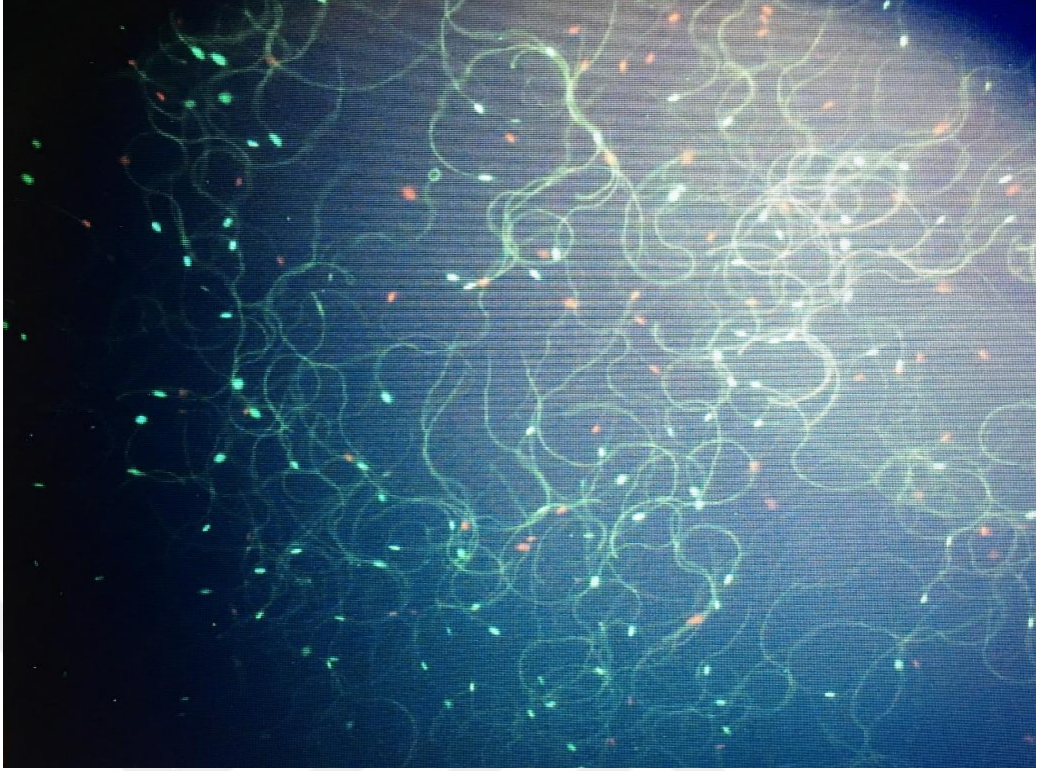
b. R Kare = ,807 (Düzeltilmiş R Kare= ,796)

c. R Kare = ,807 (Düzeltilmiş R Kare = ,796)

Dadkhah ve ark.(2016) yaptıkları çalışmada yumurta sarısı (YS) , soya lesitini %0.5 (SL0.5) ve soya lesitini %2 (SL2) gruplarında canlı spermatozoa yüzdesini sırasıyla; yumurta sarısı için % 69.75 ±% 2.32 , SL0.5 için % 38.5 ± 2.32 ve SL2 için ise % 45 ± 2.32 olarak belirlemişlerdir. Araştırmacıların elde ettikleri canlı spermatozoa değerleri çalışmamızda solüsyon 1 ve solüsyon 2 gruplarında elde edilen canlılık değerlerine benzer, solüsyon 3 ve solüsyon 4 gruplarında elde edilen canlılık değerlerinden ise yüksek bulunmuştur.

Benzer şekilde Stucky ve ark.( 2008)'nin yaptıkları çalışmada DMSO, DMSO ile yavaş dondurma, gliserolle hızlı dondurma ve gliserolle yavaş dondurma uygulamalarında canlı spermatozoa yüzdesini incelemişlerdir. Araştırmacılar bu gruplara ait canlı spermatozoa oranını sırasıyla %93.8, % 78.84, % 38.9 ve % 26 olarak bulmuşlardır. Araştırmacıların elde ettikleri spermatozoa değerleri solüsyon 1 ve solüsyon 2 gruplarından elde edilen canlılık değerlerine benzer, solüsyon 3 ve solüsyon 4 grubundaki değerlerden ise yüksek bulunmuştur.

