

**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**ALABALIK SPERMLERİNİN  
KISA SÜRELİ MUHAFAZA KOŞULLARINA  
ADAPTASYONU**

**Ali Özcan BABAOĞLU**

Su Ürünleri Yetiştiricilik Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 504.04.01

**Sunuş Tarihi: 13.08.2007**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet Ali CANYURT**

**Bornova-İZMİR**



Sayın **Ali Özcan BABAÖĞLU** tarafından **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak sunulan “**Alabalık Spermlerinin Kısa Süreli Muhafaza Koşullarına Adaptasyonu**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve **13.08.2007** tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

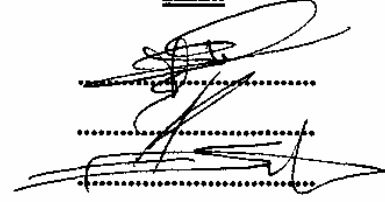
**Jüri Üyeleri:**

**Jüri Başkanı :** Prof. Dr. Mehmet Ali CANYURT

**Raportör Üye:** Doç. Dr. Sabina SAKA

**Üye :** Prof. Dr. Süleyman ÇELİK

**İmza**





**ÖZET****ALABALIK SPERMLERİNİN KISA SÜRELİ MUHAFAZA  
KOŞULLARINA ADAPTASYONU**

BABAOĞLU, Ali Özcan

Yüksek Lisans Tezi, Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Bölümü

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Mehmet Ali CANYURT

Ağustos 2007, 120 sayfa

Tez kapsamında, Manisa ve Tire'deki alabalık işletmelerinden temin edilen alabalıklardan elde edilen spermın 0 °C'deki buz ile kısa süreli muhafaza koşullarına adaptasyonu yöntemi incelenmiştir ancak spermelerde hareketlilik görülmemiştir. Fethiye'de fotoperiyot uygulayan bir alabalık işletmesindeki araştırmada, 0 °C'deki buz üzerinde bekletilen spermelerde yaklaşık 5 saatlik süre boyunca hareketlilik gözlenmiş fakat daha sonra denenen kuru buz ile sperm muhafaza yönteminde sperm hareketliliği görülmemiştir.

Tüm bu araştırmalar sonucunda spermelerin hareketli olmamasının en önemli sebebinin genetik sorunlar ve ülkemize çoğunlukla yabancı ülkelerden gelen yumurta ve yavrularda gerçek anlamda saf erkek bireyler bulunmaması olduğu kanaatine varılmıştır. Bu sebeple işletmelerin, kendi damızlık ünitelerini kurmaları gerektiğinin altı çizilmiş ve bireyleri kendilerinin yetiştirmesi ile bu sorunların aşılacağı gerçeği vurgulanmıştır.

**Anahtar sözcükler:** Alabalık, sperm, muhafaza, sperm koruyucu, payet, buz, kuru buz, sıvı azot.



**ABSTRACT**

**ADAPTATION OF TROUT SPERM TO THE SHORT TERM  
CRYOPRESERVATION CONDITIONS**

BABAOĞLU, Ali Özcan

MSc in Faculty of Fisheries Aquaculture Department

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet Ali CANYURT

August 2007, 120 pages

In this thesis, the adaptation to the short term cryopreservation conditions method with 0 °C ice of sperm which were taken from the trout farms in Manisa and Tire was examined but there wasn't seen motility at sperms. In the research that was done in the trout farm which applied photoperiod in Fethiye, the motility of sperm at 0 °C ice had been observed during five hours but after that there wasn't seen sperm motility at the tested sperm cryopreservation method with dry ice.

In conclusion of all these researches, it has been thought that the most important reason of non motile sperms were the genetic problems and non pure males in really which were come to our country mostly from foreign countries. Because of this, the necessity about building of broodstock units by farm owners was underlined and the reality of solving the problems by the help of aquaculture of these fishes by farm owners, was emphasized.

**Keywords:** Trout, sperm, cryopreservation, cryoprotectant, straw, ice, dry ice, liquid nitrogen.





**TEŞEKKÜR**

Özellikle kıymetli görüşlerinden yararlandığım ve yakın ilgilerini esirgemeyen, tezin biçimlenmesinde ve uygulamaların gerçekleştirilmesinde değerli katkılarını aldığım başta tez danışmanı hocam Prof. Dr. Mehmet Ali CANYURT olmak üzere bölüm hocalarımdan Doç. Dr. Şahin SAKA, Arş. Gör. Dr. Muhammet ALTUNOK'a, Manisa, Tire ve Fethiye'deki çalışmalar süresince gerekli uygulamaların yapılmasında kolaylık gösteren tüm işletme sahibi ve çalışanlarına, ayrıca destekleriyle bana güç veren sevgili aileme teşekkürü bir borç bilirim.



## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	V
ABSTRACT .....	VII
TEŞEKKÜR .....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	XV
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	XVII
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....	6
3. SPERM, YAPISI, SPERM İLE İLGİLİ KAVRAMLAR .....	12
3.1 Erkek Germ Hücresinin Morfolojisi.....	12
3.2. Testisler.....	18
3.2.1. Spermatogenetik hücreler.....	18
3.2.2. Sertoli hücreleri .....	19
3.3. Spermatogenesis .....	19
3.4. Spermiogenesis.....	21
3.5. Sperma .....	23
4. MATERYAL VE YÖNTEM.....	25
4.1. Erkek Üreme Organlarının Muayenesi.....	25
4.1.1. Sperma numunesi .....	25
4.2. Spermanın Muayenesi ve Değerlendirilmesi .....	25
4.2.1. Spermanın makroskopik muayenesi .....	26

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<u>Sayfa</u>
4.2.2. Spermanın mikroskopik muayenesi .....	28
4.2.3. Spermanın fiziksel ve kimyasal özelliklerinin muayenesi.....	41
4.2.4. Spermanın bileşimi .....	45
4.2.5. Spermanın mikrobiyolojik muayenesi .....	47
4.2.6. Spermanın değerlendirilmesi .....	47
4.3. Spermanın Alınması, Saklanması ve Suni Tohumlama.....	48
4.3.1. Spermanın alınması .....	49
4.3.2. Aygırdan spermanın alınması.....	53
4.3.3. Boğadan spermanın alınması .....	54
4.3.4. Koçtan spermanın alınması .....	56
4.3.5. Tekeden spermanın alınması.....	57
4.3.6. Köpekten spermanın alınması .....	59
4.3.7. Kediden spermanın alınması .....	60
4.3.8. Spermanın saklanması .....	60
4.3.9. Aygır spermasının dondurulması .....	65
4.3.10. Boğa spermasının dondurulması .....	67
4.3.11. Koç spermasının dondurulması .....	68
4.3.12. Teke spermasının dondurulması.....	69
4.3.13. Köpek spermasının dondurulması .....	70
4.3.14. Suni tohumlama.....	71
4.3.15. Atlarda suni tohumlama .....	71
4.3.16. Sığırlarda suni tohumlama .....	73
4.3.17. Koyunlarda suni tohumlama .....	74
4.3.18. Keçilerde suni tohumlama.....	75

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<u>Sayfa</u>
4.3.19. Köpeklerde suni tohumlama .....	76
4.4. Balıklarla İlgili Yapılan Sperm Muhafaza Çalışmaları .....	77
4.5. Proje Kapsamında Yapılan Sperm Muhafaza Çalışmaları .....	81
5. BULGULAR.....	85
6. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	89
KAYNAKLAR DİZİNİ .....	97
EKLER .....	111
Ek 1. Resim 1, Manisa İlindeki Araştırma Yapılan Alabalık Çiftliğinden Genel Görünümler .....	113
Ek 2. Resim 2, Çalışmalarda Kullanılan Plastik Tüpler.....	113
Ek 3. Resim 3, Alabalıkların Yakalanmasıyla Genital Bölgelerinin Temizlenmesini Takip Eden İşlemlerden Görünümler.....	114
Ek 4. Resim 4, Alabalıkların Genital Bölgelerinin Temizlenmesinden Sonra Balıklara Masaj Yoluyla Uygulanan Sağım Yönteminden Görünümler.....	115
Ek 5. Resim 5, Spermilerin Sağıldıktan Sonra İçine Konulacakları Saklama Kapları İçindeki Buzlar Üzerinde Bekletilen Muhafaza Tüplerinden Genel Görünümler.....	116
Ek 6. Resim 6, Tire'deki Alabalık Tesisinden Genel Görünümler.....	117
Ek 7. Resim 7, Fethiye'deki Çalışmalarda Kullanılan Pastör Pipetler ...	118
Ek 8. Resim 8, Fethiye'deki Çalışmalarda Kullanılan Kuru Buz ve Spermilerin Kuru Buz İçindeki Deliklere Konulduktan Sonraki Tablet (Pelet) Haline Dönüşmüş Şekillerinden Görünümler.....	119
ÖZGEÇMİŞ.....	120



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. 2005 yılı itibariyle Türkiye’de yetiştiricilik üretiminin türlerine göre dağılımı .....	2
1.2. Alabalık sperm muhafaza döngüsü .....	4
3.1. İnsanda olgun sperm.....	14
3.2. İnsan sperminin görünüşü.....	15
3.3. İnsan spermi örnekleri .....	17
3.4. Değişik balık türlerinin spermelerinden görünüşler .....	17
4.1. Mikroskopik bakıda kitle hareketlerinin değerlendirilmesi .....	29
4.2. Hemositometrik yöntemde kullanılan sayım lamı ve sulandırma pipeti .....	32
4.3. Hücre sayım lamı ve sayım sahalarının mikroskopta görünümü .....	33
4.4. Elektronik sayaç .....	35
4.5. Değişik türden spermatozoaların görünüşleri .....	38
4.6. Hannover modeli suni vajen .....	50
4.7. Değişik suni vajen modelleri .....	51
4.8. Boğadan suni vajenle sperma alınması.....	56
4.9. Koçtan suni vajenle sperma alınması .....	57
4.10. Tekeden suni vajenle sperma alınması .....	58

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)**

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.11. Köpeklerden masaj yöntemi ile sperma alınması.....	59
4.12. Sperma dondurma yöntemleri .....	64
4.13. Dondurulmuş spermanın muhafaza edildiği konteyner.....	66
4.14. Kısıraklarda vajinal yolla tohumlama yöntemi .....	72



**ÇİZELGELER DİZİNİ**

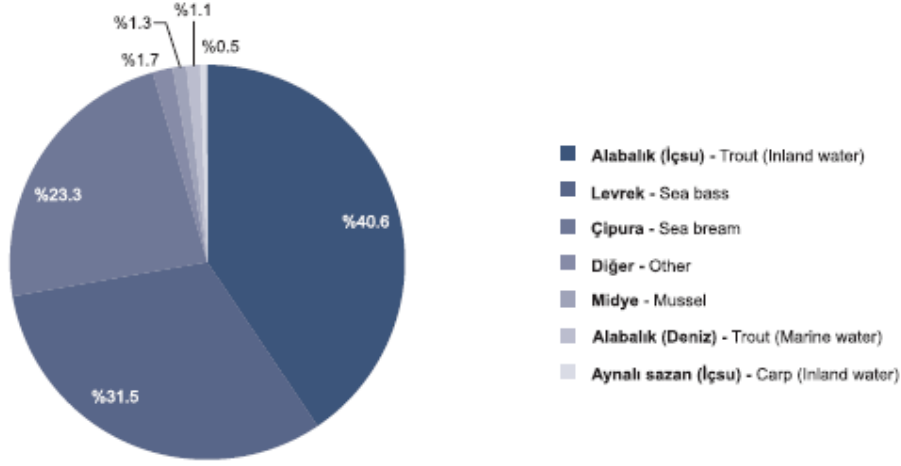
<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. 2005 yılı itibariyle Türkiye’deki tüm illerin türlere göre toplam yetiştiricilik üretimi .....	2
4.1. Değişik türden hayvanlarda ve insanda başlıca spermatolojik özelliklere ilişkin ortalama değerler .....	41
4.2. Değişik türlerde doğal sperma plazmasında bulunan früktoz miktarları.....	44
4.3. Değişik türden hayvanlarda spermatozoonda yer alan DNA miktarları.....	46
4.4. Spermanın kimyasal bileşimi.....	48
5.1. Sağım sonucunda erkek alabalıkların kaydedilen ağırlık, boy, en ve tüp içindeki sperm hacim değerleri .....	85
5.2. Erkek alabalıklardan alınan sperm örneklerinin Thoma lamında sayım sonuçları.....	86
5.3. Uygulamada kullanılan erkek alabalıkların 1 ml’deki sperm sayıları .....	87
5.4. Sağım sonucunda erkek alabalıkların kaydedilen ağırlık, boy, en değerleri .....	88



## 1. GİRİŞ

Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), ekonomik değerinin yüksek oluşu nedeniyle üzerinde en fazla araştırma yapılan balık türlerinden birisidir. Gall ve Crandell'e göre (1990) muhtemelen sazan (*Cyprinus carpio*) dan sonra kültürü yapılan ilk türdür. İlk yetiştiricilik çalışmaları, Kuzey Amerika'da 1874 yılında gökkuşığı alabalığı yumurtalarının, McCloud Irmağı'ndan Kuzey Kaliforniya'daki özel bir kuluçkahaneye taşınarak kuluçkalanmasıyla başlamıştır. Daha sonraları ise 1877 yılında Japonya'ya, 1885 yılında İngiltere'ye getirilmiştir (Akhan ve Canyurt, 2005).

Türkiye'de gökkuşığı alabalığı üretimi, 1970'li yıllarda dışarıdan getirilen yumurtalarla başlamıştır (Canyurt, 1985). Günümüzde ise gökkuşığı alabalığı kültürü yapılan en önemli tür konumundadır. Gökkuşığı alabalığı üretimi, gerek potansiyel su kaynaklarının üretime alınması gerekse yetiştiricilikte karşılaşılan problemlerin (kaliteli yem, hastalıklara karşı mücadele, vb.) çözülmüş olması nedeniyle her geçen yıl artarak devam etmektedir (Akhan ve Canyurt, 2005). Bunu ülkemiz açısından bir şekil ve tablo ile özetlemek istersek alabalık yetiştiriciliğinin ne kadar önemli olduğu açıkça ortaya çıkmaktadır. Şekil 1.1'de 2005 yılı itibarıyla ülkemizde yetiştiricilik üretiminin türlerine göre dağılımı açısından alabalığın diğer türlere göre en fazla paya sahip olduğu görülmektedir.



Şekil 1.1. 2005 yılı itibariyle Türkiye’de yetiştiricilik üretiminin türlerine göre dağılımı (T.C. Başbakanlık Türkiye İstatistik Kurumu, 2007).

Kültür balıklarının türlere göre dağılımında en yüksek yetiştiriciliği yapılan balık, içsulardaki alabalık miktarı olup, toplam su ürünleri yetiştiriciliğinin % 40.6’sını oluşturmaktadır. Bunu % 31.5 ile levrek, % 23.3 ile çipura takip etmektedir. Midye, alabalık (deniz) ve aynalı sazan (iç su) üretimleri de diğerlerini takip etmektedir. Çizelge 1.1’de yine 2005 yılında elde edilen istatistik verilerine göre Türkiye’deki tüm illerin türlere göre toplam yetiştiricilik üretimi dağılımına baktığımızda yine alabalığın en önemli tür olduğu görülmektedir.

Toplam	İç su		Deniz				
	Alabalık	Aynalı sazan	Alabalık	Çipura	Levrek	Midye	Diğer
118 277	48 033	571	1 249	27 634	37 290	1 500	2 000

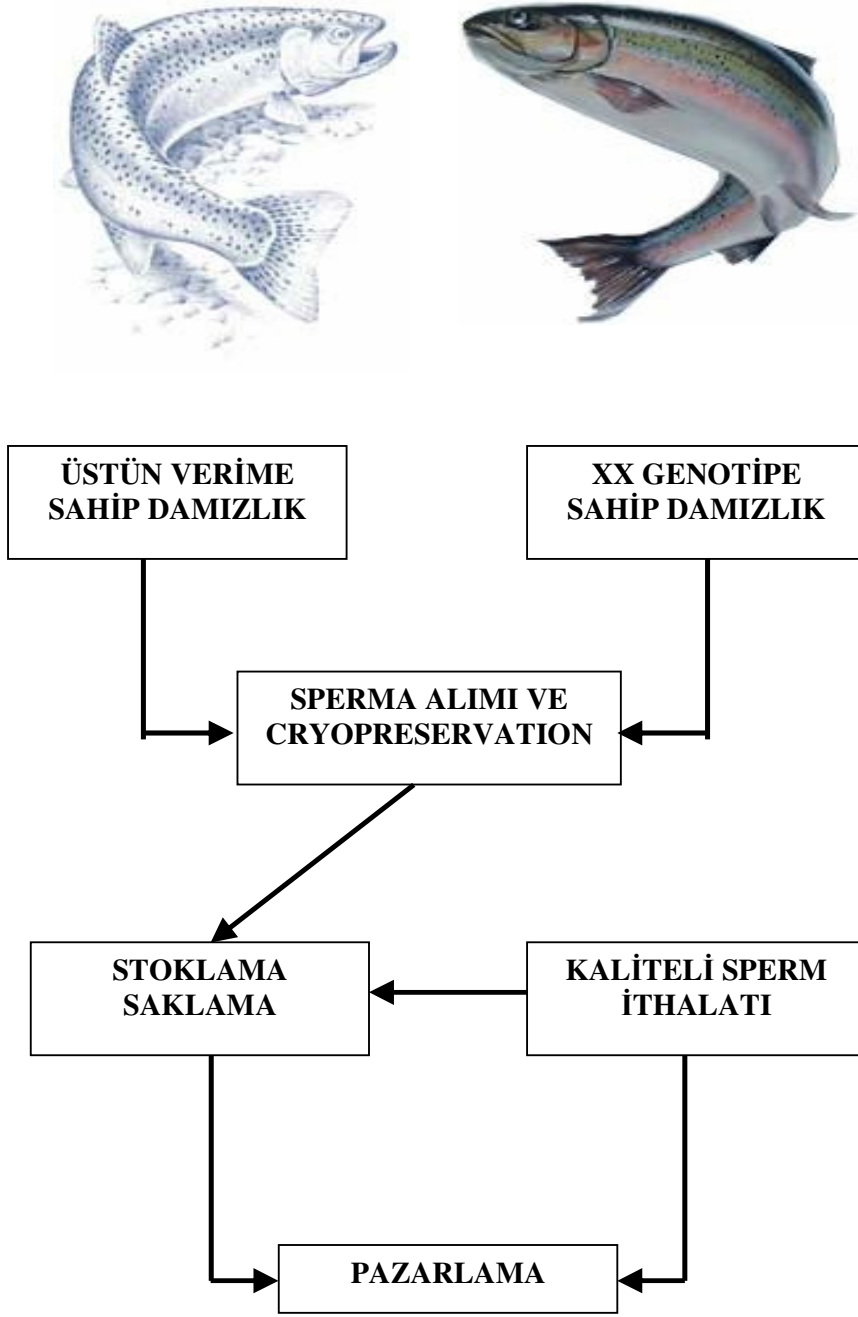
Çizelge 1.1. 2005 yılı itibariyle Türkiye’deki tüm illerin türlere göre toplam yetiştiricilik üretimi (ton) (T.C. Başbakanlık Türkiye İstatistik Kurumu, 2007) .

Canyurt'un 2005 yılında EBİLTEM (Ege Üniversitesi Bilim-Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi) proje pazarındaki sunumunda belirttiğine göre ülkemizdeki su potansiyelinin değerlendirilmesiyle birlikte tatlı sularda alabalık (*Oncorhynchus mykiss*), denizde ise çipura (*Sparus aurata*) ve levrek (*Dicentrarchus labrax*) yetiştiriciliği her geçen yıl artarak sürdürülmektedir. Ancak üreticiler yetiştiricilikle ilgili birçok sorunu çözmüş olsalar bile halen damızlık ve damızlıklardan elde edilen kaliteli gamet temininde sorunlar yaşamaktadırlar.

Günümüzde su ürünleri üretimi yapan kuluçkahane sayısı binlerle ifade edilecek sayıya ulaşmıştır. Yetiştiricilerin genel eğilimi daha fazla yavru üretmektir. Bu nedenle üretimde kullanılan damızlıkların verim özellikleri dikkate alınmamaktadır. Üretim yapılacak yeni potansiyel alanların giderek azalması, su ürünleri yetiştiriciliğindeki artış hızını ileride sınırlandıracaktır. Bu nedenle üretimin sürdürülebilmesi için üretimde üstün verim özelliklerine sahip gamet kullanılması zorunlu olacaktır.

Yetiştiricilikte kaliteli gametler, ıslah edilmiş hatlardan veya biyoteknolojik olarak manipüle edilmiş hatlardan elde edilmektedir. Örneğin; kısa sürede büyüyen ve hastalıklara karşı dayanıklı ve yem değerlendirme katsayısı yüksek gökkuşağı alabalığı hatları geliştirilmiştir. Aynı zamanda erkek alabalığa kıyasla daha fazla karkas ağırlığına sahip, % 100 dişi populasyon üretiminde kullanılan, XX genotipe sahip erkek damızlıklar üretilmektedir.

Ülkemiz açısından bakıldığında sperm muhafaza çalışmalarının geliştirilmesi ile üstün verim özelliklerine sahip balık hatlarının veya XX genotipe sahip erkek damızlıklara ait spermanın dondurularak stoklanması, taşınması ve ihtiyaç duyulan işletmelere pazarlanması sağlanabilecektir. Bu açıklamalar ışığında sperm muhafaza ile ilgili döngüyü özet olarak şekil 1.2'de görebiliriz.



Şekil 1.2. Alabalık sperm muhafaza döngüsü (Canyurt, 2005).

Yetiştiriciliği yapılan alabalıkların üreme dönemi çevresel şartlara bağlı olarak Kasım-Mart ayları arasında gerçekleşmektedir. Ancak birçok işletmede dişi ve erkek damızlıklar arasında, üreme döneminde görülen senkronizasyon bozukluğu nedeni ile bazen dişilerden yumurta alındığı halde erkek bireylerden süt alınamamakta veya bunun tersi olmaktadır. Bu durumda üretici, dişilerden yumurta sağımı yaptığında erkek anaçlar sperma vermediği için sağılan yumurtalar döllenmemektedir. Sonuç olarak yumurtalar ziyan olmakta veya erkekler olgunlaştığı halde dişilerden yumurta alınamadığında ise sperma kaybı söz konusu olmaktadır. Bu da üreticilerin, ekonomik kayıplara uğramasına yol açmaktadır (Canyurt vd., 2003).

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Canyurt vd., (2003), balık spermasının başarılı bir şekilde muhafaza edilmesinin su ürünleri yetiştiriciliğinde önemli avantajlar sağladığını belirtmiştir. Sperma muhafazası sayesinde gamet transferi daha rahatlıkla gerçekleştirilebilmektedir. Üstün verime sahip hatlara ait spermelerin başka işletmelere nakledilmesi veya yabancı formlara ait genlerin kuluçkahane stoklarına aktarımında muhafaza teknikleri kullanılmaktadır (Cloud ve diğ., 1990). Damızlık alabalıkta testislerde gelişen spermanın, ilerleyen zaman içerisinde kullanılmadığı takdirde yaşlanarak kalitesi düşmektedir. Muhafaza sayesinde spermanın yaşlanmasını önlemek ve kalitesini üst düzeyde tutmak mümkündür (Rana, 1995). Deneysel çalışmalarda, genetik ve ıslah çalışmalarında yıl boyu ihtiyaç duyulan sperma, muhafaza teknikleri sayesinde sağlanabilmektedir (Suquet ve diğ., 2000).

Brofeldt'in 1914 yılında alabalık spermasının soğuk ortamda daha uzun yaşadığını keşfetmesinden sonra, sperm biyolojisinin daha iyi anlaşılmasıyla iki değişik muhafaza tekniği geliştirilmiştir (Büyükhatipoğlu ve Holtz, 1978). Bu tekniklerden birincisi spermanın 1 ila 9 °C'de kısa süreli muhafazası (soğuk muhafaza), diğeri derin dondurucu veya sıvı azot içerisinde 0°C ile -196°C arasında uzun süreli muhafaza tekniğidir (Karyoprezervasyon). Değişik balık türlerinde yapılan araştırmalarda balık spermasının, farklı suni plazmalar, farklı seyreltme oranlarında kullanılarak veya herhangi bir seyreltici kullanılmadan, değişik gaz atmosferleri eşliğinde, kısa süreli saklama yöntemiyle 7-34 gün (Balık, 1978; Büyükhatipoğlu ve Holtz, 1978; Stoss ve Holtz, 1983; Stoss ve Refstie, 1983; Moore, 1987; Ohta ve Izawa, 1996; Ohta ve diğ., 2000; Bencic ve diğ., 2000) uzun süreli saklama yöntemiyle 365 güne kadar (Moczarski, 1976; Moczarski ve Koldars, 1976; Gupta ve Rath, 1991 ve 1993; (Gupta ve diğ., 1995; Canyurt'dan 2003))



canlılığını ve dölleme kabiliyetini koruduğu bildirilmiştir (Canyurt vd., 2003).

Cabrita ve diğerlerinin (2001) bildirdiğine göre bütün bunların yanında balık sperminin soğuk muhafazası, henüz pratik olarak ticari boyutta gerçekleştirilememiş yeni bir sahadır. Gamet muhafazayla ilgili çok sayıda çalışmaya ve küçük çaptaki laboratuvar denemelerinde önemli ilerlemeler elde edilmesine rağmen bu metotların ticari boyuta taşınmasında hala birçok problem bulunmaktadır. Bu konudaki önemli fikirler arasında arazi koşullarında dondurma yöntemi ve yüksek miktarda sperm elde etme bulunmaktadır. Kısa süre içinde dondurma metodu probleminin üstesinden gelinebilecektir çünkü arazide kullanılan dondurma sistemlerinden elde edilen sonuçlar, laboratuvar ortamında programlanabilir bir biyodondurucuyla elde edilenlere karşı benzer sonuçlar göstermiştir (Tiersch, 1995).