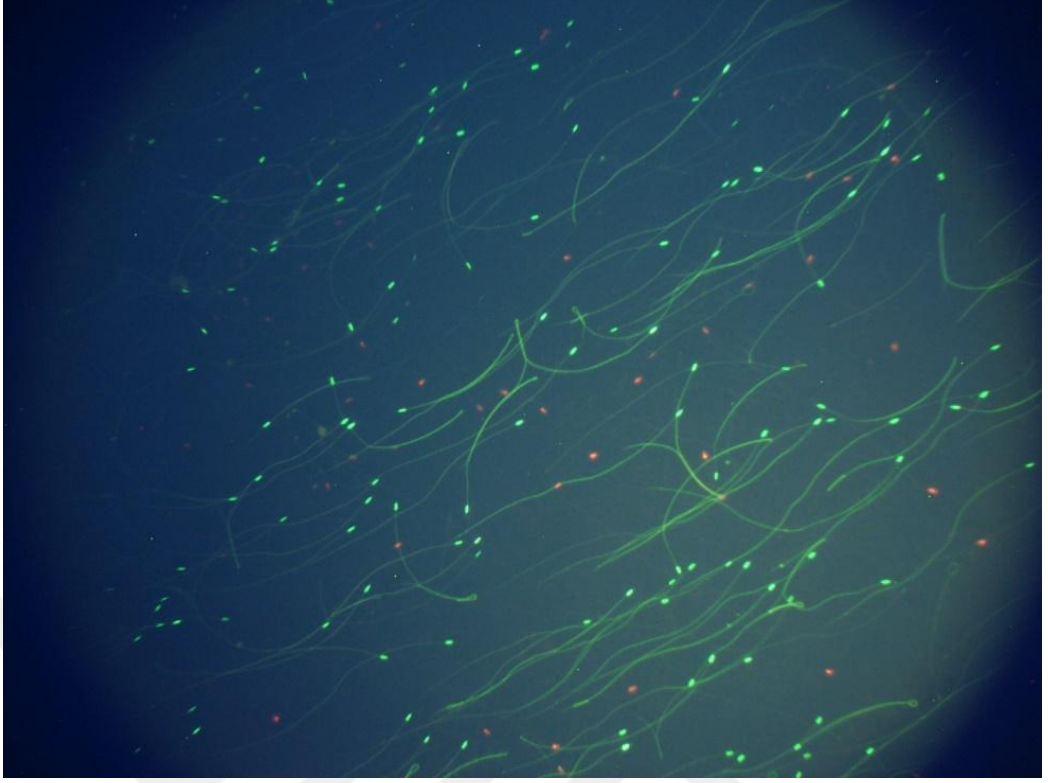




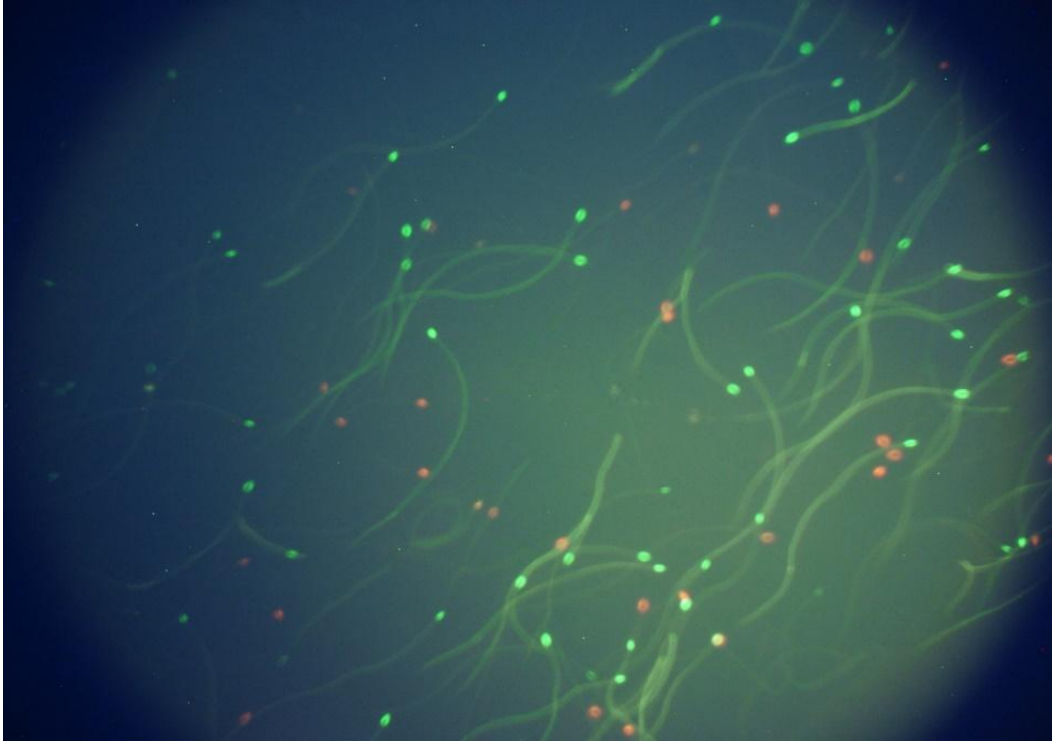
Şekil 4.7. Solüsyon 1 grubuna ait spermlerin mikroskop altındaki canlılık görüntüsü



Şekil 4.8. Solüsyon 2 grubuna ait spermlerin mikroskop altındaki canlılık görüntüsü

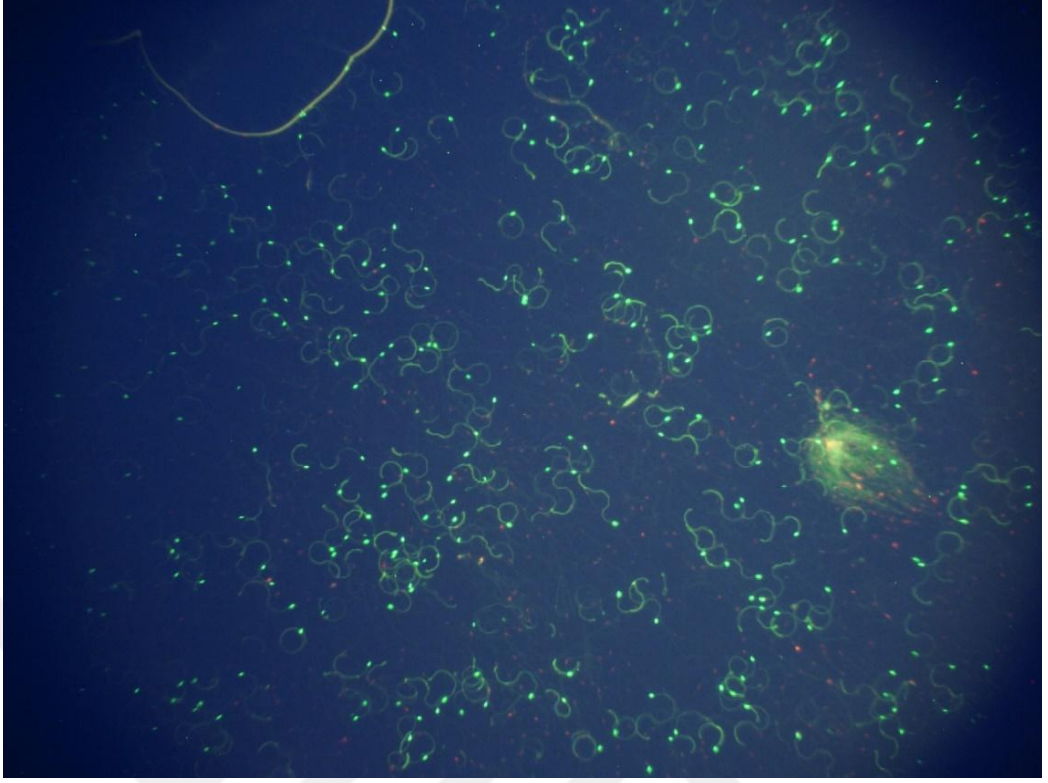


Şekil 4.9. Solüsyon 3 grubuna ait spermelerin mikroskop altındaki canlılık görüntüsü



Şekil 4.10. Solüsyon 4 grubuna ait spermelerin mikroskop altındaki canlılık görüntüsü