Spermin koruma amaçlı içine yerleştirildiği geleneksel 0.25 ve 0.5 ml'lik payetler, birçok balık türü sperminin soğuk muhafazasında ve küçük miktarlardaki yumurtanın döllemede başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Lahnsteiner vd., 1995, 1996). Bu durum, gen bankası gibi laboratuvar hedefleri ya da az miktarda spermin ihtiyaç duyulduğu türlerde ticari kullanım için işe yarayabilir. Bununla birlikte som balıklarındaki uygulamada, yüksek miktarda yumurta döllemek için çok fazla sayıda payet gerekmektedir. 1.8 ya da 5 ml'lik payet kullanılarak gerçekleştirilen sperm soğuk muhafazası, spermin payetlerin içine yerleştirilmesi ve buzun çözülmesi için gerekli sürenin kısalmasına yardımcı olur ve üreme dönemi boyunca sperm elde edilmesini kolaylaştırır (Cabrita vd., 2001).

Yüksek miktarlarda dondurma, ilk defa memelilerde, özellikle laboratuvar şartlarında iyi sonuçlar gösteren boğa ve koç sperminde rapor edilmiştir (Brown vd., 1991; Torreta vd., 1996). Geniş çaptaki muhafaza

protokolleri ayrıca, *Oncorhynchus mykiss* (Lahnsteiner vd., 1997, Wheeler ve Thorgaard, 1991; Steinberg vd., 1995; Conget vd., 1996), *Salmo trutta fario*, *Salmo trutta lacustris*, *Salvelinus alpinus* (Lahnsteiner vd., 1997; Richardson vd., 2000), *Polyodon spathula* (Brown ve Mims, 1999), *Silurus glanis* (Bart vd., 1998) gibi bazı tatlı su balığı türleri ve *Dicentrarchus labrax* (Fauvel vd., 1998) ve *Pleuronectes ferrugineus* (Richardson vd., 1999) gibi bazı deniz türleri için de test edilmiştir. 5 ml'lik payetler kullanıldığında gökkuşağı alabalığı spermi için dölleme oranlarında bir azalma bulunmuştur. Lahnsteiner vd., (1997), döllemede % 40 başarı elde ederken Wheeler ve Thorgaard (1991), % 49.3 dölleme başarısı elde etmiştir. Steinberg vd., (1995), aynı türlerdeki diğer dondurma metotları (tablet şeklinde) karşılaştırıldığında % 82 dölleme oranı rapor etmiştir. Bu denemelerdeki dondurma/çözme protokollerinde kullanılan fark kriteri ve elde edilen sonuçlar, kuluçkahane kullanımı zorluğu konusunda bu metotların seçimi ve karşılaştırılmasına olanak verir (Cabrita vd., 2001).

E. Cabrita ve arkadaşları (2001) yaptıkları çalışmada, 1.8 ve 5 ml'lik payetler için en iyi dondurma/çözme şartlarını analiz etmeyi ve yüksek miktarda spermin soğuk muhafaza metodunun kuluçkahane kullanımı için başarılı olup olmayacağını kontrol etmeyi amaçlamışlardır.

Balık üretimi basitçe yetiştirilen türlerin ıslah edilmesiyle gelişme göstermektedir. Genetik potansiyel, genetik olarak tanımlanmış ırkların çaprazlanması ve belirlenmesi, türlerin çaprazlanması ve gametlerin değiştirilmesi yolu ile geliştirilebilir (Gall, 1991; Hörstgen-Schwark, 1991). Bu uygulamalardan bazıları da spermlerin soğuk muhafazasını gerektirmektedir. Balık sperminin düşük sıcaklıkta muhafazası ile ilgili ilk başarılı çalışma ringa (*Clupea herangus*) yumurtalarını dondurularak çözülmüş sperm ile dölleyen Blaxter (1953) tarafından rapor edilmiştir. Holtz (1993), Stoss'a (1983) atfen geçmiş 20 yıl boyunca som balığı spermini

dondurmak için büyük çaba sarfedildiğini ve şu anda birçok balık türünden alınan spermin dondurulabildiğini bildirmiştir. Yine Holtz (1993), Stoss'a (1983) atfen gökkuşağı alabalığı sperminin muhafazası ile ilgili daha önceki çalışmaların Stoss (1983) tarafından özetlendiğini belirtmiştir (Holtz, 1993).

Tüm bu çalışmalar sonucunda spermi koruyucu maddenin bileşimi ve izlenen yöntemlerin başarılı muhafazada önemli bir rol oynadığı açıkça görülmektedir. Gerçekte belirli koşullar altında som balığı sperminin distile su içeren DMSO ile sulandırıldıktan sonra dondurulmasıyla dikkate değer şekilde yüksek dölleme oranları elde edilmiştir ((Stoss, 1979; Holtz'dan, 1993), Holtz vd., 1991). Literatürün bir eleştirisinde de, gerekli hesaplar yapılmadan kullanılan koruyucu bileşim ile çözülme sonrasında yüksek derecede tutarsız dölleme oranları bulunduğu belirtilmektedir. Hatta bu dikkate değer tutarsızlık bir laboratuvar da şöyle görülebilmiştir: Holtz (1993), Stoss ve kendisine atfen (1983a), % 70-90 (dondurulmamış kontroller için düzeltilmiş) dölleme oranları rapor edildiğini belirtmiş ve yine Holtz (1993), Schmidt ve kendisine atfen (1987) aynı protokolü izleyen Schmidt ve kendisinin % 40'ı geçmeyen dölleme oranları elde ettiğini bildirmiştir (Holtz, 1993).

Holtz'un (1993) bildirdiğine göre Mounib (1978), sükröz içeren bir bileşim içinde spermi donduran ilk kişiydi. Holtz (1993), Stoss'a (1979) atfen ilk başlarda yapılan bir karşılaştırmalı denemede bu koruyucunun diğerlerine göre daha üstün olmadığını gözlemlendiğini ve bu yüzden denemenin sürdürülmediğini bildirmiştir. Memeli embriyolarının soğuk muhafazası ile ilgili elde edilen deneyimler, yüksek konsantrasyonlarda sakkarit içeren seyrelticilerle yapılan denemelere yol gösterici olmuştur. Bu çalışmalardan, % 10 DMSO ilave edilmiş 0.6 M'lık sulu bir sükröz solüsyonu içeren basit bir koruyucu bileşim elde edilmiştir. Tutarlı bir üretim gösteren sistem, taze spermle karşılaştırıldığında çözülmeden sonra yaklaşık olarak % 90'lık

döllenme oranıyla çok başarılı olmuştur (Meiners-Gefken vd., 1987; Holtz vd.,1991).

Döllenme oranlarını en yüksek seviyeye çıkarmak için şu faktörlere dikkat etmek gerekir:

1- Sperm toplandıktan sonra ve işleme tabi tutuluncaya kadar serin bir yerde tutulmalıdır (mümkünse yaklaşık 0 °C). Küçük tüpler 5-6 mm'den daha yüksek seviyede doldurulmamalı ve kapaksız şekilde tutulmalıdır (Büyükhatipoğlu ve Holtz, 1978; (Stoss ve Holtz, 1983c; Holtz'dan, 1993); (Stoss vd.,1987; Holtz'dan, 1993)).

2- Toplama ve işlem arasında geçen süre minimum tutulmalıdır ((Stoss ve Holtz, 1983a; Holtz'dan, 1993); (Schmidt-Baulain ve Holtz, 1989; Holtz'dan, 1993)). Buna karşın, Baynes ve Scott (1987), 26 saat gibi uzun süreliğine saklanan sperm ile iyi sonuçlar elde etmiştir.

3- Sperm, 1 birim sperme karşı 3 birim koruyucu oranında, % 10 DMSO (Stoss ve Holtz, 1983b; Holtz'dan, 1993) ilave edilmiş 0.6 M'lık bir sükröz solüsyonu (Holtz vd., 1991) içinde saklanmalıdır.

4- Seyreltilmiş sperm kuru buz üzerinde -79 °C'de donmuş tablet (pelet) şeklinde olmalıdır (Nagase ve Niwa, 1964; Büyükhatipoğlu ve Holtz, 1978). Optimal tablet boyu 0.1 ml'dir (Schmidt ve Holtz, 1987; Holtz'dan, 1993).

5- Seyreltme ve tablet şeklinde dondurma arasında geçen süre 2 dakikayı aşmamalıdır. İşlemler otomatik pipet yardımıyla hızlandırılabilir.

6- Donmuş tabletler direkt olarak likit nitrojen (-196 °C) içine aktarılabilir.

7- Tabletleri çözmenin en iyi yolu olgun dişilerden alınan özel sıvının kullanımınıdır. Diğer en iyi alternatif özel sıvı ise 0.12 M'lık NaHCO<sub>3</sub> ya da 0.12 M'lık NaCl'dir (Stoss ve Holtz, 1981, 1983b; Holtz'dan, 1993).

8- Her 0,1 ml'lik tablet için 1 ml'lik çözme solüsyonu kullanılmalıdır (Stoss ve Holtz, 1983b; Holtz'dan, 1993).

9- Çözme solüsyonunun sıcaklığı 20 °C'den daha az, 40 °C'den daha fazla olmamalıdır (Holtz vd., 1991).

10- Yumurta ve sperm arasındaki temas ele alındığında tabletlerin çözülmesi 30 saniyeden önce gerçekleştirilmelidir (Stoss ve Holtz, 1981; Holtz'dan, 1993). Bunun için tabletlerin, yumurtların üzerine dökülmeden ve karıştırılmadan önce sıvılaşıncaya kadar içinde çözücü solüsyon bulunan bir şişe içinde çalkalanıp küçük grupların döllemesi sağlanmalıdır (Holtz, 1993).

Eğer sperm kullanımı üreme döneminin ortasında gerçekleştirilir (Legendre ve Billard, 1980; (Schmidt-Baulin ve Holtz, 1991; Holtz'dan, 1993)) ve hareketli erkeklerden elde edilen bir sperm havuzu kullanılırsa (Ott ve Horton,1971; (Stoss ve Holtz, 1983a; Holtz'dan, 1993)) sonuçların daha iyi olacağı ortadadır (Holtz, 1993).

Holtz'un (1993) bildirdiğine göre, bir takım düzeltmeler mümkün olmakla birlikte burada anlatılan metotlar iyi sonuç vermektedir. Gelecekteki araştırmalar, bu metotların arazi koşulları altında kullanımını kolaylaştırma üzerine kurulmalıdır. Sperm koruyucu bileşime yumurta sarısı (Baynes ve Scott, 1987) ve diğer bileşenlerin eklenmesi de uygun olabilir. Belirli sayıdaki yumurtayı döllemek için geçmişten beri genellikle fazla sayıda sperm kullanılmasına karşın denemeler, gerekli sperm miktarını en aza indirme üzerine de kurulmalıdır. Bununla birlikte şu andaki bilgiler de gökkuşağı alabalığı sperminin basit bir koruyucu bileşim içindeki soğuk muhafazasının güvenilir ve uygulanabilir metotlar üzerine oturtulduğu şeklindedir. Bunun yararlılığı da Holtz, Meiners-Gefken ve ekiplerinin kendi birimlerinde yaptıkları tekrarlamalar ve yayınlanan sonuçlarla kanıtlanmıştır (Meiners-Gefken vd., 1987; Holtz vd.,1991).

### 3. SPERM, YAPISI, SPERM İLE İLGİLİ KAVRAMLAR

Çalışmamızın materyal ve yöntem bölümüne geçmeden önce daha sonraki bölümlerdeki bir takım kavramlara açıklık getirmesi bakımından öncelikle sperm, yapısı, sperm ile ilgili kavramlar gibi konularda açıklayıcı bilgiler vermek konunun anlaşılması bakımından daha etkili olacaktır.

Erkek ve dişi germ hücreleri (Gamet) adını alan hücreler olgunlaşmaları sürecinde ileride yapacakları işe uygun bir şekil kazanmışlardır. Bu nedenle erkek germ hücresi (*Spermium*) küçük ve çok hareketlidir. Dişi germ hücresi (*Ovum*) aynı zamanda gelişecek yavru için bir besin deposu görevi de yapmaktadır. Bu nedenle de büyük ve hareketsizdir (Kayalı vd., 1992). Hücreler arasındaki bu fark âdetta iki cinsiyet arasındaki farka benzer: Erkek aktif ve arayıcı, dişi ise pasif ve bekleyicidir. Öncelikle erkek germ hücresinin morfoljisi ile ilgili Kayalı ve diğerlerinin (1992) verdiği bilgilere bu konu başlığı altında daha sonra da Üçüncü ve diğerleri (2006) ile Erkoçak'ın (1980), testisler, spermatogenetik hücreler ve sertoli hücreleri gibi konu başlıkları altında verdiği bilgilere göz atalım.

#### 3.1. Erkek Germ Hücresinin Morfolojisi

Spermium adı verilen erkek germ hücresi, 1677 yılında *Johann Ham* tarafından ilk defa görülmüştür. Baş, orta parça ve kuyruk olmak üzere üç kısımdan oluşan ve canlı iken çok hareketli bir cisimciktir.

Baş: Karşıdan bakıldığında oval, yandan bakıldığında armut biçimindedir, Taze preparatlarda ışığı çok kırıcıdır, bu nedenle de parlak olarak gözükür. Boyanmış preparatlarda ise başın arka kısmı nüve boyaları ile çok koyu olarak boyanır, çünkü başın bu kısmında, çok miktarda (DNA) bulunmaktadır. Başın ön kısmında insan spermiumunda ancak elektronoptik ile tam belirgin olarak görülebilen, mikrozomlardan oluşmuş ve başı bir takke biçiminde saran, ince fibrillerden kurulu bir kılıf (*Galea capitis*) vardır.

Başın bu kısmının, spermium epididimde olgunlaşırken ortaya çıkan enzimleri taşıdığı ve bu nedenle de fertilizasyonda önemli bir rol oynadığı kabul edilmektedir.

Baş takkesinin uç kısmı bazı hayvan türlerinde delici uç (*Perforatorium*) şeklinde kuvvetlendirilmiştir.

Spermium başı, olgunlaşmamış germ hücrelerinin nüvesine uymakta ve bu nedenle de babaya ait haploid kromozomları taşımaktadır.

Orta parça: Boyun ve birleştirici kısım olmak üzere iki bölümden oluşmuştur.

Boyun çok kısadır ve baş plağı (*Noduli anteriores*) ile ara kitle (*Massa intermedia*)den yapılmıştır.

Işık mikroskopunda baş plağı: Başın hemen altında yerleşmiş iki cisimcik ile onları birbirine birleştiren, enine diske bağlayan homojen bir kitle görünümündedir.

Elektron mikroskopunda boynun yapısı daha karışık bir durum göstermektedir. Proksimal bölgede rozet şeklinde dizilmiş cisimcikler görülmektedir. Bu oluşumun proksimal sentriole uyması gerekmektedir. Uzamına düşmüş kesitlerde spermiumun her iki kenarında koyu ve açık bölgeler görülmektedir. Enine kesitlerde ise bunların halka şeklinde üst üste dizilmiş fibrillerden kurulu olduğu ortaya çıkmaktadır.

Boyun bir oynak görevi yapmaktadır. Baş bu sayede spermiumun geri kalan kısımlarına karşı hareket yeteneği kazanmaktadır.

Birleştirici kısımda şu oluşumlar vardır:

1. Enine disk (*Discus transversalis*): Ara kitlenin (*Massa intermedia*) hemen altında kurs şeklinde bir plâktan yapılmıştır.

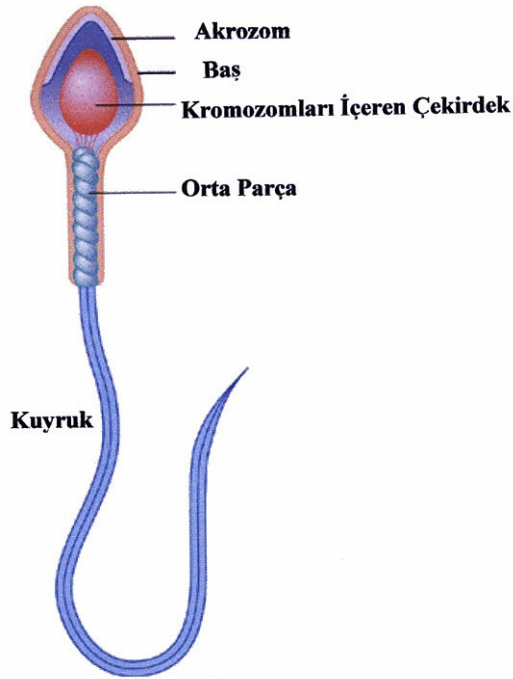
2. Son halka: Dip çemberi veya kapatıcı halka da denir. Arka sentriolden oluşturduğu kabul edilen kurs şeklinde bir plâktır.

3. Eksen ipliği: Bu iplik enine diskten başlayarak kuyrukta da devam eden bir lifçikten oluşmuştur.

4. Spiral iplik: Eksen ipliğinin etrafında bulunan, ince plasmatik kılıfı saran, mitokondrilerden yapılmış, 8-9 kıvrımlı bir ipliktir.

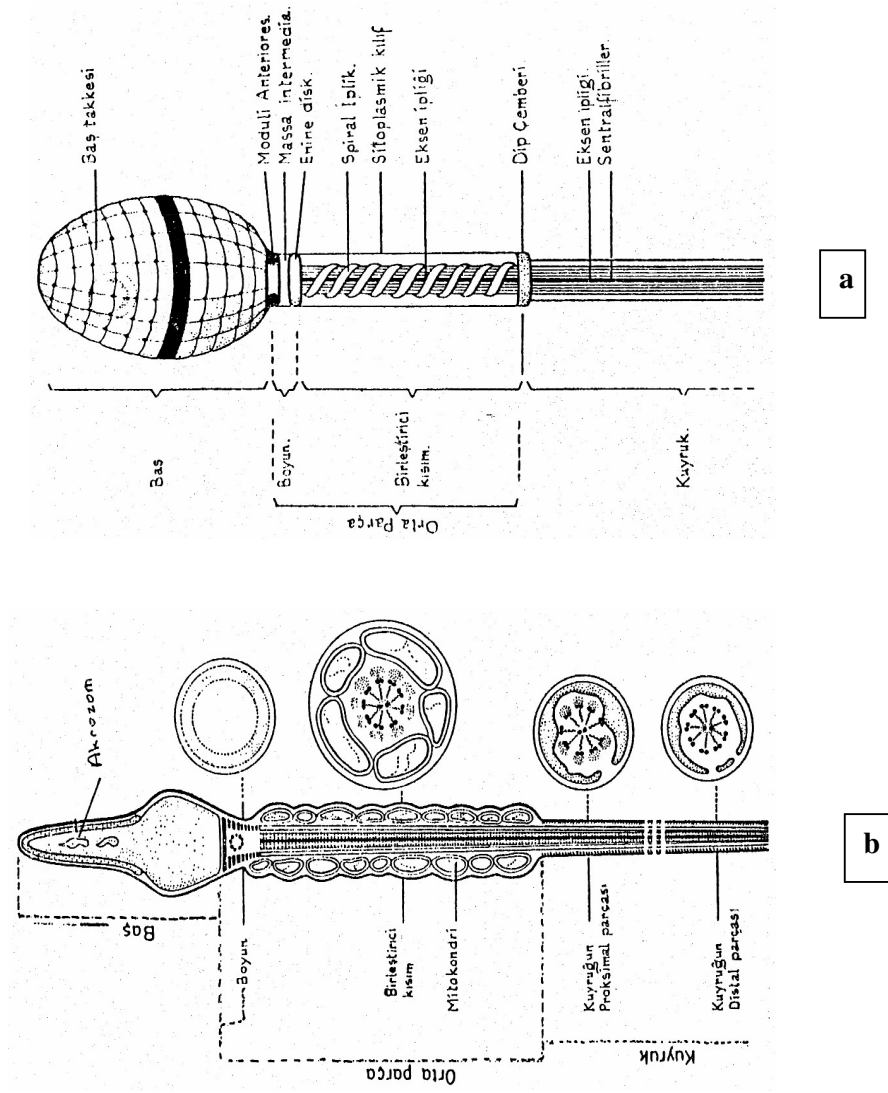
5. Sitoplasmik kılıf: En dışta bulunan ince bir zardır.

Kuyruk: Meni hayvancığının en uzun fakat aynı zamanda en ince kısmını yapar. Bir uzun esas parça (*Pars principalis*) ile bir de kısa son parçadan (*Pars terminalis*) oluşmuştur. Bütün kuyruk boyunca eksen iplikçiği uzanır. Kuyruk, yılanvari hareketler ile spermiumun ileriye doğru hareket etmesini sağlar. Şekil 3.1’de insanda olgun sperm örneği, temel bölümleri ile, şekil 3.2’de ise ayrıntılı bölümleri ile görülebilmektedir.



Şekil 3.1. İnsanda olgun sperm ([www.mhhe.com](http://www.mhhe.com), 2007).





Şekil 3.2. İnsan sperminin görünüşü a) İnsan sperminin ışık mikroskopunda şematik görünüşü, b) İnsan sperminin ultra mikroskopik görünüşü (Kayalı vd., 1992).

Spermium bir hücre olarak incelendiğinde; baş, nüveye, bütün diğer kısımlar da hücre gövdesine uyar. Genler bulunması nedeniyle fecondasyon

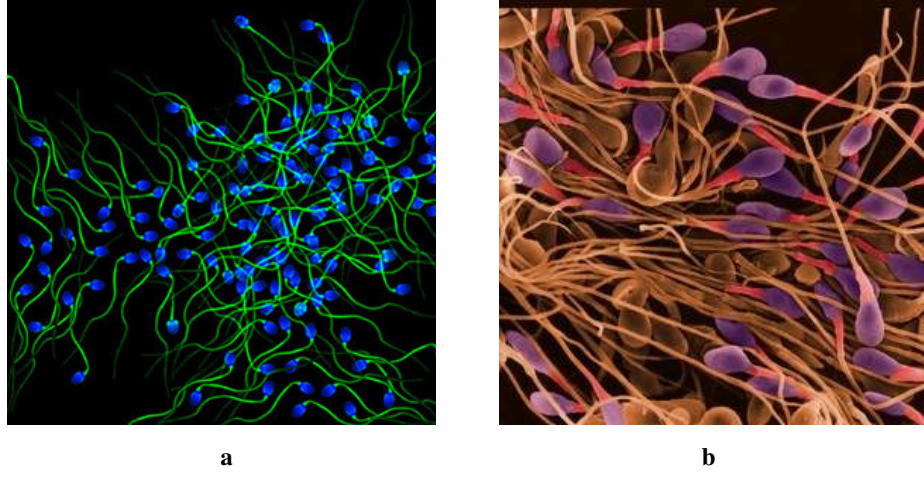
esnasında asıl önemli rolü oynayan baştır, enine disk ise sadece bir motor durumundadır: Bu plağın sağlam olması spermiumun hareket edebilmesi için şarttır. Kuyruk, geminin pervanesi gibi sadece hareketi sağlayan bir kısımdır.

Başı bulunmayan bir spermium, eğer enine plağı sağlam ise hareket edebilir. Bundan anlaşılacağı üzere hareket yeteneği ile dölleme yeteneği farklı şeylerdir.

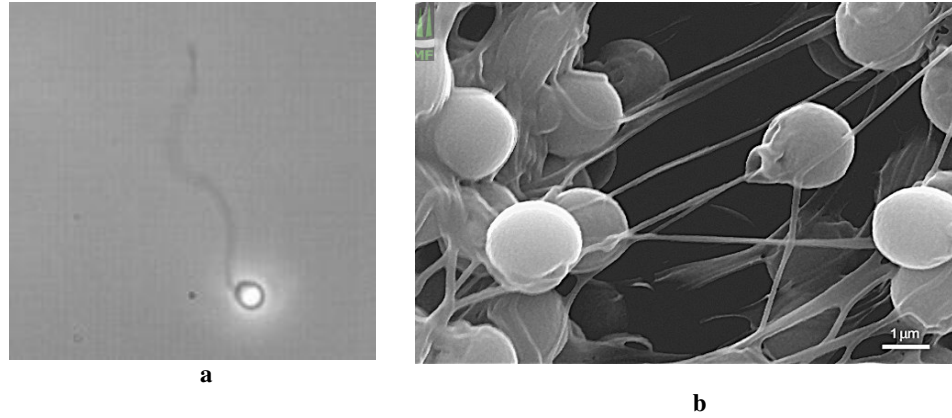
Spermiumlar genital organlarda akıntıya karşı hareket ederler. Bu olaya pozitif ( + ) *Rheotaxis* denir.

Spermiumlar, dişi genital organların bazı maddeleri tarafından çekilir. Bu olaya da pozitif ( + ) *chemotaxis* denir.

Bir spermiumun yaşama süresi, içinde bulunduğu ortamın pH'ına bağlıdır. Spermiumlar asit ortamlarda çok çabuk hareket niteliklerini kaybedip ölürler (Kayalı vd., 1992). Şekil 3.3'de insan sperminin çeşitli örnekleri, şekil 3.4'de ise çeşitli balık spermi örnekleri görülmektedir.



Şekil 3.3. İnsan spermi örnekleri a) İzole edilmiş insan spermi hücreleri (www.nikonsmallworld.com, 2007), b) İnsan spermi (www.astrographics.com, 2007).



Şekil 3.4. Değişik balık türlerinin spermlerinden görünüm a) Zebra balığı (*Danio rerio*) spermi (wilson-leedy.com, 2007), b) Sazangillerden altın balık (*Carassius auratus*) spermatozoonunun dış morfolojisinin elektron mikroskopundaki görünümü (www.biology.ualberta.ca, 2007).

### **3.2. Testisler**

Erkek üreme hücreleri olan spermatozoonların ve erkek cinsiyet hormonu olan testosteronun üretildiği organlardır (Üçüncü vd., 2006).

Spermatogenik hücreler spermatogonyumlar, primer ve sekonder spermatositler ile spermatidlerdir.