Şekil 4.11. Kontrol grubuna ait spermilerin mikroskop altındaki canlılık görüntüsü

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada, solüsyonlara ilaveten neredeyse tüm sperm dondurma protokollerinde kullanılan DMSO kriyoprotektif ajan yerine alternatif ajanların da araştırılması önem arz etmektedir. Çünkü bilindiği üzere DMSO dondurma esnasında iki yönlü etki göstermektedir. Hücre içi sıvı ile yer değiştirmesi ile gösterdiği olumlu fayda yanında hücrelere olan toksik etki ile de olumsuz etkileri mevcuttur (Hopkins ve ark., 2012; Wegener, 2014; Gül ve ark., 2017). Çalışmada, DMSO ilave edilmiş 5 farklı sulandırıcı uygulaması kullanılan bu çalışma sonucunda elde edilen veriler ışığında yeni çalışmaların yapılması ve etkili solüsyonlar üzerinde çalışmaların yapılması gerekliliği ortaya çıkmıştır.

1. Semen dondurma sonucunda yapılan spermatolojik muayeneleri takiben, fertilité çalışmalarının da yapılması,
2. Sulandırıcı solüsyonları ve kriyoprotektif ajanların kullanıldığı çalışmalarda özellikle spermatozoanın morfolojik muayenesi ve DNA hasar analizlerinin yapılması,
3. Spermatozoon membran parametreleri üzerindeki bulguların geliştirilmesiyle dondurma işlemlerindeki ‘deneme yöntemleri’ni, biyomühendislik boyutuna taşınması ve spermatozoon biyodinamiğine açıklık kazandırması beklenmektedir. Bu sayede; gelecekteki arı sperması dondurma işlemlerinde önemli başarıların sağlanacağı ve bu durumun direkt olarak sun’i tohumlama uygulamalarına yansıtacağı açıktır.
4. Yeni kriyoprotektan solüsyon çalışmaları, sperm depolama yöntemlerinin geliştirilmesi, çalışma sonuçları ile elde edilen motilité skor oranı yüksek spermelerin ana arıların tohumlanmasında kullanılması ve böylece yüksek oranda işçi arı elde edilmesi metodunun ticari arıcılıkta kullanılmasına imkân sağlayacaktır.
5. Yeni kriyoprotektan solüsyonlarının geliştirilmesi, yerli arı ekotiplerinin korunması çalışmaları için önem arz etmektedir.
6. Bu alanda akademik personelin yetişmesi ve yeni çalışmaların yapılması gereklidir.

## KAYNAKLAR

- Ak, K., Cirit, Ü., Nur, Z., Bacınoğlu, S., Pabuççuoğlu, S., Özdaş, Ö., Birler, S., 2010. Effects of extender osmolarity, cooling rate, dilution rate and glycerol addition time on post-thaw ram semen characteristics and fertilization. **İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, 36 (2), 33-46
- Akyol, E., Şahinler, N.K., 1995. Bal arılarında yapay tohumlamanın uygulanması. **Teknik Arıcılık Dergisi**, 49: 6-12
- Alçay, S., Üstüner, B., Çakmak, İ., Çakmak, S., Nur, Z., 2015. Effects of various cryoprotective agents on post-thaw drone semen quality. **Kafkas Univ. Vet. Fak. Dergisi**, 21 (1), 31-35.
- Almeida, R., Soares A.E.E., 2002. Usage of green coconut water and different tissue culture media for in vitro honey bee semen storage (*Apis mellifera*; Hymenoptera: Apoidea). **Interciencia**, 27, 317-321.
- Baudot, A., Alger, L., Boutron, P., 2000. Title differs from pubmed: consider replacing with glass-forming tendency in the system water-dimethyl sulfoxide glass-forming tendency in the system water - dimethyl sulfoxide. **Cryobiology**, 40, 151-158.
- Bek, Y., Efe, E., 1988. Araştırma ve deneme metodları 1. Adana: Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Ders Kitabı.
- Ben Abdelkader, F., Kairo, G., Tchamitchian, S., Cousin, M., Senechal, J., Crauser, D., Brunet, J. L., 2014. Semen quality of honey bee drones maintained from emergence to sexual maturity under laboratory, semi-field and field conditions. **Apidologie**, 45(2), 215–223.
- Choe, J. C., Crespi, B.J., 1997. The evolution of mating systems in insects and arachnids. Cambridge: Cambridge University Press.
- Cobey, S.W., 2003. Honey bee breeding program. instrumental insemination in honey bees. The Ohio State University. Cobey.1@osu.edu.
- Cobey, S.W., 2007. Comparison studies of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee queens and factors affecting their performance. **Apidologie**, 38, 390–410.
- Collins, A. M., Donoghue, A. M., 1999. Viability assessment of honey bee, *Apis mellifera*, sperm using dual fluorescent staining. **Theriogenology**, 51(8), 1513–1523.
- Collins, A.M., 2000. Survival of honey bee (hymenoptera: apidae) spermatozoa stored at above-freezing temperatures. **Journal of Economic Entomology** 93(3), 568-571.
- Collison, C., Sheridan, A., 2012. A closer look - drone semen storage. **Bee culture**, 8, 21-25,
- Dade, H.A., 1977. Anatomy and dissection of the honeybee. **Internatiol Bee Research Association**. London. 158 pp.
- Dadkhah, F., Nehzati-Paghaleh, G., Zhandi, M., Emamverdi, M., Hopkins, B. K., 2016. Preservation of honey bee spermatozoa using egg yolk and soybean lecithin-based semen extenders and a modified cryopreservation protocol. **Journal of Apicultural Research**, 55(4), 279-283.
- Doolittle, G.M., 1899. Scientific queen-rearing as practically applied : being a method by which the best of queen-bees are reared in perfect accord with nature's ways. Chicago : George W. York, 126 pp.



- Eljarah, A., Chandler, J., Jenkins, J. A., Chenevert, J., Alcanal, A., 2013. Usefulness of hemocytometer as a counting chamber in a computer-assisted sperm analyzer, 708–711.
- FAO, 2016. Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO <http://www.fao.org/faostat/en/#data>, Erişim: 15.12.2017
- Genç, F., Dodoloğlu, A., 2011. Arıcılığın temel esasları ders kitabı. Atatürk Üniversitesi Yayınları, (931).
- Gençer, H.V., 1998. Bal arılarında yapay tohumlama. **Hayvancılık Araştırma Dergisi**, 8: (1-2), 39-51.
- Gençer, H.V., Kahya, Y., 2011. The viability of sperm in lateral oviducts and spermathecae of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee (*Apis mellifera* L.) queens, **Journal of Apicultural Research**, 50(3), 190-194
- Gobin, B., Ito, F., Peeters, C., Billen, J., 2006. Queen-worker differences in spermatheca reservoir of phylogenetically basal ants. **Cell Tissue Res.**, 326, 169-178.
- Guidugli, K.R., Piulachs, M.D., Bellés, X., Lourenço, A.P. and Simões Z.L.P. 2005. Vitellogenin expression in queen ovaries and in larvae of both sexes of *Apis mellifera*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, 59: 211-218.
- Gupta, R. K., Reybroeck, W., van Veen, J. W., Gupta, A., 2014. Beekeeping for poverty alleviation and livelihood security vol. 1: **Technological aspects of beekeeping**, Chapter 2, DOI: 10.1007/978-94-017-9199-1\_2.
- Gül, A., Şahinler, N., Onal, A. G., Hopkins, B. K., Sheppard, W. S., 2017. Effects of diluents and plasma on honey bee (*Apis mellifera* L.) drone frozen-thawed semen fertility. **Theriogenology**, 101, 109-113.
- Gül, A., 2014. Arı ölümleri, sebepleri ve alınması gereken tedbirler. **Arıcılık Araştırma Dergisi**, 11, 2-4.
- Han, F., Wallberg, A., Webster, M. T., 2012. From where did the western honeybee (*Apis mellifera*) originate?, **Ecology and Evolution**, DOI: 10.1002/ece3.312.
- Harano, K., Sasaki, K. and Nagao, T., 2005. Depression of brain dopamine and its metabolite after mating in European honeybee (*Apis mellifera*) queens. **Naturwissenschaften**, 92: 310-313.
- Harbo, J. R., 1979. Storage of honeybee spermatozoa at  $-196^{\circ}\text{C}$ . **Journal of Apicultural Research**, 18(1), 57–63.
- Harbo, J. R., 1983. Survival of honey bee (hymenoptera: apidae) spermatozoa after two years in liquid nitrogen ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). **Annals of the Entomological Society of America**, 76(5), 890 LP-891.
- Harbo, J.R., 1976. Survival of honey bee spermatozoa in Liquid Nitrogen, **Ann. Entomol. Soc. Am.**, 70, 257–258.
- Harbo, J.R., 1979. Storage of honey bee spermatozoa at  $-196^{\circ}\text{C}$ , **J. Apic. Res**, 18, 57–63.
- Harbo, J.R., 1985. Instrumental insemination of queen bees. **Am. Bee J**, 125, 197-202.
- Harbo, J.R., 1986. Propagation and instrumental insemination. **Bee Genetics and Breeding**. Editör: Rinderer, T.E. Orlando, Florida: Academic Press. Inc.
- Herrmann, H., 1969. Die neurohormonal kontrolle der paarungsflüge und der eilegetätigkeit bei der bienenkönigin. **Zeitschrift für Bienenforschung**, 9, 09–544.
- Holman, G.M., Cook, B.J., 1985. Proctolin, its presence in and action on the oviduct of an insect. **Comp. Biochem. Physiol. C**, 80(1): 61-64.