#### **3.2.1. Spermatogenetik hücreler**

##### **3.2.1.1. Spermatogonyumlar**

Vitellüs kesesinin endoderminden primordial testise göç eden hücrelerin farklılaşmasıyla oluşurlar ve ergenlik döneminde işlevsellik kazanırlar.

##### **3.2.1.2. Primer spermatositler**

Spermatogonyumlardan daha büyüktürler ve enine kesitlerde çok sayıda görülürler. Mayoz bölünmenin birinci profazına hemen girdikleri halde bölünme sonuna kadar sitoplazmik köprülerle birbirlerinden ayrılmadan kalırlar, ilk mayoz bölünme sekonder spermatositlerin şekillenmesiyle tamamlanır.

##### **3.2.1.3. Sekonder spermatositler**

Primer spermatositlere oranla daha küçük olan bu hücreler hızla ikinci mayoz bölünmeye girdikleri için çok az sayıda gözlenebilirler.

##### **3.2.1.4. Spermatidler**

İkinci mayoz bölünme sonunda oluşan küçük, açık renkli ve genelde merkezi yerleşim göstermeyen nukleusları ile ayırt edilen hücrelerdir. Olgunlaşma sürecinde kromatin yığılması ile nukleusları da giderek küçülür ve daha koyu renkli boyanır. Spermatogenezin spermiyogenezis olarak tanımlanan son spermatogenezis aşamasında spermatozoonlara dönüşürler. Spermatozoonlar baş, boyun ve kuyruk bölgeleri kolayca ayırt edilen aktif hareketli hücrelerdir.

Baş kısmında yoğun kromatin içeriği ile büyük bir nukleus ve bunun anteriöründe fertilizasyon için gerekli enzimler içeren akrozom yer alır. Nukleus zarının posteriörü bazal levha olarak adlandırılır. Boyun kısadır ve bazal levha ile bunun hemen arkasında transversal olarak yer alan sentriyolden ibarettir. Kuyruk orta, esas ve son kısımlara ayrılmaktadır. Sil yapısındaki mikrotübüler düzenlenme olan aksonem orta kısımdadır ve diğer sil yapılarında görülmeyen bir organizasyon göstererek yoğun fibrille çevrelenmiştir. Aksonem ve yoğun fibrilleri de mitokondriyumlar çevrelemektedir. Orta kısmın son parçası yoğun bir halka olan annulusdur. Aksonem ve yoğun fibrillerin eksen filamentleri olarak devam ettiği kuyruğun esas kısmı fibröz bir kılıfla kaplıdır, son kısmında ise aksonemin çevresinde sadece çok az miktardaki sitoplazma ile hücre zarı bulunur (Üçüncü vd., 2006).

### 3.2.2. Sertoli hücreleri

Spermatogenik hücreler arasında çok az sayıda dağılmış olarak gözlenen düzensiz şekilli hücrelerdir. Işık mikroskopunda iyi görülemeyen uzantılarıyla spermatogenik hücreleri hem mekanik anlamda, hem de besleyerek destekler. Belirgin bir nukleolusu bulunan iri nukleusları açık renkli, oval veya üçgenimsi şekildedir. Sertoli hücreleri, oldukça muntazam aralıklarla birbirinden ayrılmış durumdadır. Şekilleri, bazen silindir, bazen tepesi kesik piramit veya uzun armut biçiminde olabilir. Nukleusları iri, daha çok oval veya üçgen şeklindedir.

Sertoli hücreleri, spermatogenetik hücreleri besleyen ve onlara desteklik eden hücrelerdir. Sertoli hücreleri çeşitli zararlı etkenlere karşı çok dayanıklıdır. Spermatogenetik hücreleri kolaylıkla tahrip eden X ışınları, yüksek sıcaklık v.s. bu hücelere tesir etmez (Üçüncü vd., 2006).

### 3.3. Spermatogenesis

**Spermatogenetik hücreler**, belirli bir düzenle birbirini izleyen hücre jenerasyonlarından ibaret birçok sıralar halinde düzenlenmiştir. Olgun

spermium oluncaya kadar spermatogenesisin bütün devirleri spermatogenetik hücre katlarında geçer (Erkoçak, 1980).

**Spermatogenesis** yani erkek cins hücrelerinin gelişmesi olayında üç devir mevcuttur. Üreme devri, büyüme devri ve olgunlaşma devri. **Üreme devrinde**, spermatogenetik hücreler somatik hücreler gibi mitoz ile bölünürler. O zaman bunlara **spermatogonyum** denir. Spermatogonialar sık mitoz gösterir ve erkekte ileri yaşlara kadar bölünmeye devam ederler. Bunların bir kısmı, bir süre bölündükten sonra yeni bir mitoza girecek yerde büyümeye başlar. **Büyüme devrinde** spermatogenetik hücrelere *spermatosit I* denir. Spermatosit I'lerin çoğu spermatogonialardan daha büyüktür. Nükleusları birinci olgunluk bölünmesinin profaz safhası değişmelerini gösterir. Yani kromatin ince uzun ipliklere, kromozomlara bölünür. Anaya ve babaya ait olmak üzere ikişer ikişer eş kromozomlar (homolog kromozomlar) paralel olarak uzunlamasına birbirine yapışıp kromozom çiftleri teşkil ederler (bivalent kromozomlar). **Olgunluk devrinde** kromozom çiftlerinin homolog kromozomları, gereğinde aralarında parça alışverişi (*crossing-over*) yaptıktan sonra tekrar birbirinden uzaklaşır, herbiri hücrenin bir kutbuna çekilerek birinci olgunluk bölünmesi bitirilir. Böylece spermatosit I'den meydana gelen iki yavru hücre, *spermatosit II* adını alır. Şu halde spermatosit II'ler türe özgü kromozom sayısının ancak yarısını yani *haploid* sayıda kromozom içerirler. Spermatosit II'ler spermatosit I'lere nisbetle daha küçüktür. Bunlar hemen yine bölünürler (*ikinci olgunluk bölünmesi*). İkinci olgunluk bölünmesi esas itibariyle haploid kromozom sayısı ile olan somatik mitoz gibidir. Bu kez, ortalarından uzunlamasına yarıklanmış olan kromozomların bir yanları bir kutba diğer yarılardan öbür kutba çekilerek yavru hücrelere geçerler. İkinci olgunluk bölünmesinden sonra bir spermatosit II'den meydana gelen iki yavru hücreye spermatid denir. Spermatidler, gerçek haploid sayıda kromozom içerirler. Olgunluk devrinde, spermatogenetik hücrelerin

geçirdiği, birbirini izleyen bu iki bölünmeye, kromozom sayısının yarıya inmesini sağladığı için *redüksiyon bölünmesi*, bu suretle de, cins hücrelerinin olgunlaşmasını temin ettiği için, *birinci ve ikinci olgunluk bölünmesi* veya *meiosis* denir. İki olgunluk bölünmesi sonucunda bir spermatosit I'den dört adet spermatid oluşur. Spermatidler spermatosit II'ye nisbetle daha küçük, poligonal şekilde hücrelerdir. Kenarları koyu boyanan, irice, yuvarlak bir vezikül içerirler. Bu veziküle, *idiozom* veya sonradan içinde akrozom geliştiği için, *akrozomal vezikül* denir. En son, spermatidler artık bölünmez. Herbiri özel bir değişme ile *spermium* olur. Buna göre bir spermatosit I'den 4 olgun spermium meydana geliyor demektir (Erkoçak, 1980).

### 3.4. Spermogenesis

Erkek germ hücrelerinin olgunlaşma olayına spermogenesis adı verilir. Bu olay, bütün yüksek organizmalı canlı türlerinde testis adı verilen erkek üretim organında (gonadlarında) yapılır. Spermogenesis insanda, erginlik çağı (*Pubertas*) ile başlayıp ileri yaşlara kadar aralıksız sürer. Fakat testislerin spermium yapabilme gücü ileri yaşlarda çok yavaşlar (Kayalı vd., 1992).

Spermiumların ilk ana hücresi “Spermatogonyum”lardır. Spermogenezin birinci dönemini oluşturan çoğalma devrinde mitoz ile sürekli olarak spermatogonyumlar yapılagelmektedir. Belirli sayıdaki mitozdan sonra bu çoğalma durur ve bu hücrelerin bazılarında bir büyüme başlar. Bu şekilde spermogenezin ikinci dönemi yani Büyüme devri başlamıştır. Büyümeye başlayan bu hücreler “*Spermatosit I*” adını alırlar. Şu halde ikinci dönem olan büyüme devrinde Spermatosit I'ler yapılmaktadır. Bu periyot olgunlaşma dönemine bir hazırlıktır. Bu dönemde, nüvede, uzamış bir profaz olarak kabul edilen birtakım değişiklikler olur. Üçüncü dönem olan olgunlaşma devresinde birbirini izleyen iki bölünme olur ve bu bölünmeler sonunda kromozom sayısı yarıya iner. Bu nedenle olgunlaşma bölünmesine

“redüksiyon bölünmesi” veya “Meiozis” denir. İlk bölünmede “*Spermatosit II*” yapılıdır, onun bölünmesiyle de "Spermatid" ortaya çıkar. Spermatosit II'nin ömrü çok kısadır. Bu hücre olur olmaz tekrar bölünerek spermatid haline geçer. Bu nedenle testis kanalcıklarında Spermatosit II'ler çok güç saptanabilir (Kayalı vd., 1992).

Spermatidler de tam olgun hücreler değildir. Bunların tam olgun hale gelebilmeleri için “*Spermiohistogenesis*” dönemini geçirmeleri gereklidir ki bu sürede de “*Sertoli hücreleri*” ile bir süre müşterek hayat “*Symbiosis*” sürmeleri gereklidir. Sertoli hücreleri oval veya armut biçimi nüveli, bol sitoplazmalı hücrelerdir. Ufak, ovalimsi, hafif bazofil sitoplazmalı ve oldukça kompakt nüveli bir hücre olan spermatidler bir başak demetini andıracak şekilde bu sertoli hücrelerinin sitoplazmaları içerisine girerek birbirini izleyen değişikliklere uğradıktan sonra spermiumun en son şeklini alacaklardır. İşte, spermatidlerin Sertoli hücrelerinin sitoplazmaları içerisinde spermium haline gelene kadar geçirdikleri bu döneme spermiohistogenesis denir (Kayalı vd., 1992).

Tüm bu açıklamaları farklı bir şekilde özetlemek istersek;

**Spermiogenesis**, yani spermatidin olgun spermiuma değişmesi olayı, başlıca spermatidin sentriyollerinde, nükleusunda ve Golgi aparatında kendini gösterir (Erkoçak, 1980).

**Olgun Spermium**, nükleusunda *haploid* sayıda kromozom bulunan sitoplazması çok az, ince, uzun hareketli bir hücredir. Baş, orta parça ve kuyruk olmak üzere üç kısmı ayırt edilir. *Baş*, önden bakınca oval, yandan bakınca ucu yassılaştırmış armut biçiminde görülür. Nükleustan meydana geldiği için, homojen, yoğun kromatin kitlesinden ibaret bir yapı gösterir. Başın ön yüzünün bir kısmı ince bir membranla örtülüdür. Bunun ön ucunda bazı fermentler içeren bir granüla, *akrozom* bulunur. *Orta parça*, boyun ve



birleştirici kısımdan ibarettir. *Boyun kısmı*, başın arka ucuna bağlıdır. *Kuyruk* ise iki kısımdan yapılmıştır (Erkoçak, 1980).

Spermiumlar organizma dışında da günlerce yaşayabilirler. Spermiumlar, içerdikleri *sex kromozomuna* göre, eşit sayıda 2 çeşittir (Erkoçak, 1980).

Normal spermiumlar yanında belirli oranda, düzensiz, anormal spermiumlara da rastlanabilir. Anomali, daha çok hücre kısımlarından birinin birden fazla olması veya hiç bulunmamasından (iki başlı, iki kuyruklu veya başsız) veya nükleusa ait kromatinin değişikliği ile birlikte küçük veya çok büyük başlı (mikro veya megaloccephale) olmasından ibarettir. Bazen bozukluk spermiumun hareketindedir. Normal olarak düz bir çizgi şeklinde olması gereken hareket sirküler veya kıvrıntılı şekilde olur. Hatta tamamen ortadan kalkar (Erkoçak, 1980).

### 3.5. Sperma

Ersuyu veya Sperma, jelatinöz kıvamlı, süt gibi beyaz, özel kokulu ve hafif alkalın reaksiyonlu (pH. 7,9) bir sıvıdır. Hava ile temastan sonra ilk önce sulanır ve sonra da 20-30 dakika içinde pıhtılaşıp opak bir görünüm alır. Spermada belli bir orandan az spermium var ise bu duruma '*Oligospermi*' denir ve bu durumda yavru verme şansı çok azdır. Spermada hiç veya çok az spermium bulunmasına '*Azoospermi*' adı verilir. Eğer spermiumlar hareketsiz olacak olurlarsa o zaman '*Nekrospermi*'den söz edilir. Bu her iki son şekilde de döllenme olamaz (Kayalı vd., 1992).

Spermanın içerisindeki spermium sayısından ayrı olarak onların morfolojik durumları da önemlidir. Çünkü normal bir erkekte bile sperma içerisinde % 20 oranında anormal spermiumlara rastlanır. Bunların çoğunluğu fizyolojik varyasyonlardır. Tam olgunlaşmamış veya zamanından önce olgunlaşmış spermiumlar bu % 20'nin çoğunluğunu oluşturur. Bu

fizyolojik varyasyonların yanında bir de hakiki patolojik şekiller vardır ki onların da başlıcaları şunlardır:

- Başsız spermiumlar,
- Başlı dev spermiumlar,
- Bir tek baş, iki, üç, hatta dört kuyruklu spermiumlar,
- İki veya daha fazla başlı bir veya çok kuyruklu spermiumlar,
- Normal büyüklükte fakat anormal yapıya sahip spermiumlar

(Kayalı vd., 1992).

Spermanın içinde bulunan kimyasal maddeler de önemlidir. Bunlar da: Fruktoz ile asit fosfataz, fibrigenaz, fibrolysin ve hyaluronidaz fermentleridir. Ersuyu (*Sperma*) oldukça bol miktarda hyaluronidaz enzimi içerir. Bunlardan başka sperma içerisinde değişik büyüklükte yuvarlak hücreler de görülür. Bunların sitoplazmalarında ufak yuvarlak inklüzyon cisimcikleri vardır. Bundan başka spermada büzüşmüş sitoplazma artıklarına, çok sayıda yağ damlacıklarına, protein, pigment ve amyloid cisimciklerine, değişik şekil ve büyüklükteki sperma kristallerine de rastlanır (Kayalı vd., 1992).

## **4. MATERYAL VE YÖNTEM**

Kendi yaptığımız çalışmaların anlatımına geçmeden önce Alaçam ve diğerlerinin (1994) spermanın muayenesi, saklanması ve suni tohumlama ile ilgili genel bilgiler verdikleri konu başlığı 4.1-4.4 arası olan konular ile balıklar dışındaki çeşitli hayvan türleri ile ilgili benzer çalışma ve yöntemleri inceleyelim.

### **4.1. Erkek Üreme Organlarının Muayenesi**

#### **4.1.1. Sperma numunesi**

Sperma herhangi bir yöntemle alınabilir. Ancak ön sekresyonun alınmasını takip eden ejakülasyonla, sperma alınması tercih edilir (Alaçam vd., 1994).

Yaklaşık 2 ml sperma, steril ve ağzı kapalı tüp veya şişelerde +4 °C'de termos içerisinde ve mümkün olduğu kadar kısa sürede laboratuvara gönderilir.

Spermanın mikrobiyolojik muayenesinde testisler, epididymisler, ampullalar (erkeklerde vas deferensin bir kısmı, dişlerde fallop kanalının bir parçası, zardan yapılmış çıkıntı şeklinde bir kesecik), eklenti bezleri ve uretradaki muhtemel mikroorganizmalar araştırılır. Genellikle spermanın mikrobiyolojik muayenesi tüm mikroorganizmaları kapsar. Şüpheli durumlarda muayeneler yönlendirilerek etkenin tanısına çalışılır. Genellikle Bruselloz, Salmonelloz ve bulaşıcı viral enfeksiyon etkenleri araştırılır. Trichomonas yönünden muayene edilecek spermalar soğutulmadan 37 °C'de ilgili laboratuvara gönderilir (Alaçam vd., 1994).

### **4.2. Spermanın Muayenesi ve Değerlendirilmesi**

Spermanın muayenesi ve değerlendirilmesi, (Spermiogram) yetiştiricilikte ve özellikle damızlık seçiminde önemli yer tutar. Diğer androlojik muayenelerde normal değerler elde edilse bile, spermatolojik

özelliklerden herhangi birinde meydana gelen olumsuzluk fertilizasyonu doğrudan etkiler. Böyle damızlık ya da spermalarla yapılan tohumlamalardan dişilerde infertilite veya sterilite oluşabilir. Böylece ekonomik kayıplara da yol açan bu durum her türden erkekte olduğu kadar, özellikle erkek damızlıkların daha fazla değerlendirildiği suni tohumlama organizasyonlarında önemlidir.

Spermanın muayenesi ve değerlendirilmesi; erkek hayvanların dölleme yeteneklerini ortaya koyan iki önemli kriter olan spermatolojik özelliklerin belirlenmesi (in vitro) ve dölleme güçlerinin (in vivo) araştırılmasıyla tam olarak yapılabilir. Bu bölümde spermanın laboratuvar koşullarında muayenesi ve değerlendirilmesi ele alınmaktadır.

Ejakülatlarda (boşaltılan madde) spermatolojik özelliklerin belirlenmesinde (spermiogram) türler arasında az çok farklılıklar olmakla birlikte genelde benzer yöntemler uygulanır. Muayene ve bulguların güvenilir olması için spermiogram 4-5 gün ara ile en az 2-3 kez tekrarlanmalıdır. Muayene yapılırken hayvanın türü, ırkı, yaşı ve özellikle çevre koşulları dikkate alınarak değerlendirme yapılmalıdır.

Sperma muayenesinde canlı ve aktif hareketli hücrelerle çalışıldığı unutulmamalı, spermatozoonlara zarar verecek hareketlerden ve malzeme kullanımından kaçınılmalıdır. Spermanın doğrudan güneş ışığıyla teması önlenmeli, hızlı sıcaklık değişimine yol açmayan ortamlarda çalışılmalıdır. Sperma muayenesinde kullanılan cam ve diğer malzemeler temiz, steril ve spermatozoonlara olumsuz etki yapmayacak sıcaklıkta (+37 °C) olmalıdır (Alaçam vd., 1994).

#### **4.2.1. Spermanın makroskopik muayenesi**

Ejakülatın dış bakıda gözle muayenesini kapsar ve aşağıda sıralanan özellikleri araştırılır (Alaçam vd., 1994).

#### **4.2.1.1. Ejakülatın miktarı**

Bir ejakülasyonla dışarı verilen spermanın tamamının hacmidir. Ejakülat miktarı sperma alma işleminden hemen sonra, genellikle derecelendirilmiş sperma toplama kadehlerinden okunarak, gerektiğinde ise ölçüm pipetleri veya silindirleri yardımıyla saptanır ve "ml" olarak belirtilir.

Ejakülatın hacmi spermatozoa ve eklenti bezlerinin salgılarından oluşur. Hayvan türüne, ırkına, yaşına, çevre koşullarına ve sperma alma yöntemine bağlı değişiklik gösterebilir.

#### **4.2.1.2. Spermanın rengi**

Hayvan türüne ve ırkına göre farklılıklar göstermekle beraber, normal ejakülatlarda genellikle açık kremden koyu krem renge kadar değişir. Rengin oluşmasında sperma içinde bulunan spermatozoa sayısının etkisi fazladır.

Patolojik durumlar dışında sperma renginin oluşmasında hayvan türüne ve beslenmeye bağlı, normal sayılabilecek farklılıklar izlenebilir. Örneğin, Ankara keçisi ejakülatının % 40-50 oranında sarımsı renkte olması, meraya dayalı beslenen boğalardan sarı, yeşilimsi renkte ejakülat alınması gibi.

Ejakülatlarda normalin dışında renklere de rastlanabilir. Bu durumlar, genital organlarda anormal bir durumun olduğunu veya spermaya yabancı maddelerin karıştığının belirtisidir.

Spermanın sarı-yeşilimsi renkte gözükmesi, spermada irin bulunduğunu (pyospermie), sarı renkte olması idrar karıştığını, kırmızı-kahverengi olması kan karıştığını (hemospermie) gösterir, partikül veya benzeri tortuların gözükmesi ise dışkı veya diğer yabancı maddelerin bulunduğunun belirtisidir.

#### **4.2.1.3. Spermanın kıvamı**

Ejakülâtın akışkanlığını ve viskozitesini gösterir. Sperma sulu kıvamdan krem kıvamına kadar değişen viskozite gösterebilir.

Spermanın kıvamı, büyük ölçüde içerdiği spermatozoa sayısı ile ilişkilidir. Örneğin; boğalarda az yoğun bir sperma, açık krem renge, sulu kıvamda ve akışkan olduğu halde, daha yoğun sperma ( $\times 10^9/\text{ml}$ ) krem renge, koyu süt kıvamındadır ve bunun akışkanlığı daha azdır.

#### **4.2.1.4. Spermanın kokusu**

Sağlıklı ve fertil hayvanlardan elde edilen ejakülâtlar yumurta sarısını andıran çok az aromatik bir kokuya sahiptirler. Bunun dışındaki kokular irin, kokuşma, vb. patolojik olgular olarak değerlendirilirler.

#### **4.2.2. Spermanın mikroskopik muayenesi**

Ejakülâtın mikroskopik muayenesi tercihen faz kontrast ve ısıtma tablalı mikroskopla yapılır. Natif (taze) spermada muayeneler sperma alımından hemen sonra ve spermatozoonların çevre koşullarından en az etkileneceği bir ortamda (laboratuvar) sürdürülür. Muayene sırasında spermanın temas edeceği lam, lamel, pipet, vb. gibi tüm malzemeler temiz, steril ve vücut sıcaklığında olmalıdır (Alaçam vd., 1994).

##### **4.2.2.1. Kitle hareketi**

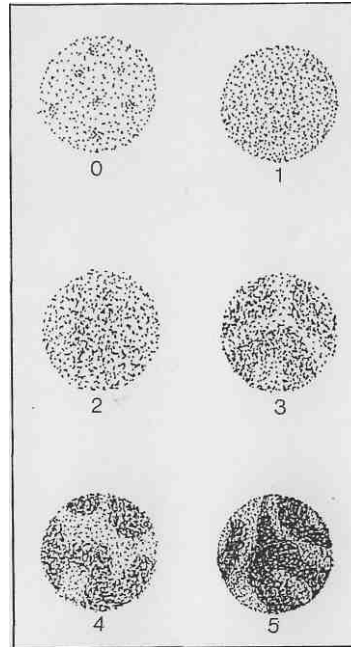
Spermatozoa yoğunluğu fazla olan natif spermalarda gözlemlenebilen bir hareket çeşididir. Koç, teke ve boğa ejakülâtlarında görülmesine karşılık aygır, domuz ve köpek spermalarında çok az belirgindir veya görülmez.

Kitle hareketi, spermada bulunan ileri yönlü, güçlü harekete sahip spermatozoonların yoğunluğuna bağlı olarak oluşur. Bir ejakülatta ileri yönde ve hızlı hareket eden spermatozoa sayısı çok fazla ise, kitle hareketi koyu hatlar halinde kaynama veya dalgalanma şeklinde görülür.

Spermatozoa hareketleri yavaş veya az sayıda ileri yönlü ise kitle hareketi ya çok yavaş dalgalanma veya kaynama şeklindedir ya da hiç görülmez.

Kitle hareketi 0-5 veya 0-10 arasında puanlama ile değerlendirilir. Eğer spermada hiçbir kitle hareketi gözlenmiyorsa o kitle hareketi çok hızlı, kalın hatlarla kaynama veya dalgalanma şeklinde ise 5 veya 10 puanla değerlendirilir. Değerlendirmeler türe özgü özellikler dikkate alınarak yapılır.

Muayene için yaklaşık mercimek büyüklüğünde bir damla sperma, kapiller pipet veya bagetle lam üzerine konur. Hareketler mikroskobun küçük büyütme objektifiyle (x100), lamel kapatılmaksızın, doğrudan değerlendirilir. Muayene kısa sürede yapılmalı, gerektiğinde tekrarlanmalıdır.



Şekil 4.1. Mikroskopik bakıda kitle hareketlerinin değerlendirilmesi: (0) Yok, (1) Çok zayıf, (2) Zayıf, (3) Orta, (4) İyi, (5) Çok iyi (Alaçam vd., 1994).

#### **4.2.2.2. Spermatozoa motilitesi**

Bir yönde ve güçlü hareket eden spermatozoonların, hareketsiz veya diğer hareket biçimi gösterenlere oranıdır. Bir yönde ve güçlü hareket niteliği gösteren tek hücreye ise, motil spermatozoon denir. Motil spermatozoonların spermadaki sayıları, toplam spermatozoa içindeki yüzde oranlarıyla hesaplanabilir.

Yalnızca motil spermatozoonların dölleme (fertilizasyon) güçleri olduğu kabul edildiğinden, yapılacak muayenelerde motilite saptanması önemli yer tutar, motilite oranının belirlenmesiyle, hem erkek hayvanların dölleme güçleri büyük ölçüde belirlenir hem de ejakülatın değişik amaçlarla kullanılması ve değerlendirilmesi olanağı sağlanır. Bu nedenle spermatozoa motilitesinin saptanmasında çok dikkatli olmak gerekir. Motilitenin düşük saptanması halinde spermadan daha az veya hiç yararlanılamayacağı, yüksek saptanması halinde ise infertilite veya steriliteye yol açabileceği düşünülmelidir.

Spermatozoa motilitesinin saptanmasında lam, lamel, ve pipet gibi malzemelerin temiz ve vücut sıcaklığında olmasına dikkat edilmelidir.

Spermatozoa motilitesinin saptanması taze ve sulandırılmış spermada yapılır. Bunun için spermadan küçük bir damla alınarak lam üzerine konur ve bu damla üzerine üzerine 45°'lik meyille lamel kapatılır. Işık mikroskopunda genellikle orta büyütmede (x 200, x 400), spermatozoonlar tek tek izlenerek bunların hareketlerinin değerlendirilmesi yapılır. Böyle bir değerlendirme yapılabilmesi için bir mikroskop sahasında en fazla 30 spermatozoon bulunacak biçiminde preparat hazırlanmalıdır. Koç, teke ve boğa spermaları yoğun oldukları için genellikle sulandırılır, diğer tür hayvanların ejakülatları ise gerektiğinde uygun bir solüsyonla sulandırılarak motilite saptanır. Gerek spermanın sulandırma oranı, gerekse spermadan alınan damlanın



büyükliğünün ayarlanmasıyla lam, lamel arasındaki spermatozoonların tek kat halinde gözlenmeleri sağlanır.

Spermatozoonların hareket biçimleri ve oranları kısa süre içinde değerlendirilmeli, ejakülatı ve preparatı temsil edebilmesi için en az üç değişik bakıda gözlenmeli ve gerektiğinde işlemler tekrarlanmalıdır.

Spermatozoa motilitesinin değerlendirilmesinde spermatozoonların hareket biçimleri ve hızları hayvan türlerine göre değerlendirilmelidir. Çoğunlukla, koç ve teke ejakülatlarında (taze) yüksek motilite (% 90) ve hareket hızına rastlanılır. Boğa ejakülatlarında bir ölçüde düşük bulunan bu değerler (% 70-80), aygır ve domuz ejakülatlarında daha da düşük (% 70) seyredebilir. Spermanın motil spermatozoa yönüyle değerlendirilmesi, toplam motil spermatozoa sayısı göz önünde bulundurularak yapılmalıdır.

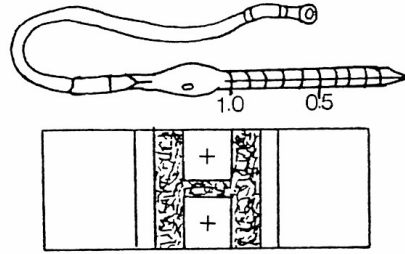
#### **4.2.2.3. Spermatozoa yoğunluğu**

Birim hacim spermada bulunan spermatozoa sayısı olarak tanımlanabilir. Spermanın bir  $\text{mm}^3$  veya  $\text{cm}^3$ 'ünde bulunan toplam spermatozoa sayısının bilinmesiyle ancak, motil spermatozoon oranı veya diğer spermatolojik özellikler sayısal olarak ifade edilebilir. Özellikle spermanın kullanılmasında ve değerlendirilmesinde ejakülat miktarı ve motilitesi yanında çok önemli bir spermatolojik özelliği oluşturur.

Spermatozoa yoğunluğu çok değişik yöntemlerle belirlenebilir de uygulamada genellikle üç temel yöntem kullanılır.

*Hemositometrik Yöntem:* Kan hücrelerinin sayımında olduğu gibi, spermada bulunan eşey hücrelerinin sayısal miktarının belirli oranlarda sulandırılması, eritrosit sayımında kullanılan pipetlerle yapılır. Pipete, 0.5 veya 1.0 çizgisine kadar spermanın homojen karışımından, pipetin dış temizliği yapıldıktan sonra da 101 çizgisine kadar Hayem solüsyonundan (5 kısım  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  + 1 kısım  $\text{NaCl}$  + 0.5 kısım  $\text{HgCl}_2$  + 200 ml distile su) çekilir.

Böylece sperma 1/200 veya 1/100 oranlarında sulandırılmış olur. Daha sonra, pipetin uçları iki parmakla kapatılır ve yatay konumda tutularak yeterince çalkalama hareketi yapılır. Sulandırılmış sperma kullanılmadan önce, ilk iki damla atılır. Spermanın sulandırılması belirli hacimlerde Hayem solüsyonu içeren (5 ml veya 10 ml) deney tüplerine istenilen oranda karışım sağlayacak miktarda sperma katılmasıyla da yapılabilir.



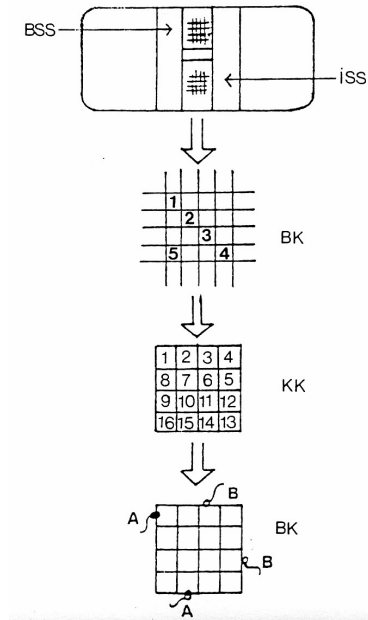
Şekil 4.2. Hemositometrik yöntemde kullanılan sayım lamı ve sulandırma pipeti (Alaçam vd., 1994).

Spermatozoa sayımında çeşitli sayım lamları kullanılabilir. Ancak, daha çok kullanılan "Thoma" sayım lamıdır. Thoma lamında biri üstte, diğeri altta olmak üzere iki sayım sahası vardır. Her sayım sahasında 16 büyük kare, her büyük karede ise 16 küçük kare bulunur.

Thoma lamı her iki sayım sahasını örtecek şekilde özel lamelle kapatılır. Lamelin yapıştırılması, sayım sahalarının yanlarında bulunan ayakların hafif nemlendirilmesiyle sağlanır. Yapışmanın uygunluğu her iki yapışma yerinde oluşan Newton renk halkasıyla kontrol edilir. Sayım lamına sayım sahaları yanlarından önceden hazırlanmış solüsyon damlatılarak lam ve lamel arasında oluşan hacim tamamen doldurulur. Spermatozoonların çökmeleri için lam yaklaşık 5 dakika yatay konumda bekletilir.

Spermatozoa sayımı, mikroskopta sahanın bulunması için önce küçük büyütme (x 200 veya x 400) objektifler kullanılarak yapılır. Pratikte, her

iki sayım sahasından beşer büyük kare olmak üzere toplam 10 büyük karede rastlanılan hücre sayısına göre spermatozoa yoğunluğu ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ ) hesaplanır. Sayma işleminde büyük karelerin seçimi, ortamı temsil edecek şekilde, her büyük kare içi sayımı ise, küçük karelerin düzenli bir sırayla izlenmesiyle yapılır. Ayrıca, büyük kare sayımlarında, kare içine ve yalnızca iki dış kenar üzerine gelen spermatozoa başları değerlendirmeye alınır.



Şekil 4.3. Hücre sayım lamı ve sayım sahalarının mikroskopta görünümü. BSS: Birinci sayım sahası, İSS: İkinci sayım sahası, B.K: Büyük kareler, KK: Bir büyük kare içindeki küçük kareler, BK: Bir büyük kare; (A): Sayılır, (B): Sayılmaz (Alaçam vd., 1994).

Spermatozoa yoğunluğu aşağıda gösterilen formüle göre hesaplanır.

$$\text{Yoğunluk (mm}^3\text{)} = \frac{\text{Sayılan hücre}}{\text{Sayılan büyük kare} \times \text{Büyük kare hacmi} \times \text{Sulandırma oranı}}$$

Sayılan büyük kare x Büyük kare hacmi x Sulandırma oranı

Örnek: 1/200 oranında sulandırılan bir spermayla hazırlanan Thoma lamında 10 büyük karede toplam 60 spermatozoa sayılmıştır. Yukarıdaki formüle göre spermatozoa yoğunluğu,

$$\text{Yoğunluk} = \frac{60}{10 \times \frac{1}{250} \times \frac{1}{200}} = 5000 \times 60$$

Yoğunluk:  $0.3 \times 10^6/\text{mm}^3$  bulunur.

*Fotolemetrik Yöntem:* Bu yönteme fotoelektrokolorometrik ya da nefalometrik adı da verilir. Oldukça yaygın kullanım sahası vardır. Pratik oluşu ve kısa sürede sonuç vermesi yönüyle tercih edilir.

Yöntemin temeli, özel sulandırıcılarla (% 3'lük sodyum sitrat olabilir) sulandırılan spermaların ışığı geçirme oranına dayanır. Bu yaklaşımdan yararlanılarak sperma solüsyonlarının ışığı az veya çok geçirmelerine göre spermatozoa yoğunluğu saptanır.

Yöntemde aletin kendi çalışma koşullarına bağlı kalınmakla birlikte, genellikle 0.1 ml sperma, 10 ml solüsyonla homojen şekilde karıştırılır. Bu solüsyon alete yerleştirilir ve ışığın geçme oranı aletin göstergesinden izlenir. Aletin gösterdiği rakam daha önce hemositometrik yöntemle kalibre edilerek hazırlanan çizelgeden spermatozoa yoğunluğu olarak okunur.

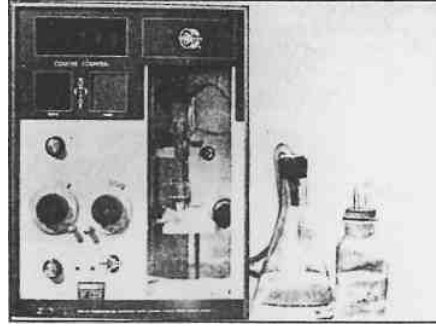
Fotolemetrik yöntemle spermatozoa yoğunluğu saptanırken alet her ölçüm öncesi kontrol edilerek, göstergenin başlangıç noktasında olup olmadığı, elektrik akımı ve çevre koşullarından (sıcaklık, ışık, vb) etkilenip etkilenmediği araştırılmalıdır.

*Elektronik Sayaç Yöntemi:* Spermatozoa yoğunluğu son zamanlarda geliştirilen elektronik aletlerle de belirlenebilmektedir. Bu yöntemde kullanılan alet, elektrolit bir sıvı içinde bulunduran iki elektrod arasındaki

elektrik akımının, ortamda bulunan partiküllerin sayısı ve büyüklüklerine göre değişmesi esasına göre çalışır.

Aletin özel solüsyonu içine belirli miktarda sperma otomatik pipetle alınır, spermanın homojen karışımı sağlandıktan sonra alet çalıştırılarak ekran veya göstergeden spermatozoa yoğunluğu direkt okunur.

Elektronik sayaç yöntemiyle, aletin çalışma koşullarına tam uyularak yapılan ölçümlerde fotolemetrik yöntemden daha sağlıklı sonuçlar alındığı bildirilmektedir. Ancak, ölçüm öncesi ve iki kez tekrarlanan sayımlarla aletin iyi çalışıp çalışmadığı kontrol edilmelidir.



Şekil 4.4. Elektronik sayaç (Alaçam vd., 1994).

#### **4.2.2.4. Anormal spermatozoa oranı**

Spermada bulunan spermatozoonların morfolojik muayenesi, anormal formlu hücrelerin biçim ve oranlarının saptanması amacıyla yapılır. Anormal yapılı spermatozoonların fertilizasyon güçlerinin olmaması ve kimi kalıtsal bozuklukları taşıması bakımından, spermatozoanın morfolojik muayenesi çok önemlidir.

Yetiştiricilikte kullanılacak erkek hayvanlar kullanıma alınmadan önce, sterilite, infertilite durumlarında ve bilimsel amaçlı araştırmalarda anormal spermatozoa biçimi ve oranları saptanır. Özellikle suni tohumlama

istasyonlarında tutulan erkek damızlıkların senede en az iki kez olmak üzere düzenli olarak anormal spermatozoalarının biçim ve oranlarının saptanması gerekir.

Ejakülatta veya spermada bulunan anormal yapılı spermatozoonların saptanması, amaca ve çalışma koşullarına bağlı olarak değişik tekniklerle yapılır.

*Boyama Yöntemi:* Spermatozoonların değişik boya ve tekniklerle boyanarak tesbit edilmesini ve morfolojik yapılarının araştırılmasını kapsar.

Basit boyama tekniğiyle spermatozoonlar, eosin, nigrosin, nigrosin-eosin, metylenblue, opalblue, anilinblue, fast green, bromfenolblue vb. boyalar kullanılarak boyanabilir. Preparatın hazırlanmasında, spermanın yoğunluğu dikkate alınarak preparat, bir veya bir kaç damla ile dikkatlice karıştırılır. Aynı lam veya daha uygunu başka bir lam üzerinde bu karışımdan alınan numuneyle tekniğine uygun froti (sürtme preparat) yapıp bu numune kurutulur. Frotinin tek tek izlenebileceği sıklıkla hücre bulundurmasına özen gösterilir. Bunun için gerekirse sperma, önceden herhangi bir fizyolojik solüsyonla sulandırılabilir. Boyama yöntemleriyle hazırlanan preparatlarda spermatozoonlar, değişik oranlarda fondan farklı boya aldıklarından mikroskop altında kolayca izlenebilirler.

Spermatozoon morfolojisinin incelenmesi, çini mürekkebi yöntemiyle de gerçekleştirilebilir. Oldukça basit ve kolay uygulanabilen bu yöntemde sperma numunesi yeterli oranda çini mürekkebiyle karıştırılır ve bu karışımdan froti hazırlanır.

Frotide, spermatozoonlar çini mürekkebini almadığından dolayı beyaz, froti zemini ise siyah olduğundan hücre yapıları kolayca gözlenebilir.

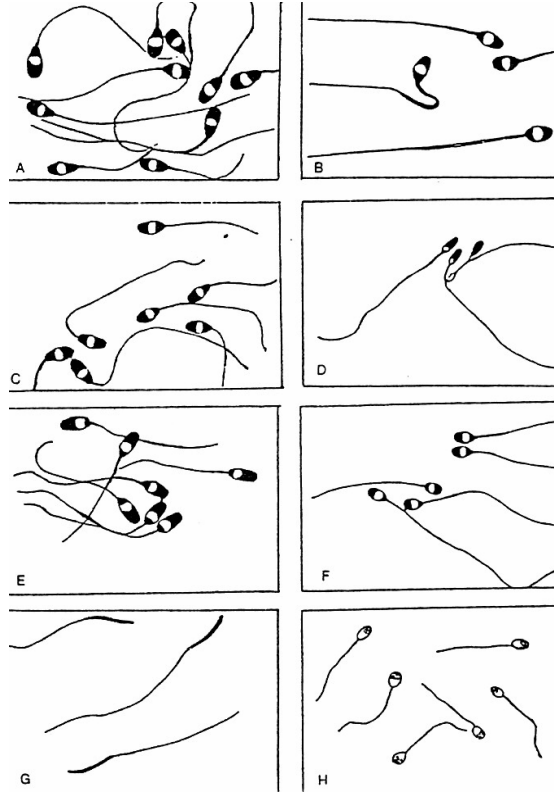
Spermatozoa hücrelerinin tesbiti ve morfolojilerinin incelenmesi daha geliştirilmiş boyama teknikleri olan Giemsa ve Karras yöntemleriyle de yapılabilir.

Spermatozoon morfolojisi ve özellikle başa ve akrozoma bağlı bozukluklar, Karras yöntemiyle araştırılır. *Karras yöntemiyle* boyama işlemleri aşağıdaki sıraya göre sürdürülür.

- Sperma numunesinden froti hazırlama,
- 24 saat oda sıcaklığında kurutma,
- 2 kez metanol içinde tesbit,
- 30 dakika kurulama,
- 1.5 dakika metacromgelb ile boyama,
- Su ile yıkama (sarı boya giderilinceye kadar),
- 1 dakika Eichenrinde solüsyonuna daldırma,
- Su ile yıkama,
- 30 saniye viktoriablue solüsyonuyla boyama,
- Su ile yıkama,
- Havada kurumaya bırakma.

*Giemsa Yöntemiyle Boyama:*

- Sperma numunesinden froti hazırlama
- 10 dakika metanolde tesbit
- 30 dakika (en az) 1/10 luk Giemsa solüsyonuyla boyama
- Su ile yıkama
- Kurutma.



Şekil 4.5. Değişik türden spermatozoaların görünüşleri A-Boğa (Karras), B-Koç (Karras), C-Teke (Karras), D-Ayır (Karras), E-Domuz (Methylviolet), F-Köpek (Anilin blue), G-Horoz (Eosin), H-İnsan (Alaçam vd., 1994).

*Sıvı Fiksasyon Yöntemi:* Bu yöntemde sperma numunesi herhangi bir tesbit solüsyonu içinde fikse edilerek incelenir. Sıvı fiksasyon yönteminde sperma numuneleri çoğunlukla Hancock solüsyonu içinde tesbit edilirler. Bu işlem, yaklaşık 0.5 ml Hancock solüsyonu içeren deney tüpüne bir damla sperma damlatılması ve karıştırılmasıyla yapılır. Böyle hazırlanan numuneler buzdolabında bir hafta süreyle saklanabilir.



*Hancock Solüsyonu Hazırlanması:*

1. Solüsyon:	NaCl ..	1.13 g
	Bidistile ad.	62.5 ml
2. Solüsyon:	a) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	2.71 g
	Bidistile ad.	62.5 ml
	b) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.78 g
	Bidistile ad.	62.5 ml

25 ml (a) + 10 ml (b) karıştırılır.

*Hancock Solüsyonu:*

I. Solüsyon	18.75 ml
II. Solüsyon	12.50 ml
Formalin	7.81 ml
Bidistile ad.	62.5 ml

Anormal spermatozoa biçimi ve oranının saptanması tüm preparat hazırlama yöntemlerinde benzer şekilde yapılır. Tekniğine uygun şekilde hazırlanan preparatlarda mikroskopik bakıda (x 400 veya x 1000) 400 spermatozoon, sıradan sayılarak değerlendirilir ve anormal form dışında yapı gösterenler yüzde olarak belirtilir. Anormal yapılaşmaların biçim ve oranları, ayrıca spermatozoonun başına, orta kısmına ve kuyruğuna bağlı oluşuna göre değerlendirilir.

Sıvı fiksasyon yöntemiyle alınan numunelerin muayenesi, lam ve lamel arasında küçük bir damlanın homojen dağılımının sağlanmasıyla gerçekleştirilir. Hücrelerin sayımı ve değerlendirilmesi yukarıda anlatıldığı gibidir.

Hemen her türden hayvan ejakülatında anormal spermatozoona rastlanır. Ancak, anormal yapıların spermada bulunan oranları ve biçimleri önemlidir. Yapılan çalışmalarda, toplam % 20 ve başa bağlı olarak da % 5

oranının üzerindeki anormal spermatozoa sayısının infertiliteye neden olduğu bildirilmiştir.

Anormal yapıların meydana geliş nedenleri saptanmaya çalışılmalı, kalıtsal bir faktörün etkili olup olmadığı araştırılmalıdır.

#### **4.2.2.5. Ölü-canlı spermatozoon oranı**

Spermada yer alan ölü ve canlı spermatozoa oranını saptamak amacıyla araştırılır. Bu saptama, boyama testleriyle ölü spermatozoonların boyayı alma, canlı olanların ise, boyayı almama özelliğine dayandırılarak yapılır. Boyama işleminde genellikle eosin kullanılmakla beraber, eosin-nigrosin, opalblue ve fast green gibi boyalardan da yararlanılabilir.

Preparatın hazırlanmasında kullanılan eosin solüsyonu, % 3'lük sodyum sitrat içinde % 2'lik olarak hazırlanır. Preparasyon için ilk önce lam üzerine 2-3 damla eosin solüsyonu konur, sonra bir damla sperma alınarak dikkatlice karıştırılır. Bu karışımdan aynı veya ikinci bir lam üzerinde froti yapılır. Frotinin kısa sürede (15 saniye) kurutulması sağlanır. Bunun için mikroskopun ısıtmalı tablasından veya sıcak hava üflenen bir ortamdan yararlanılabilir.

Boyanan ve fikse edilen hücrelerin sayımı, preparat ortasına yakın bir yerden başlanarak, sıradan toplam 400 spermatozoa sayılarak yapılır. Bu sayı içinde, boyayı almış hücrelerin yüzde oranı, spermada bulunan ölü spermatozoonları gösterir.

Ölü spermatozoon oranının saptanması spermatolojik özellikler bakımından ancak tamamlayıcı bilgi verir. Eğer spermada ölü spermatozoa oranı düşükse, bu çok şey ifade etmez. Çünkü yerinde sallanan, çember hareketliler de canlı spermatozoon özelliği gösterebilirler. Spermada yüksek miktarda bulunan ölüm oranı ise olumsuzluk işaretidir. Bu durumda diğer

spermatolojik özellikler tekrar gözden geçirilmelidir. Spermada genellikle % 25'in üzerinde ölü spermatozoa bulunması istenmeyen bir özelliktir.

Hayvan Türü	Ejakülât Miktarı (ml)	Sperma Rengi	Spermatozoa Yoğunluğu ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	pH	Bir Ejakülattaki Toplam Spermatozoa ( $\times 10^9$ )
Boğa	5 (1-10)	Krem	1,2 (0,5-2,2)	6,2-6,8	6,0
Koç	1 (0,3-3,0)	Koyu kirli krem	3,0 (1,0-6,0)	6,2-6,9	3,0
Ayır	60 (30-300)	Açık krem	0,15 (0,05-0,3)	6,8-7,4	9,0
Teke	0,9 (0,5-3,0)	Koyu kirli krem	3,0 (0,5-5,0)	6,5-7,0	2,7
Domuz	200 (50-500)	Açık krem	0,15 (0,1-0,7)	6,6-7,7	3,0
Köpek	10 (7-30)	Açık krem	0,3 (0,1-1,0)	6,7-6,8	3,0
Horoz	0,7 (0,1-2,0)	Beyaz parlak krem	3,0 (0,5-6,0)	6,3-7,8	2,1
Hindi	0,5 (0,1-1,0)	Beyaz parlak krem	4,0 (1,0-7,0)	7,0-7,8	2,0
Tavşan	0,5 (0,1-3,0)	Beyaz krem	0,3 (0,1-1,0)	6,5-7,0	0,15
İnsan	3 (2,0-6,0)	Açık krem	0,1 (0,05-0,15)	7,1-7,5	0,3

Çizelge 4.1. Değişik türden hayvanlarda ve insanda başlıca spermatolojik özelliklere ilişkin ortalama değerler (Alaçam vd., 1994).

#### 4.2.3. Spermanın fiziksel ve kimyasal özelliklerinin muayenesi

Spermanın fiziksel ve kimyasal özelliklerinin muayenesi kapsamında spermanın pH değeri, metabolik aktivitesi ve dayanıklılığı (direnci) incelenmektedir (Alaçam vd., 1994).

#### **4.2.3.1. pH değeri**

Spermanın pH değeri, taze spermada ve sulandırma işlemleri sonrasında indikatör kağıtları veya pH ölçüm aletleriyle saptanır. pH ölçümü sırasında kullanılan ölçüm tekniğine kesinlikle uyulmalıdır.

Spermada saptanan pH değeri değişimleri, spermaya dışarıdan herhangi bir maddenin karıştığına göstergesi olabilir. Ayrıca, spermatozoonların metabolik faaliyetleri sonucu ortama verdikleri artık maddeler de (laktik asit gibi) pH değişimine yol açabilmektedir. Spermanın pH değeri hayvan türlerine bağlı olarak değişmekle birlikte ortalama altı buçuktur.

Bilimsel çalışmalarda ve spermanın değişik amaçlı kullanımlarında spermatozoon metabolizmasına bağlı olarak belirli süre içinde pH değerinin değişmesi, spermanın değerlendirilmesinde kriter olarak kullanılabilir.

#### **4.2.3.2. Metilen mavisi redüksiyon testi**

Metilen mavisi redüksiyon testi, spermada bulunan spermatozoonların aktivitelerini, buldukları ortamdan kullandıkları oksijen miktarına göre değerlendirmek amacıyla yapılır. Bunun için sperma numuneleri, anaerobik bir ortamda bulundurulur ve aktiviteye bağlı olarak ortamda oluşan hidrojen miktarı değerlendirilir.

Deneyde fizyolojik Glikofosfat buffer veya % 3'lük sodyum sitrat eriyikleriyle, % 0.1 oranında hazırlanmış metilen mavisi solüsyonu kullanılır. Metilen mavisi solüsyonundan iki kısım, spermadan ise bir kısım olmak üzere bunlar, bir deney tüpüne konur ve çalkalanır. Tüpün ağzı birkaç damla parafinle kapatılarak havayla teması kesilir (anaerobik ortam). Deney tüpü, 40 °C'lik su banyosuna konur ve başlangıçta mavi renkte olan karışımın renksiz hale geçmesi için geçen süre belirlenir. Karışımın renksiz hale

geçmesi, spermatozoa aktivitesi sonunda ortama bırakılan hidrojenin metilen mavisini etkileyerek leuko metilen mavisi haline dönüştürmesiyle olur. Ancak rengin kaybolmasını, ortamda bulunan bakteri ve yabancı maddelerin de etkileyebileceğine dikkat edilmelidir.

İyi bir sperma örneğinde bu süre 3-6 dakika olarak bildirilmekle beraber, kullanılacak spermalarda bu sürenin 10 dakikanın altında kalması yeterlidir.

#### **4.2.3.3. Früktoz ve früktoz testi**

Sperma plazmasında bulunan früktoz, boğalarda daha çok glandula vesicula seminalisten, diğer türden hayvanlarda ise ampulla ve öbür eklenti bezlerinden de salgılanarak ejakülasyon sırasında spermaya karışır. Testiste üretilen testosteronun etkisiyle eklenti bezlerinden salınımı ve sürekliliği yönlendirilir. Bu nedenle doğal spermada bulunması ve miktarı androjenlerle ilişkilidir. Früktoz, spermatozoonun enerji gereksinimini karşılar. Özellikle hareket enerjisi olarak tüketilmesi ve anaerob madde değişiminde kullanılması, spermada bulunan spermatozoonların motiliteleriyle orantılı olarak gerçekleştirilmektedir.