- Hopkins BK, Herr C. 2010 Factors affecting the successful cryopreservation of honey bee (*Apis mellifera*) spermatozoa. **Apidologie**, 41, 548-556.
- Hopkins, B. K., Herr, C., Sheppard, W. S., 2012. Sequential generations of honey bee (*Apis mellifera*) queens produced using cryopreserved semen. **Reproduction, Fertility, and Development**, 24(8), 1079–83.
- Hopkins, B.K., Herr, C., 2010. Factors affecting the successful cryopreservation of honey bee (*Apis mellifera*) spermatozoa, **Apidologie**, 41, 548-556.
- Hopkins, B.K., Herr, C., Sheppard, W.S., 2012. Sequential generations of honey bee (*Apis mellifera*) queens produced using cryopreserved semen. **Reprod Fertil Dev.**, 24 (8),1079-83.
- Hrassnigg, N., Leonhard, B., Crailsheim, K., 2003. Free amino acids in the haemolymph of honey bee queens (*Apis mellifera* L.). **Amino acids**, 24(1-2), 205-212.
- İvgin Tunca, R., 2009. Determination and comparison of genetic variation in honeybee (*Apis mellifera* L.) populations of turkey by random amplified polymorphic dna and microsatellite analyses, Doktora tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, ANKARA.
- James, D., Pham-Delegue, M.H., 2002. Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals book.
- Jhonson, B. R., 2010. Division of labor in honeybees: form, function, and proximate mechanisms. **Behav Ecol Sociobiol**, DOI 10.1007/s00265-009-0874-7.
- Johnson, L. S., 2011. *Apis mellifera* (honey bee) a teacher's companion, med prodject, Antioch University New England, Antioch.
- Kaftanoğlu, O., Peng, Y., 1984. Preservation of honeybee spermatozoa in liquid nitrogen, **J. Apic. Res**, 23, 157–163.
- Koeniger, G., 1986. Reproduction and mating behavior, in: bee genetics and breeding, Rinderer, T.E. (ed.), Academic Press Inc., pp. 255-280, London.
- Lensky, Y., Skolnik, H., 1980. Immunochemical and electrophoretic identification of the vitellogenin proteins of the queen bee (*Apis mellifera*). **Comp. Biochem. Physiol.**, 66: 185-193.
- Mackensen, O., 1955. Experiments in the technique of artificial insemination of queen bees. **Journal of Economic Entomology**, 48(4), 418–421.
- Mackensen, O., Tucker, K.W., 1970. Instrumental insemination of queen bees. agriculture handbook no: 390, Agricultural Research Service, USDA, Washington, USA, 28 pp.
- Martin, G., Sabido, O., Durand, P., Levy, R., 2004. Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. **Biol Reprod**, 71, 28-37.
- Melnichenko, A.N., Vavilov, Y.L., 1976. Long term storage of drone semen by freezing in liquid nitrogen SP S Kennan, **Soviet Agric. Sci**, 1, 34–36.
- Milne, C.P., 1986. Cytology and cytogenetics. In: Rinderer, T.E. (ed.), *Bee Genetics and Breeding*, pp. 205–233, Academic Press, Inc., London, UK.
- Miranda, C.R.E., Bitondi, M.M.G., Simões, Z.L.P., 2003. Effect of proctolin on the egg-laying activity of *Apis mellifera* queens. **Journal of Apicultural Research**, 42(3): 35-38.
- Moors, L., Spaas, O., Koeniger, G., Billen, J., 2005. Morphological and ultrastructural changes in the mucus glands of *Apis mellifera* drones during pupal development and sexual maturation. **Apidologie**, 36(2), 245–254.