Tür	Früktoz (mg/100 ml)
Boğa	120-540
Koç	150-600
Ayır	< 1
Domuz	20-40
Köpek	< 1
Horoz	< 1
Tavşan	40-150
İnsan	154

Çizelge 4.2. Değişik türlerde doğal sperma plazmasında bulunan früktoz miktarları (Alaçam vd., 1994).

Früktolizis testi, sperma plazmasında früktozun spermatozoonlar tarafından kullanılmasının saptanması esasına dayanır. Motil spermatozoonlar früktozla temas ettiklerinde, früktoz hücre içine girer ve burada bulunan enzimlerin etkisiyle parçalanır. Böylece früktoz olayı gerçekleşir ve bu durum laktik asit birikimine yol açar. Früktolizis olayı, spermada aerobik ve daha çok da anaerobik metabolizma sonucu görülür. Bu nedenle früktoz testi yapılarak, bir spermada bulunan spermatozoonların aktivitesi (motilitesi) hakkında bilgi edinilebilir. Früktolizis testi uygulamalarında genellikle, früktoz indeksi kullanılır.

Früktolizis indeksi:  $10^9$  spermatozoanın  $+37$  °C de 1 saatte tükettiği früktoz miktarıdır.

#### **4.2.3.4. Dayanıklılık testi**

*Tuzlu Su Testi:* Bu testte % 1'lik tuzlu su ortamında tutulan spermatozoonların aktivitelerini koruma süreleri araştırılır.

Deney için 10 ml % 1'lik NaCl eriyiği, su banyosuna konur ve sıcaklığı 40 °C'ye ayarlanır. Dayanıklılığı araştırılacak spermadan 0.01 ml alınarak bu numune tuzlu su içinde karıştırılır. Sulandırılmış spermadan küçük bir damla alınır ve ısıtma tablalı faz kontrast mikroskopla motilite saptanır. Bu işlem, her beş dakikada olmak üzere, karışımda motil spermatozoa kalmayınca kadar sürdürülür. Kullanılabilir nitelikteki bir spermada motil spermatozoa yitirme süresi en az 30 dakika olmalıdır.

*Termorezistens Testi:* Bu deneyde, değişik sıcaklık ortamlarında belirli süre tutulan spermalarda spermatozoa motilitesi ya da hareket biçimleri değerlendirilir. Spermatozoa hareketlerinin yanısıra morfolojik yapının da (özellikle akrozom yapısı) incelendiği testte çoğunlukla +37 °C, +40 °C ve +46.5 °C'lik sıcaklık ortamları kullanılmaktadır. Sıcaklık ortamları otomatik olarak ayarlanan su banyosu ya da etüvle sağlanabilir.

*Soğuk çok Testi:* Gerek doğal, gerekse dondurulmuş spermaların değerlendirilmesinde kullanılan testte spermanın soğuk ortamdan etkilenişi araştırılır. Bunun için sperma 0 °C'ye kadar soğutulur ve 10 dakika bekletildikten sonra sıcaklık tekrar + 37 °C'ye çıkarılır. Spermatozoonlar eosin ya da eosin-nigrosin gibi boyalarla boyama ile ölü-canlı oranına göre değerlendirilir.

#### **4.2.4. Spermanın bileşimi**

Spermanın bileşimi, spermatozoa ve sperma plazmasından meydana gelir. Gerek spermatozoa gerekse sperma plazmasını oluşturan maddeler, hayvan türüne, ırkına hatta yaşa ve çevre koşullarına bağlı bir takım değeriklikler gösterir. Spermada yer alan elemanlar ve değerleri tıpkı kan ve serumunda olduğu gibi muayene edilebilmektedir. Günümüzde geliştirilmiş santrifüj ve filtrasyon teknikleriyle spermada bulunan spermatozoa ve plazma

kısımları ayrılabilmekte, uygun biyokimyasal laboratuvar yöntemleriyle bunların analizleri yapılabilmektedir (Alaçam vd., 1994).

Spermada bulunan elemanlar, spermatozoonlarda ve sperma plazmasında değişik oranlarda yer alırlar. Ancak, hücre membranlarında oluşan herhangi bir bozukluk nedeniyle oranlar değişebilir. Bu durumlar plazmadan hücreye, ya da hücreden plazmaya madde geçmesine yol açar. Genellikle, hücreden sperma plazmasına magnezyum ve potasyum, plazmadan hücreye ise sodyum ve kalsiyumun geçtiği bildirilmiştir (Alaçam vd., 1994).

Spermatozoonda bulunan başlıca kimyasal bileşiklerden deoksiribonükleik asit (DNA) mukopolisakkarid, aldehidrogenik lipid (plasmalogen), keratin-protein, enzim ve koenzimler önemli yer tutarlar. Bu maddeler hayvan türleri arasında farklılıklar gösterirler. Ancak, aynı türden birey ya da ejakülatlardaki farklılıkların özellikle anormal spermatozoa oranlarıyla birlikte seyretmesi genotipik yapı yönüyle dikkate alınmalıdır.

Ayır	2.55
Boğa	3.20
Koç	2.90
Teke	2.94
Köpek	2.44
Domuz	2.62

Çizelge 4.3. Değişik türden hayvanlarda spermatozoonda yer alan DNA miktarları (Pg)  
(Alaçam vd., 1994).



#### **4.2.5. Spermanın mikrobiyolojik muayenesi**

Spermanın mikrobiyolojik muayenesi ejakülate *invivo* veya *invitro* olarak karışabilen mikropların araştırılması amacıyla yapılır. Spermanın mikrobiyolojik muayenesi genellikle tüm mikroorganizmaları kapsayacak biçimde olmalıdır. Ancak, şüpheli ve özel durumlarda muayeneler istenen etkenlerin saptanmasına yönelik yapılabilir (Alaçam vd., 1994).

Muayene edilecek sperma numunesi, özel önlemler altında alınmalıdır. Bu amaçla, hayvan türlerine bağlı olarak değişmekle beraber, tercihen suni vajenle sperma alınır. Sperma alma öncesi dışardan kontaminasyonu önlemek amacıyla birtakım önlemlerin alınması gerekir. Örneğin, boğada suni vajenin steril hazırlanmasının yanısıra, sperma almadan önce boğanın su ile yıkanması, özel organların temizliği ve dezenfeksiyonu yapılır.

Elde edilen ejakülatın en az 2 ml sperma, steril ve kapalı tüplerde muayene laboratuvarına kısa sürede sevk edilir. Nakil sırasında üremenin önlenmesi için sperma, kısa mesafelerde +5 °C'lik termoslarda, daha uzun taşımalarda ise dondurularak (-196 °C) sevk edilmelidir. Ancak, *Trichomonas* yönünden muayene edilecek numuneler oda sıcaklığında taşınmalıdır.

Hijyenik koşullarda elde edilen spermalarda bile hemen her zaman patojen olmayan mikroorganizmalar bulunabilir. Bu sayı, boğada 10-10<sup>3</sup>/ml olarak normal kabul edilebilir.

Spermanın mikrobiyolojik muayenesi damızlıklarda ve özellikle suni tohumlamada kullanılan hayvanlarda periyodik olarak, özel durumlarda ise tekrarlanarak yapılmalıdır.

#### **4.2.6. Spermanın değerlendirilmesi**

Spermanın muayenesiyle ortaya konan spermatolojik özellikler, hayvan türlerinde ırk, yaş ve çevre koşulları dikkate alınarak değerlendirilmelidir. Spermatolojik özelliklerin ortalama verileri, türe özgü değerlerle

karşılaştırılmalı ve yeterli sayıda tekrar yapıldıktan sonra karar verilmelidir (Alaçam vd., 1994).

Muayenesi yapılan spermada tüm spermatolojik özellikler, normal sınırlar içinde ise "Normospermi", spermatolojik özelliklerden biri veya birkaçı birden ortalama değerlerden küçük ölçülerde ayrılıyorsa "Dysspermi", ortalama değerlerin oldukça fazla farklı olması veya total kaybı durumlarında "Pathospermi" olarak adlandırılır. Normal değerlerden ayrılan durumlarda (dysspermi ve pathospermi) hangi spermatolojik özelliklerde anormal oluşunun yer aldığı belirtilmelidir.

Normospermi ve Dysspermi değerlendirilmesi yapılan ejakülatlarla döl verimi elde edildiği halde pathospermide, infertilite veya sterilite söz konusudur.

Kimyasal Yapı	Boğa	Koç	Domuz	Ayır	Horoz
Protein	6.8	5.0	3.7	1.0	1.8-2.8
Fruktoz	460-600	250	9	2	4
Sorbitol	10-140	26-170	6-18	20-60	0-10
Sitrik asit	620-806	110-260	173	8-53	Nil
Inositol	25-46	7-14	380-630	20-47	16-20
Glycerylphosphorylcholine	100-500	1100-2100	110-240	40-100	0-40
Ergothionine	0	0	17	40-110	0-2
Sodyum	225+13	178+11	587	257	352
Potasyum	155±6	89+4	197	103	61
Kalsiyum	40±2	6±2	6	26	10
Magnezyum	8±3	6+8	5-14	9	14
Klor	174-320	86	260-430	448	147

Çizelge 4.4. Spermının kimyasal bileşimi (mg/100 ml) (Alaçam vd., 1994).

### 4.3. Spermının Alınması, Saklanması ve Suni Tohumlama

Suni tohumlama, uygun teknik ve yöntemlerle erkekten alınan spermının yine uygun teknik ve yöntemlerle aynı cinsten dişilere

nakledilmesidir. Bu uygulamanın gerçekleştirilebilmesi, erkeklerden spermanın bol, kaliteli ve tekniğine uygun olarak alınması ile olasıdır. Bu bakımdan hayvan türlerine özgü, farklı sperma alma ve değerlendirme yöntemlerinin yeterince bilinmesi ve uygulanması gerekmektedir (Alaçam vd., 1994).

Son yıllarda büyük gelişme gösteren ve günümüzde biyoteknolojik bir olgu haline gelen suni tohumlama yöntemi kapsadığı konularda başlı başına bir endüstrinin doğmasına yol açmıştır. Hatta bu amaçla kullanılan alet ve malzemenin üretimi, donmuş sperma ticareti bakımından uluslararası ilişkileri bulunan bir sanayi ve ticaret dalı haline almıştır.

Suni tohumlama ile üstün verimli erkek genotipinin en uygun ve yaygın bir şekilde değerlendirilme şansı bulunduğu gibi bulaşıcı genital organ hastalıklarının yayılmasını önlemek ve döl verimi oranını arttırmak yönünden de bu yöntem en seçkin ve kolay bir yaklaşım olmaktadır.

Dünyada ilk suni tohumlama uygulamasının 13. yüzyılda Arap aşiretlerince kısıraklarda uygulandığı bilinmektedir. Bilimsel olarak ilk uygulamayı ise İtalyan fizyolojist Lazaro Spallanzoni köpekler üzerinde gerçekleştirilmiştir. Birinci dünya savaşından sonra suni tohumlama yönteminin Sovyet Rusya'da yaygın olarak kullanılmasından sonra bu yöntem, Avrupa ülkeleri ve ABD'de de önemli uygulama alanı bulmuştur. Ülkemizde suni tohumlama çalışmaları birçok Avrupa ülkesinden önce başlamıştır. Bu çalışmalar, 1936 yılında dondurulmuş spermanın kullanılmaya başlaması ile bugün yaygın bir şekilde kullanım sahası bulmaktadır.

#### **4.3.1. Spermanın alınması**

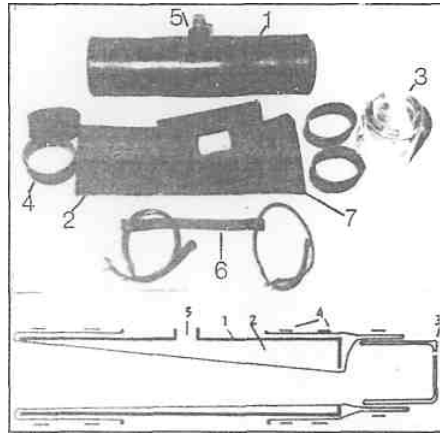
Hayvan türlerinde suni tohumlamayı başarılı bir biçimde yapabilmek, herşeyden önce erkek damızlıklardan zamanında sperma almaya bağlıdır. Bu

nedenle, hayvan türlerine özgü ve bugün pratikte kullanılmakta olan başlıca sperma alma yöntemlerini üç ana bölümde toplayabiliriz:

- 1- Suni vajen yöntemiyle sperma alınması,
- 2- Elektro-ejakülasyon yöntemiyle sperma alınması,
- 3- Ampullaların masajı yöntemiyle sperma alınması (Alaçam vd., 1994).

#### **4.3.1.1. Suni vajen yöntemiyle spermanın alınması**

Çiftlik hayvanlarında sperma almak için en sık kullanılan yöntemdir. Suni vajen, doğal vajenin bir örneği olup (erkek hayvanların ejakülasyon yapmasını sağlayan sıcaklık, basınç ve kayganlık gibi özellikleri olan), hayvan türlerine göre kimi farklılıklar (uzunluk ve çap) taşıyan, sert kauçuktan yapılmış bir silindir, bu silindirin içini kaplayan suni vajen iç lastiği, sperma toplama kadehi gibi ana bölümlerden oluşmaktadır. Suni vajenin çok değişik modelleri (İngiliz, Danimarka, İtalyan, Sovyet, Japon ve Hannover vb.) vardır. Bunlar arasında en sık kullanılanlardan bir tanesi Hannover modelidir.



Şekil 4.6. Hannover modeli suni vajen 1. Kauçuk silindir, 2. İç lastik, 3. Sperma toplama kabı, 4. Lastik bant, 5. Su koyma vidası, 6. Kemer, 7. Sıcak suyun yer aldığı bölüm (Alaçam vd., 1994).

*Suni Vajenin Hazırlanması:* Suni vajen silindirin öncelikle temizlenip kurutulmuş ve hijyenik koşullarda muhafaza edilen suni vajen iç lastiği geçirilir ve lastiğin iki ucu silindirin uçlarına bükülerek lastik bantlarla tesbit edilir. Bu suretle suni vajen silindiri ile suni vajen iç lastiği arasında bir boşluk oluşur. Daha sonra silindirdeki, penisin gireceği tarafın karşı ucuna hayvan türlerine göre değişen büyüklükteki sperma toplama kabı, bir lastik huni vasıtasıyla, takılıp tesbit edilir. Bu şekilde hazır hale getirilen suni vajene vidalı deliğinden, sıcaklık ve basınç sağlamak üzere sıcak su konur. Kimi suni vajen modellerinde ise, sıcak su penisin gireceği uçtan konup, daha sonra iç lastiğin ucu geriye kıvrılıp tesbit edilmektedir. Konulan su, sıcaklık ve basıncı birlikte sağlandığından suni vajen boşluğuna ne kadar su konulacağını ve sıcaklığın ne olacağını, hayvan türlerine, sperma alma mevsimine ve çevre sıcaklığına göre ayarlamak gerekmele beraber su, silindirin 2/3'üne kadar doldurulmalı, sıcaklığının da 40 °C'nin altında bulunmamasına özen gösterilmelidir.

Suni vajenin kayganlığı ise, penisin gireceği uca steril vazelin sürmekle sağlanır. Bir cam baget yardımıyla sürülen vazelin, fazla derinlere kadar bulaştırılmamalıdır. Özellikle, aygırlarda penis, vajen içinde gidip gelme hareketi yaptığından fazla vazelin sperma ile bulaşıp spermanın kalitesini (özellikle sperma dondurulacak ise) bozabilir. Bu nedenle vazelin sadece uç kısmına ve çok az miktarda sürmek gerekir. Son yıllarda, özellikle boğalardan sperma almak için vazelin kullanılmamakta olup sıcaklık, basınç ve kayganlık sıcak su ile sağlanmaktadır.



Şekil 4.7. Değişik suni vajen modelleri (Alaçam vd., 1994).

Bu şekilde, doğal vajenin koşulları sağlanarak hazırlanan suni vajenin belli sıcaklık derecesinde ve hijyenik bir ortamda muhafaza edilmesi gerekmektedir. Bu bakımdan, hazırlanan suni vajen, bir etüve konarak sperma alma zamanına kadar bekletilmelidir.

#### **4.3.1.2. Elektro-ejakülasyon yöntemiyle sperma alınması**

Aşım yapma yeteneğini kaybetmiş, sakat, libidosu zayıf ancak genetik yönden değerli erkek damızlıklar ile vücut yapıları arasındaki farklılıklar nedeniyle çiftleşemeyen hayvan türlerinden sperma almak için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemin özelliği, bel ve sağrı kesiminden kök alan ve genital organları besleyen sinirlerin uyarılması sonucu, ereksiyon ve ejakülasyonun sağlanmasıdır. Bu yöntemle, rektum içerisine sokulan bir çubuk vasıtası ile giderek artan oranda elektrik akımı verilerek ereksiyon ve ejakülasyon oluşturulmaktadır. Çubuğun ucu bel omurlarının ventraline dayanarak uyarım daha da arttırılabilmektedir. Zorunlu durumların dışında sık kullanılan bir yöntem değildir. Spermaları alınacak erkeğin çok iyi tesbit edilmesi, iyi bir elektrik akımı etkisi elde etmek için de rektumun iyice temizlenmesi gerekmektedir. Hayvan iyi tesbit edilemediği zaman çeşitli kırıklar ve felce varan kötü sonuçlar doğurmaktadır. Bu yöntemle elektrik akımının etkisiyle ereksiyon ve ejakülasyon başlayınca bir sperma toplama kabı yardımıyla sperma alınmaktadır.

#### **4.3.1.3. Ampullaların masajı ile sperma alınması**

Bu da, elektro-ejakülasyon yöntemi gibi sıkça başvurulan bir yöntem değildir. Özellikle sakat ve düşük libidolu boğalarda kullanılmakta olup bu konuda pratik yapmış kişilerce uygulanması zorunludur.

Bu yöntemle boğalardan sperma almak için, önce cinsel organlar temizlenir. Rektuma girildikten sonra, masaj yapılacak ampulla parmaklar

arasına alınır. El hafifçe aşıya doğru bastırıldığında pelvis kemiğinin üzerinde iki ampullanın meydana getirdiği üçgen şeklinde bir boşluk hissedilir. Her iki ampulla parmaklar arasına alınarak masaj yapılır. Masaj sırasında ejakülasyon olur ve sperma, sperma toplama kabına alınır.

Böylece, değişik yöntemlerle alınan ejakülatlar; miktar, renk, kıvam, pH, motilite, yoğunluk ve morfolojik özellikleri gibi temel spermatolojik özelliklerinin belirlenip değerlendirilmesi için laboratuvarında incelemeye alınırlar.

Tüm hayvan türlerinde kaliteli bir sperma alabilmek için hayvan türlerine özgü teknik ve yöntemlerin kullanılması yanında erkek damızlıkların bakım, beslenme, barınma ve günlük rutin egzersizlerinin zamanında ve aksatılmadan yapılması da büyük önem taşımaktadır.

#### **4.3.2. Aygırdan spermanın alınması**

Geçmişte, atlarda başlayan suni tohumlama uygulamasında gerekli olan spermanın değişik yöntemlerle alınmasına karşın, günümüzde en çok suni vajen yöntemi kullanılmaktadır. Atlarda suni vajenin, ilk kez 1930'lu yıllarda Salzman tarafından geliştirilmesinden sonra, değişik tip ve modelleri günümüze kadar kullanılagelmiştir (Sovyet, Mississippi, Berlin, Krakow, Hannover gibi). Bugün en sık Hannover modeli suni vajen kullanılmaktadır (Alaçam vd., 1994).

Aygırlardan sperma almak için ya kızgınlık gösteren bir kısrağ ya da fantoma (yapay maket) gereksinim vardır. Kızgınlık göstermeyen ya da gebe olmayan kısrağlara östrojen hormonu verilerek (5-10 mg stilbestrol) bunların kızgınlık göstermeleri sağlanabilir. Fantoma atlatılarak sperma almak için, aygırların genç yaşta alıştırmaları gerekir.

Ayğırlardan sperma almak için kullanılacak yerin ortalama 4 m yüksekliğinde ve 5 x 5 m eninde olması, oda sıcaklığının da 10 °C'nin altında olmaması gerekir. Sperma almak için, kızgınlık gösteren kısrağın sperma alınacak yerde köstekle tesbit edilir. Spermaları alınacak aygır iki kişi tarafından tutularak sperma alınma yerine getirilir. Kısrağın etrafında dolaştırılarak, ya da kısrağın belli uzaklıkta tutularak libidonun uyarılması ve penisin ereksiyona geçmesi sağlanır. Daha sonra önceden hazırlanarak etüvde bekletilen suni vajen alınır ve kısrağın sağ tarafında beklenir. Irklara ve bireylere göre değişmekle beraber suni vajen sıcaklığının 42-45 °C olması gerekir. Daha sonra penisin rahat çalışması için suni vajenin içindeki su 1/3 oranında boşaltılır.

Bu işlemler tamamlandıktan sonra aygırın kısrağa atlamasına izin verilir. Aygır atladıktan sonra sol elle penis üstten tutulup bunun vajene girmesi sağlanır ve alttan destek verilir. Aygır bir süre gidip gelme hareketi yapar ve sonra sperma vermeye başladığında kuyruğunu yukarı aşağı doğru hareket ettirir. Sperma vermesi tamamlandıktan sonra suni vajenin pistolesi açılarak suyun akması ve şişen penisin vajenden rahatlıkla çıkması sağlanır. Toplanan sperma laboratuvarında değerlendirmeye alınır. Ayğırlardan, ortalama 3 aylık çiftleşme mevsimi süresince (Mart-Haziran) her gün sperma alınabilir. Ancak gün aşırı almak sperma kalitesi bakımından daha uygundur.

#### **4.3.3. Boğadan spermanın alınması**

Bugün pratikte en sık suni vajen yöntemi kullanılmaktadır. Boğadan sperma almak için kullanılan suni vajenin başlıca İngiliz, Sovyet, Danimarka ve Hannover modelleri vardır. Bütün tiplerde ortak özellik sert kauçuktan yapılmış olmaları, bir iç lastik ve toplama kadehinin bulunmasıdır. Bütün modeller 300-600 mm uzunluğunda ve 50-80 mm çapında olup iç lastiğin uzunluğu da ortalama 400-800 mm'dir. Boğanın cinsel uyarıma getirilmesi ve suni vajenle sperma alınabilmesi için bir partnerin bulunması gerekir. Bu iş



için en iyisi kızgın bir inektir. Bazı suni tohumlama istasyonlarında boğayı, boğaya atlatarak da sperma alınmaktadır. Kimi ülkelerde ise, fantom adı verilen yapay maketler de bu amaçla kullanılabilir (Alaçam vd., 1994).

Boğadan sperma almak için kullanılacak yer temiz, aydınlık, tavanı yüksek ve geniş olmalıdır (En az 2,5 x 3,5 m ölçülerinde).

Boğa, sperma alma yerine getirildiğinde önce çekilecek hayvanın etrafında birkaç tur gezdirilir. Daha sonra 2-3 kez boş atlayış yaptırılarak iyi bir cinsel uyarım sağlanır. Cinsel uyarımın kamçılanmasıyla ampullalara spermatozoa akımı hızlandırılmış olur.

Boğalardan spermatolojik özellikleri normal olan sperma alabilmek için uyarım, temas ve çifleşme reflekslerinin yeterince oluşması mutlaka sağlanmalıdır.

Yeterli cinsel uyarıma ulaştığına karar verilen boğa hazırlanan kızgın inek veya fantoma aştırılır. Boğa arama hareketleriyle penisini vulvaya yönlendirmek ister. Bu esnada sperma alacak kişi, önceden hazırlanmış olan suni vajeni (40-42 °C'lik sıcaklığa sahip olması gerekir), penis ile yer arasında 45 °'lik açı yapacak biçimde sağ eliyle tutarak penisin suni vajenin vazelinli ucuna değmesini ve bu uyarımla bir hamlede ejakülasyon yapmasını sağlar.



Şekil 4.8. Boğadan suni vajenle sperma alınması (Alaçam vd., 1994).

Sperma alındıktan sonra boğa çekilen hayvanın üzerinden iner. Alınan sperma ise vakit geçirmeden kontrol edilip değerlendirilmelidir.

Boğadan normal olarak haftada 1-2 kez sperma alınabilir. Ancak zorunlu durumlarda bakım ve beslenmesine özen göstermek koşuluyla haftada 3 kez de sperma toplanabilmektedir.

#### 4.3.4. Koçtan spermanın alınması

Koçtan sperma, suni vajen ve elektro-ejakülasyon yöntemleriyle alınabilir. Pratikte en sık kullanılan yöntem suni vajendir. Koçlardan sperma alabilmek için çekilen hayvanın mutlaka kızgın bir koyun olması gerekmektedir. Aksi takdirde sperma almak mümkün değildir (Alaçam vd., 1994).

Koçtan sperma almak için kullanılan suni vajenin uzunluğu 22 cm, çapı da 5.5 cm kadardır. Sperma alma esnasında suni vajen iç sıcaklığının, mevsime ve hava koşullarına bağlı olarak, ortalama 42-45 °C arasında olması sağlanmalıdır.

Koçtan sperma almak için, sperma alacak kişi, önceden hazırlanmış olan suni vajeni sağ eline alıp, tesbit edilmiş partnerin sağ tarafında bekler.

Koç kızgın koyuna atladığında sol elin avuç içiyle yumuşak bir biçimde penisin vajene girmesi sağlanır. Koç bir hamlede ve hızlı bir şekilde sperma verdiği için koçun partner olan dişiye aşmasına engel olmak gerekir. Diğer bir önemli nokta da penisin yerle 45°'lik bir açı yapacak biçimde vulvaya yönlendirilmesidir. Bu bakımdan teknisyen suni vajeni sağ elinde, yerle 45°'lik açı yapacak biçimde tutmalıdır. Sperma alındıktan sonra suni vajenin içindeki su boşaltılarak suni vajen iç lastiğinin değişik yerlerindeki kıvrımlarda kalan spermanın, bütünüyle toplama kadehine geçmesi sağlanır. Bu şekilde alınan spermalar, spermatolojik özelliklerinin saptanması ve değerlendirilmesi için laboratuvara gönderilir.



Şekil 4.9. Koçtan suni vajenle sperma alınması (Alaçam vd., 1994).

Koçlarda genellikle çiftleşme mevsimi süresince her gün sperma alınabilir. Zorunlu durumlarda iyi bakım ve beslenme koşuluyla günde 2-3 kez de sperma alınabilmektedir.

#### **4.3.5. Tekeden spermanın alınması**

Tekeden sperma almak için pratikte en sık kullanılan metot suni vajen yöntemidir. Tekede kullanılan suni vajen silindirin uzunluğu 7-21 cm arasında olup çapı da 5 cm kadardır. Sperma alma sırasında suni vajen iç sıcaklığının ortalama 40-42 °C arasında olması gerekir (Alaçam vd., 1994).

Koç ve diğ er türlerden farklı olarak biraz ürkek olan tekelerin ( zellikle Ankara keçisi tekelerinin) suni vajene iyice alıştıırılması gerekir.  evre faktörleri ve ırklara göre değişmekle birlikte tekeler 6-7 aylıktan itibaren sperma almak için kullanılabilirler.

Tekelerden sperma almak için kıızgınlık gösteren bir dişi keçi gerekir. Kimi ırklarda, erkek tekeler de partner olarak kullanılabilirler.

Kıızgınlık gösteren dişi keçi bir bakıcıya tutturularak tesbit edildikten sonra, sperma alacak kişi önceden hazırlanmış suni vajeni sağ eline alıp partnerin sağından tekenin keçiye atlamasını bekler. Teke atladıktan hemen sonra sol elinin avuç i iyle penisin suni vajene girebilmesi için yönlendirme işlemi yapar. Tekeler de koçlar gibi bir hamlede ve çok çabuk sperma verdiklerinden dolayı dikkatli olmak gerekir. Alınan sperma laboratuvarında değerlendirilir.



şekil 4.10. Tekeden suni vajenle sperma alınması (Alaçam vd., 1994).

Tekelerden de koçlarda olduğu gibi normalde her gün 1 kez, zorunlu durumlarda günde 2-3 kez sperma alınabilir.

#### 4.3.6. Köpekten spermanın alınması

Köpekten sperma masaj, suni vajen ve elektro-ejakülasyon yöntemleriyle alınabilir. Pratikte en yaygın olarak masaj yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemle sperma alabilmek için; plastik eldiven,  adet steril sperma toplama kadehi ve antibiyotik solüsyonuna gereksinim vardır (Alaçam vd., 1994).

Seksüel stimlasyon için kızgınlık gösteren dişi bir kpeğın arkasında tutulan erkek kpeğın yan tarafında durulup, penisin ereksiyon haline gelmesi beklenir. Penis ereksiyon haline geçtikten sonra, baş ve işaret parmaklarıyla masaj yapılır. Kısa bir süre sonra, ilk sekresyon gelmeye başlar. Bu sekresyonun bitimine doğru penis, kpeğın iki bacağı arasından arkaya alınıp, ana ejakülat ayrı bir sperma toplama kadehine toplanır. Ana ejakülatın alınmasını takiben ayrı bir toplama kadehine de son sekret biriktirildikten sonra, antibiyotik solüsyonu penisin bazı özel yerlerine sürülür.



şekil 4.11. Köpeklerden masaj yöntemi ile sperma alınması (Alaçam vd., 1994).

#### **4.3.7. Kediden spermanın alınması**

Kediden daha çok suni vajen yöntemiyle sperma alınabilir. Terbiye edilerek alıştıırılan erkek kediden 2-3 hafta içinde bu yöntemle rahatlıkla sperma almak mümkündür (Alaçam vd., 1994).

Erkek kediyi uyarmak için penisi sabit kavrama ve pelvis üzerine yapılan basınç yeterlidir. Ergin erkek kedide penis ereksiyona ulaşınca, uygun suni vajen penis üzerinden kaydırılarak 1-4 dakika içinde sperma alınabilir.

Alınan ana ejakülat, miktar, renk, kıvam, pH, motilite, yoğunluk ve morfolojik özellikleri başta olmak üzere değerlendirilmek için laboratuvarında kontrole alınır.

#### **4.3.8. Spermanın saklanması**

Suni tohumlamanın ilk uygulandığı yıllarda toplanan spermalar taze olarak hemen kullanılmaktaydı. Bu durum, erkek damızlıklardan gereği gibi ve uzun süre yararlanmayı önlediği gibi, belli zamanlarda tohumlamaya hazır, yeter sayıda kızgın dişi bulunmaması nedeniyle, alınan spermaların kullanılmadan ziyanına sebep oluyordu. Bu nedenle spermanın özelliklerini yitirmeden gerek hacmini, gerekse yaşama süresini arttırarak spermayı saklama olanakları üzerinde araştırmalar yoğunlaşmıştır. Yapılan yoğun bilimsel çalışmalar sonucunda, hem kısa hem de uzun süreler için, kimi hayvan türlerinde spermatozoanın dölleme gücünü yitirmeden saklanabileceği, bilimsel olarak ortaya konmuştur (Alaçam vd., 1994).

Bu amaçla spermanın, ilk olarak domates suyu, hindistan cevizi sütü gibi sulandırıcılar ile sulandırılıp, daha uzun süre tohumlamada kullanılabilirliği araştırıldı. Sonunda daha çok kimyasal ve biyolojik özelliğe sahip maddelerden oluşun ve spermaya zarar vermeyecek sulandırıcılar, bulundu. Başlangıçta spermayı sulandırıp +5 °C'de tutarak 3-4 güne kadar

tohumlamada kullanmayı başaran araştırcılar, bu sürenin de yeterli olmadığını anlayınca spermayı -79 °C ve -120 °C'de dondurup uzun süreli saklamanın yollarını araştırıp geliştirdiler. Özellikle bu çalışmalarla spermatozoayı derin dondurmanın (deep freezing) etkisinden koruyan gliserini kullandılar. Ayrıca sulandırılmış spermadaki spermatozanın dişi genital organların mikro florasından etkilenmesini önlemek için sperma sulandırıcılarına değişik antibiyotikler katılması gerektiğini de ortaya koydular (Alaçam vd., 1994).

Spermanın saklanması, spermatozoanın uygun sulandırıcılar içinde hareketlerinin sınırlandırılmasını sağlamakla olasıdır. Bu da, ancak spermanın sıcaklığının uygun biçimde düşürülmesiyle mümkün olabilmektedir.

Günümüzde sperma, kısa veya uzun süre (dondurularak) saklanabilmektedir.

#### **4.3.8.1. Kısa süreli saklama**

Bu yöntem, alınan spermaların birkaç gün içinde kullanılmasını sağlamaktadır. Sperma, alındıktan, gerekli spermatolojik muayeneleri ve değerlendirilmeleri yapıldıktan sonra tekniğine uygun olarak sulandırılıp (tohumlama dozuna göre) +5 °C'de muhafaza edilerek tohumlamada kullanılabilir. Ülkemizde de dondurulmuş sperma uygulamasına geçilmeden önce bu şekilde saklanan spermalar ile yoğun bir biçimde sığır suni tohumlaması uygulanmıştır. Yine bu yöntem günümüzde at suni tohumlamasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Aygırlardan alınan spermalar uygun sulandırıcılar ile sulandırılarak +5 °C'de bekletilip, kızgınlık gösteren kısraklar tohumlanmakta ve normal bir döl verimi alınmaktadır.

Aygır spermasını sulandırarak kısa süreli korumak amacıyla;

Yağsız süt	2,4 g
Glikoz	4,9 g
Sodyumbikarbonat	1,6 ml
Bidistile su	96,0 ml
Gentamisin	100,0 mg sulandırıcısı pratikte yoğun bir

biçimde kullanılmaktadır.

#### **4.3.8.2. Spermanın uzun süre saklanması**

Alaşım vd., (1994), Polge, Smith ve Parkes (1949)'e atfen, bu kişilerin, spermanın dondurularak uzun süre saklanıp, suni tohumlama uygulamasında kullanılabileceğini bilimsel çalışmalarıyla ortaya koyduklarını söylemektedir.

Bu tekniğin dayandığı temel ilke, uygun tekniklerle sperma sıcaklığının -79 °C ile -120 °C'ye kadar düşürülerek sıvı azot içinde (-196 °C) muhafaza edilmesidir. Sperma değişik hayvan türlerine ve ırklarına göre değişen teknik ve yöntemlerle dondurulmakta olup hepsinde ortak temel prensipler vardır. Bunların başında spermanın uygun sulandırıcılar ile sulandırılması gelmektedir.

Spermayı sulandırmak için kullanılacak sulandırıcıların kimi temel özellikleri taşıması gerekmektedir. Bunlar;

- a- Osmotik basıncı izotonik olmalı ve hayvan türlerindeki kanın ozmotik basıncına uymalıdır,
- b- Spermatozoanın yaşaması için (canlılığını ve aktivitelerini uzun süre sağlamalı) gerekli olan sentetik kimyasal maddeler arasında bir denge olmalıdır,
- c- Gerek aerob, gerekse anaerob koşullarda spermatozoanın beslenmesini sağlayacak besin maddelerini içermelidir,
- d- Soğuk şokuna karşı spermatozoayı korumalıdır.



e- Spermatozoanın metabolizma artıklarından meydana gelen toksik tesirleri ortadan kaldıracak kimyasal maddeler içermelidir,

f- Spermatozoaya ve dişi genital organlarına zarar verecek, fertilizasyonun şekillenmesine, döllenmiş yumurtanın implantasyonuna ve gelişmesine engel olabilecek enfeksiyon etkenlerini taşımamalıdır,

g- Sulandırıcılarda bulunan kimyasal ve biyolojik maddeler, her zaman bulunabilen, ucuz maddeler olmalıdır.

Bunların yanında, sperma ile sulandırıcının aynı sıcaklık derecesinde olması gerekir. Spermatozoa ani sıcaklık değişimlerinden çabuk etkilenir. Ayrıca temel bir prensip olarak, sulandırıcı spermaya kademeli bir biçimde katılmalıdır. Sperma hiçbir zaman sulandırıcıya katılmaz. Spermaya katılan sulandırıcının miktarı; ejakülat miktarı, sperma motilitesi ve yoğunluğu ile hayvan türlerine göre bir tohumlama dozunda bulunacak aktif spermatozoa sayısına göre belirlenir.

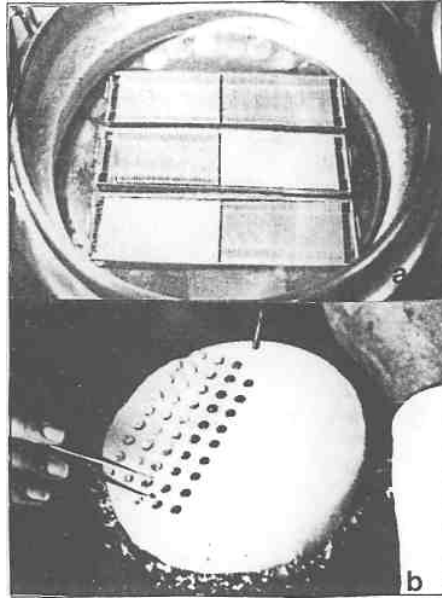
Spermanın uzun süre saklanabilmesi için, bunun, yukarıdaki özellikleri taşıyan ve hayvan türlerine göre en uygun olan sulandırıcılar ile sulandırılıp dondurulması gerekmektedir.

Spermayı dondurmak için bütün türlerde değişmeyen prensipleri şöyle sıralamak mümkündür;

- 1- Spermanın alınması,
- 2- Alınan spermanın laboratuvarda tüm spermatolojik özelliklerinin (miktar, motilite, pH, yoğunluk ve morfoloji gibi) belirlenmesi,
- 3- Türlerle göre belli oranlarda gliserin içeren sulandırıcılar ile sulandırılması,
- 4- Spermanın dozlanması,
- 5- Ne içinde (normal, mini, maksi ve makrotüp) dondurulacaksa ona çekilmesi,

- 6- Belli süre +4 °C'de alıştırmaya tabi tutulması (Equilibration),
- 7- Sıvı azot buharında dondurulması (-79 °C ile -120 °C),
- 8- Dondurulmuş spermanın -196 °C'de sıvı azot tankı içinde muhafaza edilmesi.

Sperma günümüzde ya kuru buz üzerinde pellet, ya da sıvı azot buharında payetler içinde dondurulmaktadır. Bu dondurma teknik ve yöntemlerinde temel prensipler aynı olmakla beraber hayvan türleri arasında kimi farklılıklar da vardır. Hangi yöntemle olursa olsun dondurulan spermalar tanklar içinde -196 °C'de muhafaza edilerek, tohumlamada kullanılmak üzere uygulayıcılara gönderilir.



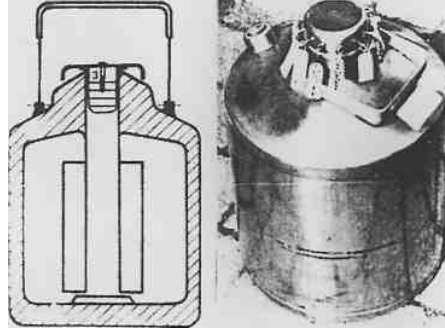
Şekil 4.12. Sperma dondurma yöntemleri. Spermanın, a) Sıvı azot buharında payetler içinde, b) Kuru buz üzerinde pellet yöntemi ile dondurulması (Alaçam vd., 1994).

#### 4.3.9. Aygır spermasının dondurulması

Bugün pratikte aygır sperması, pellet yöntemi yanında daha sık sıvı azot buharında makrotüpler içinde dondurulmaktadır. Bu yöntemle spermayı dondurmak için çok değişik sulandırıcılar kullanılmasına karşılık, bugün en sık kullanılan sulandırıcı (Laktoz (% 11), 75.0 cm<sup>3</sup> + Yumurta sarısı, 20.0 cm<sup>3</sup> + Gliserin, 5,0 cm<sup>3</sup>) dir (Alaçam vd., 1994).

Spermanın muayene ve değerlendirilmesinden sonra, yukarıdaki sulandırıcı katılarak, sperma, belli büyüklükteki bir kuru buz (katı CO<sub>2</sub>) kalıbının üst düzeyinde açılan oyuklara belli miktarda bırakılır. Kısa sürede donan spermalar oyuklardan alınıp özel kaplarına konularak (goblet), tohumlamada kullanılıncaya kadar sıvı azot içinde muhafaza edilir.

Aygır spermasının makrotüpler içerisinde dondurulması için; aygırdan sperma alındıktan sonra sperma, gerekli muayene ve değerlendirmelerden geçerek iki bölümden oluşan sulandırıcının birinci bölümü ile sulandırılarak (1:1 oranında) 5 dakikalık bir sürede 1000 devirde santrifüje edilir. Santrifüje edilen spermanın plazma kısmı pipetle çekilerek, dibe çöken ve spermatozoayı içeren kısım, sulandırıcının ikinci bölümü ile sulandırılıp her biri 4 cm<sup>3</sup> hacmindeki makrotüplere 100-200 milyon motil spermatozoa düşecek biçimde doldurulur. Makrotüpler sıvı azot buharında (-79 °C, -120 °C), sıvı azot seviyesinden 2 cm yukarda tutularak, 15-20 dakika süreyle dondurulur. Dondurulan spermalar gobletlere konularak -196°C'de sıvı azot içinde, tohumlamada kullanılıncaya kadar muhafaza edilir.



Şekil 4.13. Dondurulmuş spermanın muhafaza edildiği konteyner (Alaçam vd., 1994).

Ayır spermalarını makrotüpler içinde dondurmak için kullanılan sulandırıcının formülü aşağıda verilmiştir.

**1. BÖLÜM:**

6,0 g	Glikoz
0,370 g	Etilen diamin tetra asetik asit sodyum tuzu (EDTA)
0,120 g	Sodyum hidrojenkarbonat
0,375 g	Trinatriumsitrat - 2 - Hidrat
100,0 ml	Bidistile su
500,0 I.U.	Penisilin
50.0 mg	Streptomisin

**2. BÖLÜM:**

50.0 ml	Laktoz (%11'lik)
25.0 ml	Merck sulandırıcısı (Bölüm 1)
20.0 ml	Yumurta sarısı
0.8 ml	Equex STM
5.0 ml	Gliserin

#### 4.3.10. Boğa spermasının dondurulması

Boğa sperması ya kuru buz (Katı CO<sub>2</sub>) ve etil alkol, ya yalnız kuru buz ya da sıvı azotta dondurulabilir. Pratikte bu işlem daha sık olarak sıvı azotta yapılmaktadır. Boğalardan alınan spermalar genel muayene ve kontrolleri yapıldıktan sonra uygun sulandırıcılar ile sulandırılıp sıvı azot buharında dondurulmaktadır. Sulandırıcı olarak, yağsız süt, sodyum sitrat + yumurta sarısı, laiciphos 271, laiciphos Plus 470, tris sulandırıcıları yaygın olarak kullanılmaktadır. Ülkemizdeki suni tohumlama laboratuvarlarında en sık laiciphos sulandırıcısı kullanılmakta olup zorunlu durumlarda sodyum sitrat + yumurta sarısı kullanılmaktadır. Kimi batı ülkelerinde ise tris sulandırıcısı yaygın olarak kullanılmakta olup bundan çok iyi sonuçlar alındığı bildirilmektedir. Boğa sperması pratikte payetlerde (mini, maksı) dondurulmaktadır (Alaçam vd., 1994).

Sperma, yukarıda adı geçen sulandırıcılardan bir tanesiyle, bir tohumlama dozunda (5, 10, 15 milyon) yeterli motil spermatozoa bulunacak biçimde sulandırılarak payetlere çekilir. Payetlere çekilmiş sperma, + 4 °C'de 2,5 saat süreyle alışım (Equilibration) tâbi tutulur. Alışım sonunda sperma, sıvı azot buharında (-79 °C, -120 °C) 7 dakika süreyle dondurulup, sıvı azot içinde -196 °C'de tohumlamada kullanılmak üzere muhafaza edilir.

Boğa spermasını dondurmada kullanılan Tris sulandırıcısı;

2,4 g Tris

1,3 g Sitrik asit

1,0 g Glikoz

7,0 ml Gliserin

15,0 ml Yumurta sarısı

72,0 ml Bidistile su, formülüyle hazırlanmaktadır.

Boğa sperması ülkemizdeki suni tohumlama istasyonlarında ise aşağıdaki biçimde sulandırılıp dondurulmaktadır;

- 1- 50 g laiciphos 488, 40 °C'de 400 ml bidistile suda eritilir,
- 2- 50 ml yumurta sarısı 50 °C'de 100 ml bidistile su ile karıştırılır.
- 3- Bu iki bileşim karıştırılıp buna 500.000 I.U penisilin ve 0,5 g streptomisin ilave edilir,
- 4- Toplam 600 ml olan bu sulandırıcı 2 eşit parçaya bölünür,
- 5- Birinci bölüme 3 ml, ikinci bölüme 37 ml olmak üzere toplam 40 ml gliserin ilave edilir (% 7),
- 6- Sulandırıcının birinci bölümünde sulandırılan sperma 25 °C'deki su banyosuna alınarak sıcaklığının + 4 °C'ye düşmesi, yaklaşık 45-60 dakika içinde, soğutma kabininde sağlanır,
- 7- Burada, 9-10 dakika aralıklarla ve 5 defada ikinci sulandırıcı ilave edilir,
- 8- Sperma +4 °C'de 2-3 saat süreyle bekletilir (alışım),
- 9- Daha sonra 0,25 ml'lik payetlere çekilir,
- 10- Payetler sıvı azot buharında 7 dakika süreyle dondurulur.
- 11- Dondurulan sperma, -196 °C'de sıvı azot içinde muhafaza edilerek tohumlama merkezlerine gönderilir.

#### **4.3.11. Koç spermasının dondurulması**

Koç sperması da boğa sperması gibi ampul, payet ve pellet yöntemleriyle doldurulabilmektedir. Bu amaçla, günümüzde çok değişik sulandırıcılardan yararlanılmakta (özellikle tris sulandırıcısı) ve dondurma sırasında sıklıkla mini tüpler ve payetler kullanılmaktadır. Koçtan alınan spermanın tüm özellikleri belirlendikten sonra sperma, tekniğine uygun olarak bir tohumlama dozunda 50 milyon motil spermatozoa bulunacak biçimde sulandırılır. Daha sonra mini tüplere çekilir ve 2,5-3 saat süreyle +4 °C'de alışım (Equilibration) bırakılır. Alışım sonucu sperma, -79 °C ile -120

°C arasında sıvı azot buharında dondurulup, -196 °C'de muhafaza edilir (Alaçam vd., 1994).

Koç spermasını dondururken kimi sulandırıcılar yanında;

9,84 g	Rafine şeker
0,84 g	EDTA
0,05 g	DI-Tert-butylleresol
3.0 g	Gliserin
3.0 ml	Yumurta sarısı
100.0 IU.	Penisilin
0,1 g	Streptomisin
100.0 ml	Bidistile su içeren sulandırıcı da kullanılabilir.

#### **4.3.12. Teke spermasının dondurulması**

Teke sperması da 1/4 ya da 1/8 oranında inek veya keçi sütü, sodyumsitrat, glukoz-fosfat gibi sulandırıcılar ile sulandırılıp belli süre saklanarak tohumlamada kullanılabilir (Alaçam vd., 1994).

Teke sperması pellet, ampul ve payet (minitüp) yöntemiyle dondurulabilir. Günümüzde daha çok payet yöntemiyle dondurulmakta ve pratikte kullanılmaktadır.

Teke spermasını sulandırmak için en sık Tris sulandırıcısı, 1/2 oranında kullanılmakta olup laktoz, laiciphos ile de sulandırma yapılmaktadır. Sperma, uygun dozlarda sulandırılıp payetlere çekildikten sonra +4 °C'de 2,5-3 saat süreyle alışım bırakılmakta ve alışım sonunda sıvı azot buharında (-79 °C, -120 °C) 15-20 dakika süreyle dondurulup sıvı azot içinde (-196 °C) saklanmaktadır.

Ülkemizde yapılan bir çalışmada, Ankara keçilerinden alınan sperma örnekleri;

70.0 ml Tris

20.0 ml Yumurta sarısı

7.0 ml Gliserin

3.0 ml Bidistile su formülü ile sulandırılıp, 0.25'lik payetler

içinde +5 °C'de iki saatlik alışımından sonra sıvı azot buharında 20 dakika sürede başarılı biçimde dondurulmuştur.

#### **4.3.13. Köpek spermasının dondurulması**

Köpek sperması;

2,4 gr Tris

1,3 gr Sitrat

1.0 gr Glikoz

8,8 ml Gliserin

20.0 ml Yumurta sarısı

72,2 ml Bidistile su

100,0 mg Streptomisin

100,000 I.U. Penisilin içeren sulandırıcı ile 1/3 oranında sulandırılıp, 0,25 ml hacmindeki payetler içinde dondurulmaktadır. Payetlere çekilen sperma 2 saat süreyle +4 °C'de alışımına tabi tutularak -79 °C, -120 °C'de sıvı azot buharında dondurulur (Alaçam vd., 1994).

Donmuş spermalar, -196 °C'de azot tanklarında ya da konteynerlerde, tohumlamada kullanılıncaya kadar muhafaza edilir.



#### **4.3.14. Suni tohumlama**

Suni tohumlama yöntemiyle tohumlanan hayvanlardan normal bir döl verimi alabilme, spermanın, tekniğine uygun olarak toplanması, değerlendirilmesi ve saklanması yanında tekniğine uygun bir biçimde dişi üreme kanalına verilmesine de bağlıdır (Alaçam vd., 1994).

Hayvanlardan yeterli döl verimi alınabilmesi için başta dölleme olayları zincirinin en önemli halkalarından birisi olan fertilizasyonun (dölleme) oluşması şarttır. Fekondasyon olgusunu gerçekleştirecek olan ovum ve spermatozoa, dişi üreme kanalında kimi kimyasal ve fiziksel değişikliklere uğradıktan sonra gerekli yeteneği kazanır ve bu özelliklerini sınırlı bir süre için koruyabilir. Bu bakımdan hayvan türüne özgü en uygun tohumlama zamanının beklenmesi, en uygun teknik ve yöntemin uygulanması çok önemlidir.

#### **4.3.15. Atlarda suni tohumlama**

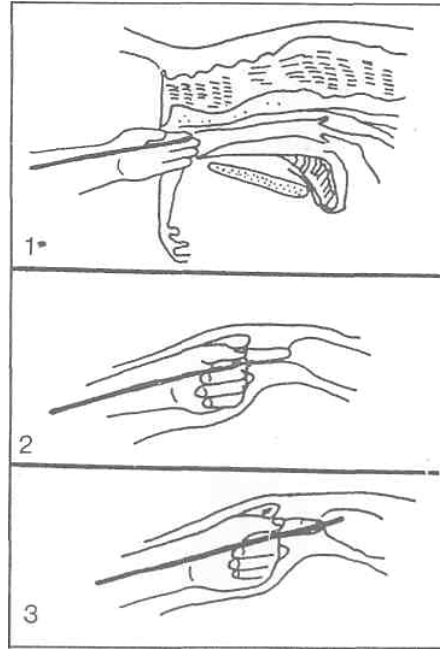
Kısrakların kızgınlık süresinin uzunluğu, aygır spermatozoasının yaşama süresi, atlarda döl verimini önemli ölçüde etkilemektedir. Bu nedenle kısraklarda ovulasyon zamanının bilinmesi zorunludur. Bu da ancak bu işte pratik kazanmış elemanlar yardımıyla ve kısrakların muayene ve kontrollerinin özenle yapılması ile mümkündür (Alaçam vd., 1994).

Kısraklarda en uygun tohumlama zamanını saptamak amacıyla birçok araştırma yapılmıştır. En yüksek döl verimi oranı, ovulasyondan bir gün önce ve ovulasyon anında yapılan tohumlamalardan alınmıştır.