- Moritz, R.F.A., Kryger, P., Allsopp, M.H., 1996. Competition for royalty in bees, **Nature**, 384:31.
- Neubauer, D.M., Wolfner, M.F., 1999. Wise, winsome, or weird mechanisms of sperm storage in female animals, **Curr Topics Dev Biol**, 41, 67-97.
- Nur, Z., Cakmak, S., Ustuner, B., Cakmak, I., Erturk, M., Abramson, C.I., Sağırkaya, H., Soylu, M.K., 2012. The use of hypo-osmotic swelling test, water test, and supravital staining in the evaluation of drone sperm. **Apidologie**, 43, 31-38
- Paasch, U., Sharma, R.K., Gupta, K.A., Grunewald, S., Mascha, E.J., Thomas, A.J., Glander, H.J., Agarwal, A., 2004. Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. **Biol Reprod**, 71, 1828-1837.
- Page, R., Kimsey, R., Laidlaw, H., 1984. Migration and dispersal of spermatozoa in spermathecae of queen honeybees (*Apis mellifera* L.), **Experientia**, 40, 182-184.
- Page, R.E., Peng, C.Y.S., 2001. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. **Experimental Gerontology**, 36(4-6), 695–711.
- Patricio, K., Cruz-Landim, C., 2003. *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apini) ovary development in queens and in workers from queenright and queenless colonies. **Sociobiology**, 42(3): 771-780.
- Pinto, L.Z., Bitondi, M.M., Simoes, Z.L., 2000. Inhibition of vitellogenin synthesis in *Apis mellifera* workers by a juvenile hormone analogue, pyriproxyfen. **J. Insect Physiol.**, 46(2): 153-160.
- Rasband, W. S., 2016. ImageJ, U. S. National Institutes of Health. Bethesda, Maryland, USA. Retrieved from <http://imagej.nih.gov/ij/> 1996-2016
- Roberts, W.C., 1944. Multiple mating of queen bees proved by progeny and flight tests, **Gleanings Bee Culture**, 72, 255-260.
- Ruttner, F., Enbergs, H., Kriesten, K., 1971. The fine structure of the spermatheca of the queen bee (*Apis mellifera* L.)”, **Apidologie**, 2, 67–97.
- Sayfutdinova, Z.N., 2018. Merkezi Rusya arılarının gen havuzunun korunmasında ana arıların yapay tohumlanması ve saklanmış erkek arı sperminin kullanılması, VI. Uluslararası Muğla Arıcılık ve Çam Balı Kongresi. 15-19 Ekim 2018, Muğla.
- Schley, P., 1982. Arılarda aletli dölleme üzerine pratik bilgiler. Giessen Üniversitesi, Almanya (Türkçe Çeviri).
- Schlüns, H., Schlüns, E.A., Van Praagh, J., Moritz, R.F.A., 2003. Sperm numbers in drone honeybees (*Apis mellifera*) depend on body size, **Apidologie**, 34, 577-584.
- Shehata, S.M., Townsend, G.F., Shucle, R.W., 1981. Seasonal physiological changes in queen and worker honeybees. **Journal of Apicultural Research**, 20(2): 69 - 78.
- Snodgrass, R.E., 1956. Anatomy of the honey bee. Comstock Publ. Assoc., 334 p., Ithaca, New York, USA.
- Snodgrass, R.E., 1984. Anatomy of the honeybee. Comstock Publishing Associate New York.
- Soylu, M.K., Nur, Z., Ustuner, B., Dogan, I., Sağırkaya, H., Gunay, U., Ak, K., 2007. Effects of various cryoprotective agents and extender osmolality on post-thaw ram semen. **Bull. Vet. Inst. Pulawy**, 51, 241-246.