Ülkemizde, özellikle devlet kurumlarında kısraklar kızgınlığın başlangıcından bitimine kadar tohumlanmaktadır. Diğer bir uygulamada ise, doğumdan sonraki dokuzuncu günde (tay kızgınlığı) kısraklar tohumlamaya alınmaktadır.

Atlardan normal bir döl verimi alabilmek için kısrakları, taze (natif) ve sulandırılmış sperma ile ovulasyondan bir gün önce ve ovulasyon anında, donmuş sperma ile de ovulasyondan hemen sonra tohumlamak gerekir.

Kısraklarda daha çok vajinal tohumlama yöntemi uygulanmaktadır. Bu amaçla; kızgınlık belirtilerine göre yapılan kontroller sonucunda seçilerek tohumlanacak kısрак önce iyice tesbit edilir. Vulva dudakları temizlenir ve kullanılan ele steril, uzun eldiven takılarak, serum fizyolojik veya uygun bir sıvı madde ile kayganlaştırılır. Daha sonra tohumlama pipeti (kateter) avuç içine alınarak el vajinaya sokulur. Kol yeterince ilerletildikten sonra parmaklar yardımıyla kateterin uterusu girmesini sağlanır. Bundan sonra enjektöre çekilmiş olan natif ya da sulandırılmış sperma, bir yardımcı tarafından kateterin dışardaki ucundan enjekte edilerek, kısрак tohumlanır.



Şekil 4.14. Kısraklarda vajinal yolla tohumlama yöntemi (Alaçam vd., 1994).

Tohumlamada donmuş sperma kullanılacak ise, sıvı azot içerisinde muhafaza edilen sperma önce su banyosunda 50 °C'de 40 saniye süreyle çözülüp motilite kontrolleri yapılır. Daha sonra kullanılacak makrotüpün bir ucu makasla kesilip, tohumlama kateterine takılır. Önceki manipulasyona benzer bir biçimde iç kısma girildikten sonra dışarıda kalan uç da kesilip enjektörle biraz hava verilerek kısrağın tohumlanmış olur. Bu amaçla vajina spekulumundan da yararlanılabilir.

Kızgınlık gösteren kısrağın tohumlanması için sulandırılmış sperma 10 ml, dondurulmuş sperma 4 ml oranında kullanılmalı ve bunların 100 milyon motil spermatozoa içermelerine özen gösterilmelidir.

Atlardan normal bir döl verimi alabilmek için kısrağın ve aygırların bireysel üreme özelliklerinin iyi bilinmesi ve kontrol edilmesi yanında tohumlama sezonu başlangıcında, kısrağın ve aygırların gerekli organlarından tekniğine uygun olarak örnekler alınarak döl verimine etkili mikro floranın saptanması yararlı olur.

#### **4.3.16. Sığırlarda suni tohumlama**

Sığır suni tohumlamasından yüksek oranda döl verimi alınabilmesi büyük ölçüde ineklerde bazı evrelerin iyi tanınmasına bağlıdır (Alaçam vd., 1994).

İnekte kızgınlık süresinin kısa olması ve ovulasyonun, kızgınlığın bitiminden yaklaşık 6-12 saat sonra şekillenmesi, en uygun tohumlama zamanının seçimini güçleştirmektedir. Tohumlamanın başarısı, ovum ve spermatozoanın fertil olarak uygun bir zaman ve ortamda, spermatozoanın ovumdan önce oviducta gelmesinin sağlanmasına bağlıdır. Bunun nedeni spermatozoanın genital kanalda ovumdan daha uzun süre canlı kalabilme özelliğine sahip olmasındandır. Bu süre spermatozoa için 2-3 gün olabilesine karşın ovum için sadece 20-24 saat kadardır. Ayrıca

spermatozoanın genital kanal içerisinde belli bir kapasitasyon dönemi geçirme gereği göz önüne alındığında tohumlamanın, mutlaka ovulasyondan önceki dönemde yapılması gerekir. Bu bakımdan, ineklerde kızgınlığın ortasında ve kızgınlığın sonuna doğru yapılan tohumlamalardan yüksek döl verimi elde edilebilir. Kızgınlığın başlangıcı ve bitiminden sonra yapılan tohumlamalarda ise döl verimi düşüktür.

Sığırlarda spekulum, cervix pensi (Koher pensi) ve rekto-vaginal tohumlama yöntemleri kullanılmaktadır. Özellikle, donmuş sperma uygulamasına geçildikten sonra daha çok ve yaygın olarak rekto-vaginal tohumlama yöntemi kullanılmaktadır.

Kızgınlığı belirlenip tohumlanmasına karar verilen inek önce tesbit edilir. Payet içindeki donmuş sperma, bir pens yardımı ile sıvı azottan çıkartılarak, 37-40 °C’de, 10-15 saniye süreyle su banyosunda çözülür. Payet, kağıt havlu ile kurutularak, tamponsuz ucu kesilir ve tohumlama pistolesine yerleştirilerek üzerine koruyucu plastik kılıf takılır. Sonra kullanılan ele uzun kollu bir eldiven takılıp üzerine kayganlaştırıcı dökülür ve diğer elin iki parmağı ile vulva dudakları aralanarak tohumlama pistolesinin ucunun vajinaya girmesi sağlanır. Arada gerçekleştirilen bir takım işlemlerden sonra basınçla payet içerisindeki spermanın verilmesiyle suni tohumlama işlemi tamamlanır.

#### **4.3.17. Koyunlarda suni tohumlama**

Koyunlarda genellikle natif, bazen de sulandırılmış sperma kullanılmaktadır. Dondurulmuş sperma ile yapılan tohumlama çalışmalarından henüz istenilen düzeyde döl verimi alınamamaktadır (Alaçam vd., 1994).

Koyunlar, arama koçlarının sürüye bırakılması ve kızgınlık belirtileri gösterenlerin belirlenmesiyle tesbit edilirler.

Koyunlarda en sık spekulum ile tohumlama yöntemi kullanılmaktadır. Tohumlanacak koyunlar tesbit edilirken çok dikkatli izlenmeleri gerekir. Koyunlarda ovulasyon ortalama 24-30 saat arasında olmaktadır. Bu bakımdan koyunların ovulasyondan önce ve kızgınlığın sonuna yakın bir dönemde tohumlanmaları gerekir.

Kızgınlığı belirlenen koyunlar tohumlanmak için değişik biçimlerde tesbit edilebilirler. Bu amaçla koyunun ya başı bağlanıp arkası kaldırılır, ya da tohumlamacının rahat çalışması için diz hizasına kadar bir çukur hazırlanıp tohumlamacı ayaklarını bu çukura uzatarak oturur, böylece önünde tesbit edilen koyunu rahatlıkla tohumlayabilir.

Koyunlar bu şekilde tesbit edildikten sonra, uygun kayganlaştırıcı ile kayganlaştırılan spekulum vajinaya sokulur. Daha sonra, bir takım uygulamalardan sonra sperma çekilmiş (ortalama 0.05-0.02 cm<sup>3</sup> sperma) tohumlama pipeti spekulumun arasından geçirilip pipetin geçebildiği ölçüde (4-6 mm gibi) ileriye yönlendirilerek sperma enjeksiyonu gerçekleştirilir. Normal bir döl verimi alabilmek için koyunlara verilecek sperma içerisinde ortalama 50-100 milyon motil spermatozoa bulunması gerekmektedir.

Bu şekilde tohumlanan koyunların, 12-14 gün sonra tekrar arama koşulları ile kontrolleri yapılmaya başlanarak döl verim oranları saptanır.

#### **4.3.18. Keçilerde suni tohumlama**

Kızgınlığı belirlenen keçiler, koyunlarda olduğu biçimde tesbit edilerek spekulum yöntemiyle tohumlanırlar. Tohumlamalardan sonra uygun teknik ve yöntemlerle gebelik kontrolleri yapılır (Alaçam vd., 1994).

Kızgınlığı belirlenen keçilerin tohumlanmasında natif sperma 0.05 ml, dondurulmuş sperma 0.25 ml miktarında kullanılmalı ve sperma, 100 x 10<sup>6</sup> motil spermatozoa içermelidir.

Kızgınlığı belirlenen keçiler tıpkı koyunlarda olduğu biçimde tesbit edilerek spekulum yardımıyla tohumlanırlar.

#### **4.3.19. Köpeklerde suni tohumlama**

Vücut yapıları arasındaki farklılıklardan ötürü doğal olarak çiftleşemeyen köpek ırkları arasında melezleme çalışmaları yapabilmek ve köpeklerde kimi genital hastalıkları önleyebilmek amacıyla yapılan suni tohumlamalarda; Tupfe, vajinoskop, ışık kaynağı, spekulum, 37 °C sıcaklıkta NaCl solüsyonu, cam pipet ve enjektöre gereksinim vardır (Alaçam vd., 1994).

Tohumlanacak dişi köpek, bir yardımcı tarafından masa üzerinde veya ayakta tesbit edilir. Vajinal sitoloji yöntemiyle kızgınlık siklusunun hangi evresinde olduğu saptanır.

Köpeklerin, vulva dudakları temizlendikten sonra, NaCl solüsyonu ile kayganlaştırılan spekulum yardımıyla vajina kontrol edilir. Spekulum vajinadan çıkarılmadan cam pipet ile ileriye itilerek, enjektöre çekilmiş olan sperma, cam pipetin dışarda kalan tarafından yavaş yavaş verilir. Sperma verilme işlemi bittikten sonra, köpeğin arkası bir süre yukarıda tutulup clitorisine masaj yapılır.

Köpeklerde taze ve sulandırılmış sperma ile yüzeysel hücrelerin yoğun olarak görüldüğü dönemin 2. günü ilk ve bundan 48-72 saat sonra ikinci tohumlama yapılır. Dondurulmuş sperma kullanılıyor ise, bu dönemin 4. günü ilk ve bundan 24-48 saat sonra da ikinci tohumlama yapıldığında normal bir döl verimi alınabilir.

Ülkemizde henüz yeterince uygulanmayan köpek suni tohumlamasının gelecekte diğer türlerde olduğu gibi yaygın bir biçimde kullanılması kaçınılmazdır. Bu nedenle köpeklerden normal bir döl verimi alabilmek için bu hayvanların seksüel evrelerini, optimal tohumlama zamanlarını ve

spermatolojik özelliklerini iyi tanımak ve suni tohumlama tekniklerini yeterince bilmek ve uygulamak gerekmektedir.

#### **4.4. Balıklarla İlgili Yapılan Sperm Muhafaza Çalışmaları**

Balıklarda spermlerin soğuk muhafazası ile ilgili pek çok araştırma yapılmıştır. Bunlardan birinde sperm koruyucu olarak, 0.3 M glukoz + % 10 metanol + % 10 yumurta sarısı ve 0.6 M sükröz + % 10 DMSO + % 10 yumurta sarısı kullanılmış, dışkı, kan, idrar gibi maddelerin sperme bulaşmaması için sperm, 10 ml'lik şırınga ile alınmıştır. Uygulamada koruyucu karışımdan 3 birim, spermden 1 birim kullanılmıştır. Yani sperm/koruyucu oranı 1:3 şeklinde ifade edilebilir. Burada araştırmacılar, spermi daha uzun süre muhafaza edebilmek için likit nitrojenden de faydalanmışlardır. Spermi saklamak için 0.5 ml'lik payetler kullanmışlar ve öncelikle bunları likit nitrojenin yüzeyinden 2 cm yukarıda tutarak sıvı azot buharına maruz bırakmışlardır (Cabrita vd., 2001). Böylece spermleri, yapısını bozmadan kademeli olarak dondurmuşlar (dondurma oranı - 30 °C dak<sup>-1</sup>) ve 10 dakika sonra payetleri likit nitrojen içine koyup 4 hafta boyunca muhafaza etmişlerdir. Daha sonra spermleri yumurta döllemede kullanmak için çözücü olarak su banyosu kullanmışlar ve içinde donmuş spermler bulunan payetleri, 5 °C'deki suya 90 saniye (Wheeler ve Thorgaard, 1991), 15 °C'deki suya 45 saniye ve 25 °C'deki suya 30 saniye boyunca (Lahnsteiner vd., 1995; Cabrita vd., 2001) daldırıp çıkarmışlardır (Sarvi vd., 2006).

Başka bir çalışmada kuru buz sperm koruyucusu olarak, 103 mM NaCl, 40 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.8 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM hepes, % 10 metanol, % 1.5 BSA, % 7 yumurta sarısı, % 0.5 sükröz karışımı, 1:3 ya da 1:5 (sperm/koruyucu) (Aleandri ve Galli, 1999) oranında kullanılmıştır. Burada araştırmacılar, spermi daha uzun süre muhafaza edebilmek için yine likit nitrojenden faydalanmışlardır. Spermi saklamak için 0.5 ml'lik payetler

kullanılmış ve bunlar bir soğutma ünitesinde 4 °C'de 10 dakika süreyle bekletilmiştir. Payetler dondurulduktan sonra hemen -196 °C'deki sıvı azota aktarılmış, spermleri yumurta döllemede kullanmak için çözücü olarak yine su banyosu kullanılmış ve içinde donmuş spermler bulunan payetler, 25 °C'deki suya 30 saniye boyunca daldırıp çıkarılarak spermlerin üzerindeki buzun çözülmesi sağlanmıştır (Salte vd., 2004).

Bir başka çalışmada Erdahl ve Graham (1980) mineral solüsyonu #6 içinde sperm koruyucu olarak kullanılan % 7 oranındaki dimetil sulfoksit (DMSO), % 10'luk yumurta sarısı ve 7.5 mg/ml 'lik Dan Pro S760R (soya protein kompleksi) ile birleştirilmiştir. Uygulamada dondurma işleminden önce seyreltme işlemi için koruyucu karışımdan 3 birim, spermden 1 birim kullanılmış ve sperm bu solüsyon içinde, DMSO'nun hücrelere iyice işlemesi için 15 dakika bekletilmiştir. Burada spermi saklamak için 0.5 ml'lik payetler kullanılmış ve bunlar strafor kutucuk içerisinde likit nitrojenin yüzeyinden 2 cm yukarıda, 10 dakika (donma oranı 63 °C dak<sup>-1</sup>) boyunca tutulmuştur. Daha sonra payetler, likit nitrojen içine konulup spermler kullanılıncaya ve son olarak 25 °C'deki suda 30 saniye boyunca su banyosu uygulaması ile çözdürülene kadar muhafaza edilmiştir (Robles vd., 2003).

Diğer bir çalışmada Lahnsteiner (2000) sperm muhafaza metodunda koruyucu bileşim olarak, 103 mM NaCl, 40 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.8 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM hepes, % 10 metanol, % 1.5 inek serum albumin (BSA), % 7 yumurta sarısı, % 0.5 sükroz karışımı, 1:3 (sperm/koruyucu) oranında kullanılmıştır. Sperm, seyreltikten 2-5 dakika sonra, kullanılmadan önce 4 °C'de bekletilen 1.2 ml'lik payetlere konulmuş ve daha uzun süre muhafaza edilebilmesi için yine likit nitrojenden faydalanılmıştır. Payetler, likit nitrojenin yüzeyinin 1 cm üstünde 10 dakika boyunca bekletilip dondurulmuş ve daha sonra likit nitrojen içine daldırılmışlardır. Bunlar en son, 30 °C'deki



suya 30 saniye boyunca daldırıp çıkarılarak spermilerin üzerindeki buzun çözülmesi sağlanmıştır (Lahnsteiner vd., 2002).

Labbe ve Maisse'nin (2001) yaptığı bir çalışmada, sperm dondurmada koruyucu olarak, % 80 Mounib solüsyonu (125 mM sükröz; 6.5 mM azaltılmış glutathion; 100 mM KHCO<sub>3</sub>; Mounib, 1978), % 10 kuş yumurtası sarısı emülsiyonu ve % 10 DMSO bileşimi, 1:3 (sperm/koruyucu) oranında kullanılmıştır.  $1.9 \times 10^9$  spermatozoa içeren 500 mikrolitrelik süspansiyon 500 µl'lik payetlere koyulmuştur. Payetler, likit nitrojenin yüzeyinin 3 cm yukarısında tutulmuş, böylelikle içlerindeki spermilerin sıvı azot buharında donması sağlanmıştır. Bunlar, 10 dakika sonra likit nitrojen içerisine daldırılıp günlerce saklanmıştır. Dondurulan spermin buzu çözdürülürken, spermin sıcaklığını 4 °C'ye indirmek için payetler, 10 saniye süresince 37 °C'deki suya daldırılmıştır (Labbe ve Maisse, 2001).

Cabrita ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise sperm koruyucu bileşim olarak, % 7 DMSO, 7.5 mg/ml Promin ve % 10 yumurta sarısı (Cabrita vd., 1999) içeren Erdahl ve Graham (1980) solüsyonu, 1:3 (sperm/koruyucu) oranında kullanılmıştır. Burada dengeleme süresi olarak 15 dakika beklenilmiş ve spermier 0.5-1.8-5 ml'lik payetler içerisine (1.8 ve 5 ml'lik payetlerde metalik destek bulunuyor) konup strator kutucuk içerisinde sıvı azot yüzeyinden 2 cm yukarıda, 10 dakika boyunca tutulmuştur. Daha sonra payetler, likit nitrojen içine konulmuştur. Bu arada 4 °C'den -20 °C'ye, -20 °C'den -100 °C'ye kadar olan dondurma koşullarında denemeler yapılmıştır. Bunun yanında 4 °C'den -20 °C'ye, -20 °C'den -196 °C'ye kadarki çözdürme koşulları test edilmiştir. Burada yapılan tüm uygulamalar 3 kez yapılmıştır. Ayrıca çözdürme için 0.5 ve 1.8 ml'lik payetler için 25 °C'deki suda 30 saniye boyunca su banyosu uygulaması, 5 ml'lik payetler için 25 °C'deki suda 30 saniye boyunca, 60 °C'deki suda 30 saniye boyunca, 80 °C'deki suda 30 saniye boyunca su banyosu uygulaması denenmiştir. Tüm bu denemelerle

beraber Propidyum iodit ile seyreltme çalışmaları da yapılmıştır (Cabrita vd., 2001).

Diğer bir çalışmada Lahnsteiner, Weismann ve Patzner 'in (1994, 1995) uyguladıkları metoda göre sperm koruyucu bileşim olarak, 103 mM NaCl, 40 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.8 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM hepes, % 5 DMSO, %1 gliserol, % 1.5 inek serum albumin (BSA), % 7 yumurta sarısı, % 0.5 sükroz karışımı, 1:3 (sperm/koruyucu) oranında kullanılmıştır. İçerisine sperm konulan 0.5 ml'lik payetler, izole bir kutuda likit nitrojenin yüzeyinin 1.5 cm üstünde (-110 °C ± 1 °C dondurma sıcaklığında), sıvı azot buharında 5 dakika içinde dondurulmuştur. 5 dakikalık dondurma periyodundan sonra payetler, 30 dakikalığına likit nitrojen içine daldırılmışlardır. Bunlar en son, 25 °C'deki suya 30 saniye boyunca daldırıp çıkarılarak spermilerin üzerindeki buzun çözülmesi sağlanmıştır. Burada yapılan araştırmaya göre taze spermilerin 30, 60, 80, 120 dakika sürelerince muhafaza denemelerinin yapılabileceği belirtilmiş ve bununla birlikte likit nitrojende muhafaza kapsamında 30 dakikadan 340-370 güne kadar saklama sürelerinin denendiği bildirilmiştir (Lahnsteiner vd., 1996).

Benzer bir çalışmada Lahnsteiner vd.'nin protokolüne göre (1995, 1996b) sperm koruyucu bileşim olarak, 103 mM NaCl, 40 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.8 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM hepes, % 5 DMSO, %1 gliserol, % 1.5 inek serum albumin (BSA), % 7 yumurta sarısı, % 0.5 sükroz karışımı ve bunların yanında % 10'luk metanol, koruyucu olarak, 1:3 (sperm/koruyucu) oranında kullanılmıştır. Burada dengeleme süresi olarak 15 dakika beklenilmiş ve 0.5-1.2-5 ml'lik payetler muhafaza için kullanılmıştır. 30-50 adet arası payet, 5 dakika içerisinde spermle doldurulmuştur. 0.5-1.2 ml'lik payetler 10 dakika, 5 ml'lik payetler 15 dakika süresince izole bir kutu içerisinde likit nitrojen buharında tutulmuştur. Daha sonra payetler, 60 dakikalığına likit nitrojen içine daldırılmıştır. Bunlar en son, 25 °C'deki suya 30 saniye boyunca

daldırıp çıkarılarak spermilerin üzerindeki buzun çözülmesi sağlanmıştır (Lahnsteiner vd., 1997).

Yapılan bir çalışmada, Erdahl vd., (1984), Erdahl ve arkadaşlarına (1980) atfen, döllenmede artış gösteren seyreltilmiş sperm olarak anlattıkları durumda, 1:2 (sperm/koruyucu) oranında, sperm koruyucu bileşim olarak, % 7 Me<sub>2</sub>SO (dimethyl sulfoxide), etilen glukol ve gliserolün kullanıldığını belirtmiştir. Spermiler 0.25 ml'lik payet ve 0.10 ml'lik tabletler içinde dondurulmuş ve donan spermiler, - 79 °C ve -196 °C'de 1 saat boyunca saklanmıştır (Erdahl vd., 1984).

Stoss ve Holtz'un (1983) yaptıkları bir çalışmada ise sperm koruyucu olarak 5'den 20 ml'ye kadar /100 ml hesabı ile 0 °C'de 1, 2, 4 ve 60 dakikadan daha az sürelerde testler yapılmıştır. Bunun yanında 0, 100, 200 ya da 300 mmol'luk oranlarda sükröz ve 0, 6.7, 13.4, 20.2, 26.9 ya da 33.6 mmol oranlarında KCl koruyucu olarak denenmiştir. Ayrıca NaHCO<sub>3</sub> ve ozmotik basıncın çözücü ve çözülmüş sperm üzerine etkisi test edilmiştir.

#### **4.5. Proje Kapsamında Yapılan Sperm Muhafaza Çalışmaları**

Alabalık spermilerinin kısa süreli muhafazasıyla ilgili yaptığımız ilk araştırmada, Manisa'da bulunan bir alabalık işletmesinde ağırlıkları 590-1318 gr arası, boyları 37,6-46,6 cm arası değişen 20 alabalık formaldehit ile bayıltılmış ve bunlardan sağım yöntemiyle sperm örnekleri alınmıştır. Sağım için genital bölgeler kuru ve temiz havlular ve kağıt ruloları ile iyice silinip temizlendikten (Canyurt vd., 2003) sonra sperma, daha önceden numaralandırılmış 15 ml'lik tüplere sağılmıştır. Sağım sırasında spermanın temiz olması için muhtemel idrar, dışkı, kan ve doku parçalarının tüpe girmemesine dikkat edilmiştir (Canyurt vd., 2003). Bunun için balıkların anal bölgeleri, kuru ve temiz kağıt ruloları ile silinmiş, genital kanaldan ilk çıkan dışkı az yoğun süt kullanılmamıştır. Bu arada sağılan her balığın ağırlık, boy, en değerleri ve sağım sırasında damlayan sperm damla sayısı, sperm

konsantrasyonu vb. değerlerin hesaplanabilmesi için kaydedilmiştir. Daha sonra bu tüpler, laboratuvarında mikroskop altında incelenmek üzere ağızları kapatılarak 0 °C'deki buz içerisinde hazırlanan yerlerine yerleştirilmiştir. Laboratuvara 1 saatte buzluk içinde içinde ulaştırılan sperm örnekleri, işletme sahasından alınan su örneğinden her örnek için birkaç damla hesabı ile canlandırılmaya çalışılıp hemen mikroskop altında incelenmiştir. Son işlem olarak sperm hacmi hesaplama işlemine geçilmiş ve sperm sayımı yapılmıştır. Bunun için örnekler önce 100 daha sonra 50 ml'lik mezürde seyreltilmiş, 1 ml örnek alınıp mezürlere eklenmiştir ve spermler Thoma lamında sayılmıştır.

Alabalık spermelerinin kısa süreli muhafazasıyla ilgili yaptığımız ikinci araştırmada, Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi'nin Tire'de uygulama amaçlı bulunan alabalık tesisinde bu kez ağırlıkları 188-1009 gr arası, boyları 25,5-40,5 cm arası değişen 10 alabalık formaldehit ile bayıltılmış ve bunlardan sağım yöntemiyle sperm örnekleri alınmıştır. Sağım için genital bölgeler yine kuru ve temiz havlular ve kağıt ruloları ile iyice silinip temizlendikten sonra sperma, daha önceden numaralandırılmış 15 ml'lik tüplere sağılmıştır. Sağım sırasında spermanın temiz olması için muhtemel idrar, dışkı, kan ve doku parçalarının tüpe girmemesine dikkat edilmiştir. Bunun için balıkların anal bölgeleri, kuru ve temiz kağıt rulolar ile silinmiş, genital kanaldan ilk çıkan dışkı az yoğun süt kullanılmamıştır. Bu arada sağılan her balığın ağırlık, boy, en değerleri ve sağım sırasında damlayan sperm damla sayısı kaydedilmiştir. Daha sonra bu tüpler, laboratuvarında mikroskop altında incelenmek üzere ağızları kapatılarak 0 °C'deki buz içerisinde hazırlanan yerlerine yerleştirilmiştir. Laboratuvara yaklaşık 2 saatte buzluk içinde içinde ulaştırılan sperm örnekleri, işletme sahasından alınan su örneğinden her örnek için birkaç damla hesabı ile canlandırılmaya çalışılıp hemen mikroskop altında incelenmiştir.