- SPSS, 2019. SPSS for Windows. Version 22.0, SPSS Inc., Chicago.
- Stucky, M., Hopkins, B.K., Herr, C., 2008. Cryopreservation of honey bee spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, 20(1), 127-128
- Stürup, M., Baer-Imhoof, B., Nash, D.R., Boomsma, J.J., Baer, B., 2013. When every sperm counts: factors affecting male fertility in the honeybee (*Apis mellifera*), **Behav. Ecol.**, 24(5), 1192-1198.
- Szabo, T.I., Peter, F.M., Heikel, D.T., 1987. Effect of honeybee queen weight and temperature on the initiation of oviposition. **Journal of Apicultural Research**, 26(2): 73-78.
- TAB, 2014. Arıcılık bilgileri. Türkiye Arıcular Birliği. <http://www.tab.org.tr>, Erişim: 15.12.2015
- Taber, S., Blum, M.S., 1960. Preservation of honey bee semen, **Science**, 131 (3415), 1734-1735.
- Taber, S.I., 1954. The frequency of multiple mating of queen honey bees, **J.Econ. Entomol.**, 47, 995–998.
- Tanaka, E.D., Hartfelder, K., 2004. The initial stages of oogenesis and their relation to differential fertility in the honey bee (*Apis mellifera*) castes. **Arthropod Structure & Development**, 33: 431-442.
- Taylor, M.A., Guzmán, Novoa E, Morfin N, Buhr MM., 2009. Improving viability of cryopreserved honey bee (*Apis mellifera* L.) sperm with selected diluents, cryoprotectants, and semen dilution ratios. **Theriogenology**, 72, 149-159.
- Verma LR (1974) Honeybee spermatozoa and their survival in the queen spermatheca. **Bee World**, 55(2):53-61.
- Verma, L.R. 1983. Effect of deep freezing on the survival of the honey bee (*Apis mellifera* L.) spermatozoa. **Am. Bee J**, 123, 851–852.
- Verma, L.R. and Shuel, R.W. 1973. Respiratory metabolism of the semen of the honeybee, *Apis mellifera*. **Journal of Insect Physiology**, 19(1), 97–103.
- Watson, P.F., Fuller B.J. 2001. Principles of cryopreservation of gametes and embryos. in: cryobanking the genetic resource: wild life conservation for the future. Editör: Watson, P.F., Holt W.V. London: CRC Press.
- Wegener J, Bienefeld K., 2012. Toxicity of cryoprotectants to honey bee semen and queens. **Theriogenology**, 77, 600-607, 2012.
- Wegener, J., May, T., Kamp, G., Bienefeld, K., 2014. A successful new approach to honeybee semen cryopreservation. **Cryobiology**, 69(2), 236–42.
- Wegener, J., May, T., Kamp, G., Bienefeld, K., 2014. New methods and media for the centrifugation of honey bee (Hymenoptera: Apidae) drone semen. **Journal of Economic Entomology**, 107(1), 47–53.
- Winston, M. L., 1991. The Biology of the Honey Bee, Harvard University Press, Boston.
- Woyke, J, Jasinski Z. 1978. Influence of age of drones on the results of instrumental insemination of honeybee queens. **Apidologie**, 9, 203-212.
- Woyke, J. 1962. Natural and artificial insemination of queen honeybees. **Bee World**, 43:21-25.
- Woyke, J., Ruttner, F. 1958. An anatomical study of the mating process in the honeybee. *Bee World*, 39(1), 3–18.
- Yu, R. and Omholt, S.W. 1999. Early developmental processes in the fertilised honeybee (*Apis mellifera*) oocyte. **Journal of Insect Physiology**, 45: 763-767.
- Zayed, A., 2009. Bee genetics and conservation, **Apidologie**, DOI: 10.1051/apido/2009026.

## ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Bayburt'ta doğdu. İlkokul öğrenimini Niğde'de, Lise öğrenimini Ankara'da tamamladı. Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü'nü 2009 yılında kazandı. Üniversiteden 2014 yılında mezun oldu. Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Zootečni Anabilim Dalından 2019 yılında Yüksek Lisans derecesiyle mezun oldu. 2009 yılında Hatay Havaalanı Meteoroloji Ofisi'nde başladığı istidlalci görevine halen devam etmektedir.