İlk iki uygulamadan sonra spermelerde hareketlilik ile ilgili balıkların hem gonadlarının incelenmesi hem de direkt olarak gonadları 0 °C'deki buz içerisinde petri kaplarında laboratuvar ortamına getirip burada sperm örneğini inceleme kararı alınmıştır. Bunun için Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi'nin Tire'de uygulama amaçlı bulunan alabalık tesisine tekrar gidilip bu kez ağırlıkları sırasıyla 880 gr ve 730 gr olan iki gökkuşaağı alabalığının gonadları karın kesme yöntemiyle alınmıştır. Bu işlem için bistüri ve petri kaplarından faydalanılmıştır. Bistüri yardımıyla karnı kesilen alabalıkların gonadları dikkatlice çıkartılıp petri kaplarına konulmuştur. Daha sonra bu petri kapları, ağızları kapatılarak 0 °C'deki buz içerisinde hazırlanan yerlerine yerleştirilmiştir. Laboratuvara yaklaşık 2 saatte buzluk içinde ulaştırılan gonadlar bistüri ile kesilmiş ve bunlardan alınan sperm örnekleri işletme sahasından alınan su örneğinden her örnek için birkaç damla hesabı ile hemen mikroskop altında incelenmiştir.

Spermelerinin kısa süreli muhafazasıyla ilgili yaptığımız dördüncü ve son araştırmada, Fethiye'de bulunan bir alabalık işletmesinde bu kez öncelikle deneme amaçlı birkaç porsiyonluk alabalık sağılmıştır. Fakat bu alabalıklardan yeterli miktarda sperm örneği elde edilemediğinden dolayı örnek alımına anaç balıklardan devam edilmiştir. Seçilen yaklaşık 1200 gr'lık bir anaç bayıltılmadan 25 ml kapasiteli bir deney tüpüne sağılmıştır. Tüpün yarısı dolu olacak şekilde örnek alınmıştır. Sağım için genital bölge kuru ve temiz bir havlu ve kağıt ruloyla iyice silinip temizlendikten sonra sperma, buzda soğutulmuş 25 ml'lik örnek tüpüne sağılmıştır. Sağım sırasında spermanın temiz olması için muhtemel idrar, dışkı, kan ve doku parçalarının tüpe girmemesine dikkat edilmiştir. Bunun için balığın anal bölgesi, kuru temiz bir kağıt ruloyla silinmiş, genital kanaldan ilk çıkan dışkı az yoğun süt kullanılmamıştır. Plastik örnek tüpüne sağılan spermalar buz üzerinde bekletilmiş ve asgari 4-5 saat içerisinde işleme tabi tutulmuştur.

Kuru buzda sperm muhafaza denemesi için önceden alınıp buz üzerinde bekletilen spermlerden faydalanılmıştır. Spermin yapısını, dondurulduğunda koruyabilmek için 0.6 M sukroz ve % 10 metanol karışımı (Altunok vd., 2004) hazırlanmıştır. Önce 1:3 oranında deneme için 0,5 ml'lik sperm örneği pastör pipet yardımıyla alınıp bunun üzerine 1,5 ml'lik hazırlanan koruyucu karışımdan eklenmiş ve bu örnek, üzerinde ufak delikler açılan kuru buz üzerinde 4-5 dk. süreyle bekletilmiştir. Daha sonra kuru buzda donan sperm örnekleri, saf su ile çözülüp mikroskop altında incelenmiştir. Aynı deneme 1:4 oranında örneklerle de yapılmıştır. Bunun yanında NaCl ile % 7 fizyolojik su hazırlanmıştır. Bu fizyolojik suyla sperm örneği dondurulmadan birleştirilip mikroskop altında incelenmiştir. Sonra bu örneğin üzerine mikroskop altında bir damla saf su ilave edilip spermilerin hareketliliği gözlemlenmiştir.

## 5. BULGULAR

Manisa’da yapılan ilk çalışmada sağılan her balığın ağırlık, boy, en değerleri ve sağım sırasında damlayan sperm damla sayısı, sperm konsantrasyonu vb. değerlerin hesaplanabilmesi için kaydedilen veriler düzenli bir şekilde çizelge 5.1’de görülebilmektedir. Çizelge 5.1’de sağım sonucunda erkek alabalıkların kaydedilen damlayan sperm damla sayısının ortalaması  $8,35 \pm 5,34$ , ağırlıkların ortalaması  $921,5 \pm 244,86$ , boyların ortalaması  $41,79 \pm 2,98$ , enlerin ortalaması  $10,19 \pm 1,31$  ve tüp içindeki sperm hacim değerlerinin ortalaması  $9,56 \pm 5,30$  olarak bulunmuştur.

Örnek No	Damlayan Sperm Damla Sayısı	Ağırlık (gr)	Boy (cm)	En (cm)	Hacim (ml)
1	1	1318	41,3	13,5	15
2		590	37,6	9,2	15
3		590	37,6	9,2	2,4
4	3	731	39,9	10,1	11
5	6	740	41,6	11	15
6		740	41,6	11	0,3
7	11	1151	45,9	11,1	8,4
8		1151	45,9	11,1	4,3
9	11	611	38,1	9,1	15
10	20	883	41	11,3	15
11		883	41	11,3	7,3
12	17	765	39	8,3	10
13	6	1167	46	8,2	2
14	8	991	42,3	8,5	6
15	9	1081	43,8	10,3	15
16		1081	43,8	10,3	3
17	3	647	38	8,7	5,5
18	5	806	40,3	10,3	15
19	6	1190	44,6	11,1	13,7
20	11	1314	46,6	10,3	12,3
<b>Ortalama</b>	8,35	921,5	41,79	10,19	9,56
<b>Standart sapma</b>	5,34	244,86	2,98	1,31	5,30

Çizelge 5.1. Sağım sonucunda erkek alabalıkların kaydedilen ağırlık, boy, en ve tüp içindeki sperm hacim değerleri.

Erkek alabalıklardan alınan spermilerin sayılmasıyla elde edilen bulgulara ilişkin veriler çizelge 5.2’de düzenli bir şekilde görülebilmektedir. Çizelge 5.2’de görülen erkek alabalıklardan alınan sperm örneklerinin Thoma lamında sayım sonuçlarının tümünün ortalama ve standart sapmaları da hesaplanarak verilere eklenmiştir.

<b>Tüp No</b>	<b>Örnek 1</b>	<b>Örnek 2</b>	<b>Örnek 3</b>	<b>Ortalama</b>	<b>Standart Sapma</b>
1	150	82	155	129	40,77
2	129	89	129	116	23,09
3	31	27	21	26	5,03
4	127	150	162	146	17,78
5	276	108	87	157	103,59
6	20	11	8	13	6,24
7	534	527	477	513	31,08
8	64	12	66	47	30,61
9	41	28	95	55	35,52
10	68	78	100	82	16,37
11	141	168	90	133	39,61
12	76	42	87	68	23,45
13	48	42	46	45	3,05
14	32	62	20	38	21,63
15	101	87	114	101	13,50
16	33	36	112	60	44,76
17	110	75	110	98	20,20
18	59	102	71	77	22,18
19	125	95	156	125	30,50
20	80	128	38	82	45,03

Çizelge 5.2. Erkek alabalıklardan alınan sperm örneklerinin Thoma lamında sayım sonuçları.



Çizelge 5.3’de görülen sperm sayılarının ortalaması  $1\ 107\ 229\ 256 \pm 1\ 061\ 323\ 011$  olarak bulunmuştur. Uygulamada kullanılan balıkların 1 ml’deki sperm sayıları hesaplanarak çizelge 5.3’de verilmiştir.

<b>Tüp No</b>	<b>1 ml’deki Sperm Sayısı</b>
1	645 000 000
2	578 333 333
3	822 916 667
4	997 727 273
5	785 000 000
6	3 250 000 000
7	4 577 380 952
8	825 581 395
9	273 333 333
10	410 000 000
11	1 366 438 356
12	512 500 000
13	1 700 000 000
14	475 000 000
15	503 333 333
16	1 508 333 333
17	1 340 909 091
18	386 666 667
19	686 131 387
20	500 000 000
<b>Ortalama</b>	<b>1 107 229 256</b>
<b>Standart Sapma</b>	<b>1 061 323 011</b>

Çizelge 5.3. Uygulamada kullanılan erkek alabalıkların 1 ml’deki sperm sayıları.

Tire’de yapılan ikinci çalışmada sağılan her balığın ağırlık, boy, en değerleri ve sağım sırasında damlayan sperm damla sayısı kaydedilmiştir. Bu değerler düzenli bir şekilde çizelge 5.4’de görülebilmektedir.

Çizelge 5.4’de sağım sonucunda erkek alabalıkların kaydedilen damlayan sperm damla sayısının ortalaması  $5,55 \pm 3,39$ , ağırlıkların

ortalaması  $334,4 \pm 246,02$ , boyların ortalaması  $28,16 \pm 4,50$ , enlerin ortalaması  $7,4 \pm 1,78$  olarak bulunmuştur.

<b>Örnek No</b>	<b>Damlayan Sperm Damla Sayısı</b>	<b>Ağırlık (gr)</b>	<b>Boy (cm)</b>	<b>En (cm)</b>
1	2	237	26,4	6,5
2	1	350	28,5	7,5
3	9	1009	40,5	11,5
4		224	25,5	5,5
5	5	328	28,3	7,5
6	11	369	28,6	9,2
7	9	228	25,6	7,3
8	5	188	26	5,6
9	4	189	25,6	6,6
10	4	222	26,6	6,8
<b>Ortalama</b>	5,55	334,4	28,16	7,4
<b>Standart Sapma</b>	3,39	246,02	4,50	1,78

Çizelge 5.4. Sağım sonucunda erkek alabalıkların kaydedilen ağırlık, boy, en değerleri.

## 6. SONUÇ VE TARTIŞMA

Kendi çalışmalarımızda ilk önce planlanan hazırlıklar şu şekildeydi: Balıklardan alınan sperm, hacimlerinin ve konsantrasyonlarının belirlenmesinde kullanılan ölçekli tüplere konduktan sonra 5 ayrı deneme grubuna aktarılacak ve deneme gruplarının ilkinde sperm direkt olarak 0°C sıcaklığa konulacak, diğer üç grupta ise sırası ile 10 dakikada bir sıcaklık; 6 °C, 4 °C, 2 °C düşürülerek 0 °C'de sabit tutulacaktı. Son deneme grubunda ise sıcaklık 10 dakikada 0 °C'ye düşürülecek ve her deneme üç tekrar olarak yapılacaktı.

Sıcaklıkları 0 °C'ye düşürülen gruplarda 6 saatte bir otomatik pipetlerle sperm örnekleri alınarak bunlar, faz-kontrast mikroskop kullanılarak incelenecek, incelemeler yaşama oranı, motilite ve genel morfolojik yapı üzerinden yapılacak ve değerlendirmeye alınacaktı. Bu incelemeler sırasında sperm ortam suyu ile aktif hale getirilip dijital kameraya kayıt edilecek, daha sonra dijital kamerayla kaydedilen görüntüler bilgisayar ortamına aktarılıp incelenen sperm motilite, yaşama oranı ve süresine bakılacaktı.

Veriler toplandıktan sonra motilite ve yaşama oranları Chi Kare testi ile sinanacak ve sperm alınan balıkların boy ve ağırlıklarının değerlendirilmesi Levene ve Komogorov-Simironov testlerini takiben parametriklik varsayımlarına göre ANOVA veya Krusgal-Wallis testleri kullanılarak analiz edilecekti. Fakat denemelerde, balıklardan temin ettiğimiz sperm beklediğimiz şekilde hareketli olmayınca bu test analizlerine gerek görülmemiş, planlanan hazırlıklar ve çalışmanın yönü bu hareketsizliğin sebeplerinin araştırılması yönünde gelişmiştir. Bu bağlamda planlanan hazırlıklardan bazıları uygulanmak kaydıyla muhafaza çalışmalarına devam edilmiş ve kısa süre de olsa Fethiye'de başarı sağlanmıştır. Yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar şu şekildedir:

Alabalıklarda spermilerin muhafazası ile ilgili yaptığımız Manisa ilindeki ilk çalışmada hareketli olması beklenen spermelerde canlılık gözlenmemiştir. Böyle bir durumda spermilerin hareketsiz olma durumuna açıklık getirebilmek için sperm hacmi hesaplama ve sperm sayımı işlemi gerçekleştirilmiştir.

Alabalıklarda spermilerin muhafazası ile ilgili yaptığımız Tire'deki ikinci çalışmada hareketli olması beklenen spermelerde ilk uygulamadaki gibi yine canlılık gözlenmemiştir.

Spermilerin muhafazası ile ilgili yaptığımız Tire'deki üçüncü çalışmada da hareketli olması beklenen spermelerde ilk iki uygulamadaki gibi yine canlılık gözlenmemiştir.

Spermilerin muhafazası ile ilgili yaptığımız Fethiye'deki dördüncü ve son çalışmada, spermilerin 5 saat sonra bile 0 °C'deki buz üstünde canlı kalabildikleri gözlemlenmiştir. Bu arada spermilerin motilite seviyesinin yaklaşık olarak % 80 seviyesinde olduğu gözlemlenmiştir. Kuru buzla yapılan ilk denemede, önce 1:3 oranında deneme için 0,5 ml'lik sperm örneği pastör pipet yardımıyla alınıp bunun üzerine 1,5 ml'lik hazırlanan koruyucu karışımdan eklenmiş ve bu örnek, üzerinde ufak delikler açılan kuru buz üzerinde 4-5 dk. süreyle bekletilmiştir. Daha sonra kuru buzda donan sperm örnekleri, saf su ile çözülüp mikroskop altında incelenmiştir. İnceleme sonucunda spermilerin yaşamadığı görülmüştür. Aynı deneme 1:4 oranında örneklerle de yapılmış fakat sonucun aynı olduğu gözlemlenmiştir.

Bunun yanında NaCl ile %7 fizyolojik su hazırlanması deneyinde bu fizyolojik suyla sperm örneği dondurulmadan birleştirilip mikroskop altında incelendiğinde yine spermilerin hareket etmediği görülmüştür. Fakat bu örneğin üzerine mikroskop altında bir damla saf su ilave edildiğinde spermilerin hareketlendiği gözlemlenmiştir.

Tüm bu araştırmalardan elde edilen sonuçlara baktığımızda spermlerdeki hareketsizliğin en önemli sebebi olarak genetik faktörleri gösterebiliriz. Özellikle ilk uygulama sonucunda elde edilen düzensiz sperm sayıları bunun kanıtı olarak gösterilebilir. Çünkü örneklerden verimli sperm ve iyi sperm sayıları elde edilseydi hesaplanan sayım değerleri orantılı ve birbirine yakın değerler olmalıydı. Bunda işletmelerin, dışarıdan aldıkları yumurtaların, erkeklerin genetik olarak saf erkek bireyler olup olmadığını bilmemesi büyük rol oynamaktadır. Yani işletmelere ya da tesislere gelen erkekler sonradan erkekleştirilmiş bireyler olabilir. Özellikle Tire ve Manisa'daki balıkların bazılarının gonadları incelendiğinde gonadların reabsorbe olduğu açıkça görülmüştür. Bunun yanında üreme döneminin ortasının yakalanamaması da denemelerden beklenen sonuçların alınamamasının sebeplerinden biri olabilir. Bu sonucu da son uygulamadan çıkartabiliriz. Çünkü son uygulamada spermilerin hareketli olmasının sebebi olarak işletmenin fotoperiyot uygulaması ile her mevsim döl alabilmesi gösterilebilir. Alabalıkların beslenme kalitesi, sperm ve üreme veriminde çok etkilidir. İlk üç uygulamadaki örneklerin iyi ve etkili bir şekilde beslenememiş olma olasılığı da bu spermilerin canlı kalamadığı tezini desteklemektedir. Bunlar yanında bazı araştırmacılar gerçekleştirdikleri denemelerde sperm tüpleri içine oksijen takviyesi yapmışlardır ancak bu araştırmada bu takviye yapılmadan gerçekleştirilen muhafaza sebebiyle de spermier, canlılığını koruyamamış olabilir. Ama bu ihtimal biraz zayıftır. Çünkü bazı deniz balığı türlerinde denenen aynı tarz çalışmada tüplerin ağzı kapalı olarak oksijen takviyesiz buzda bekletilmesine rağmen bunların içersindeki spermierde canlılık gözlenebilmiştir. Tüm bu sonuçları birkaç başlık altında özetlemek gerekirse:

Spermilerin muhafaza sonrasında hareketli olmamasının olası sebepleri başlığı altında:

- Genetik problemler
- Üreme zamanı problemleri
- Besleme problemleri
- Deneysel ya da çevresel şartlardan kaynaklanan problemler gibi

başlıklar sebepler arasında gösterilebilir.

Bizim yaptığımız araştırmalarda elde ettiğimiz bulgu ve sonuçlara göre bu sorunlar içinde en önemlisi yukarıda açıkladığımız gibi genetik problemlerdir. İşletmelere gelen yavru ve yumurtaların içinde tahminlerimiz doğrultusunda gerçek anlamda saf erkek bulunmamasından dolayı spermilerin kısa süreli muhafazası için kullandığımız sperm örneklerinde hareketlilik gözlenmemiştir. Bunu önlemek için işletmeler kendi damızlık ünitelerini kurup kendi alabalık yumurtalarını kendileri almalıdır. Bu şekilde, işletmeler ürettikleri alabalıkların cinsiyet kontrolünü kolaylıkla sağlayabilir. Bunun yanında sperm muhafaza ile ilgili Türkiye'deki alabalık işletmelerindeki balıkların gen haritası çıkarılıp saf erkek temini ile ilgili sorunun ne boyutlarda olduğu da ortaya çıkarılabilir. Böylece buna göre tedbirler alınarak yurt dışından gelen sonradan erkekleştirilmiş ya da kısır olan bireylere karşı önlem alınması ve bu konuda çalışmalar yapılması kolaylaşacaktır.

Kendi araştırmalarımız dışında şimdi de bu konuda yapılan araştırmaları inceleyip sperm muhafaza tekniklerinin faydaları ile ilgili bilgileri inceleyelim.

Sarvi vd., (2006)'den elde edilen bilgilere göre yapılan denemeler sonucunda en iyi kuru buz çözme yönteminin 25 °C'deki suya 30 saniye boyunca su banyosu uygulaması olduğu kanaatine varıldığı görülmüştür.

Salte vd., (2004)'den elde edilen bilgilere göre ise en iyi dondurma ivmesi sıcaklığın + 4 °C'den -110 °C'ye düşerken 30 °C dak<sup>-1</sup> şeklinde yapılan uygulama ile elde edildiği belirtilmiştir..

Stoss ve Holtz'un (1983) yaptıkları bir çalışmada ise % 10-20 oranında DMSO'nun ve 6.7 mmol oranında KCl'nin sperm koruyucu olarak olumlu etkileri çalışma sonunda gözlenmiştir.

Günümüze kadar balık spermalarının muhafaza edilmesi konusunda değişik balık türleri üzerinde birçok araştırma yapılmıştır. Bu araştırma sonuçlarından balık spermalarının muhafazası konusunda önemli başarılar kaydedildiği anlaşılmaktadır. Canyurt vd., (2003), Brofeldt'e (1914) atfen onun tarafından alabalık spermasının serin ortamda tutulduğunda daha uzun süre canlılığını koruduğunu keşfettiğini bildirmiştir. (Büyükhatipoğlu ve Holtz, 1978). Bu keşiften sonra, sperm biyolojisinin ve seminal plazma içeriğinin de öğrenilmesiyle spermanın muhafazası için yapay seminal plazmalar geliştirilmiştir. Bu seyrelticiler NaCl, üre ilave edilmiş NaCl solüsyonu ve seminal plazma kompozisyonunu taklit eden solüsyonlardır (Scott ve Baynes, 1980; Stoss, 1983; Van Heerden ve diğ., 1993; Ohta ve Izawa, 1996; Ohta ve diğ., 2000). Bu solüsyonların en önemli özelliği, spermleri stimüle etmemeleri ve onların enerjisini koruyarak daha uzun yaşamalarını sağlamalarıdır. Spermler testiste hareketsiz olarak bekler. Testislerden çıktıktan sonra ozmotik basınç farkından dolayı harekete geçerler (Stoss, 1983; Canyurt vd.'den, 2003).

Balık spermasının kısa süreli saklanması konusunda çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Bu araştırmalarda, seçilmiş erkek damızlıklardan sperma alınarak açılır-kapanır nemli kaplar içerisinde, üzerine saf oksijen veya hava ilave edilerek 0-9 °C'de sperma muhafaza edilmiştir. Balık (1978) yaptığı çalışmada, gökkuşuğu alabalığı spermasının 1 °C'de 10 gün, 6 °C'de 13 gün ve 10 °C'de 10 gün yaşayabildiğini bildirmiştir. Büyükhatipoğlu ve Holtz (1978) gökkuşuğu alabalığı spermasını özel olarak hazırlanan izotonik plazma ile 1:1, 1:16 oranlarında sulandırarak 4 °C'de 15 gün muhafaza etmiştir. Araştırma sonuçları 4 °C'de tutulan semenin 15 gün sonunda % 80.6 dölleme

yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir. Yine aynı araştırmada hava, oksijen ve azotun saklama süresine etkisi de incelenmiş ve en iyi sonucun oksijenle alındığı bildirilmiştir. Stoss ve Refstie (1983), Atlantik som balığı (*Salmo salar*)'ndan aldıkları spermayı 0 °C'de 28 gün tutarak muhafaza etmeyi denemişlerdir. Bu araştırma sonuçları som balığı spermasının 10 gün süre ile kalitesini kaybetmeden muhafaza edilebileceğini göstermektedir. Diğer bir çalışmada ise sudak (*Stizostedion vitreum vitreum*) sperması antibiyotik ilaveli sulandırıcılarla 14 gün süreyle buzdolabında muhafaza edilmiş ve 14. günde dölleme oranı % 95.2 olarak bildirilmiştir (Moore, 1987; Canyurt vd.'den, 2003).

Canyurt (2005), Ashwood ve Smith'e (1980) atfen dondurma ve soğutma teknikleri kullanılarak spermlerin teorik olarak 200 ile 32000 yıl muhafaza edilebileceğini söylemiştir. Canyurt 2005 yılında EBİLTEM proje pazarındaki sunumunda şöyle demiştir: "Alabalıklarla yapılan araştırmalarda alabalık sperması 1-2 yıl muhafaza edilmiş ve kullanılmıştır.

Bu tekniklerin kullanılması şu yararları sağlayacaktır:

- Alabalık anaçlarında her iki cinsiyete ait bireylerde üreme dönemlerinde sıklıkla görülen gamet gelişimindeki senkronizasyon bozukluklarının olumsuz etkisi ortadan kaldırılır: Örneğin erkek bireylerde sperm dişi bireylerdeki yumurta gelişiminden daha önce olabilmektedir.
- Erkek bireylerin ürettiği spermanın tamamının kullanılmasına olanak sağlayacaktır.
- Mevsim dışı yumurtlatma tekniğinde anaç sayısını azaltır: Bu teknik sayesinde mevsim dışı yumurtlatma yöntemlerinde anaç kullanımı, dişi anaçlarla sınırlandırılmaktadır.



- Gamet transferine olanak sağlar: Üstün verime sahip hatlara ait spermelerin başka işletmelere nakledilmesini ve aynı zamanda yabancı formlara ait gametlerin kültür ortamına taşınmasını sağlayacaktır.
- Erkek damızlıklarda gelişen spermanın yaşlanmasını önler ve kalitesini korur: Damızlık alabalıklarda testislerdeki sperma ilerleyen zaman içerisinde kullanılmazsa yaşlanır ve kalitesi düşer.
- Deneysel çalışmalarda süreklilik sağlar: Genetik ve ıslah çalışmalarında yıl boyu spermaya ihtiyaç duyulmaktadır.
- Evcilleştirilmiş populasyonlarda genetik çeşitliliği korumak için faydalanılır.
- Heterozigotiyi arttırmak için verimi yüksek anaçların sperması kullanılmaktadır.”

Canyurt'un 2005 yılında EBİLTEM proje pazarındaki sunumunda belirttiğine göre sperm muhafazanın faydasını bir örnekle açıklamak gerekirse: 2015-2020 yıllarında Türkiye nüfusu yaklaşık: 100.000.000 (yüz milyon) olacaktır. Önümüzdeki 10-20 yılda fert başına balık tüketimi 25 kg olarak kabul edersek,

Toplam balık ihtiyacı  $100.000.000 \times 25 = 2.500.000$  ton'dur.

Bu durumda 1.500.000 ton balık yetiştirmek gerekmektedir.

Bir balığı 250 gr olarak düşünürsek:

$1.500.000.000 \times 4 = 6.000.000.000$  adet yavru balığa ihtiyaç vardır.

Üretim sürecindeki (% 40) kayıpları da hesaba katarsak 10.000.000.000 adet yumurtaya ve bunların döllenmesine ihtiyaç duyulacaktır. Peki 10.000.000.000 yumurta için gereken anaç miktarı nedir sorusuna cevap vermek gerekirse:

1 kg dişi 1500 yumurta verirse,

10.000.000.000 yumurta için:

$10.000.000.000/1500 = 6.600.000$  kg dişi anaca ihtiyaç vardır

2 dişi için 1 erkek damızlık kullanıldığı için  $3.300.000$  kg erkek damızlık gerekmektedir.

$3.300.000$  kg erkek damızlık için kg balık için  $3$  kg yem tüketilirse yaklaşık  $10.000.000$  kg yeme ihtiyaç vardır yemin kg fiyatı  $1.500.000$  TL olduğunu düşünürsek sadece yem harcamaları  $15.000.000.000.000$  TL tutmaktadır. Buna aynı miktarda işçilik eklenirse:

$15.000.000.000.000 + 15.000.000.000.000 = \underline{30.000.000.000.000 \text{ TL}} = \underline{30.000.000 \text{ YTL}}$

Spermanın dondurularak saklanması ve bu tekniğin kullanılması durumunda bu harcamaları % 80 azaltmak mümkündür.

KÂR:  $30.000.000.000 \times 80/100 = 24$  trilyon

Buradan çıkan sonuç şu şekilde özetlenebilir: Projenin temel amacı ülke ekonomisine katkı sağlamak olduğuna göre spermanın öncelikle kısa süreli daha sonra dondurularak uzun süreli saklanması sonucunda hem üreticiler hem de ülke ekonomisi bundan büyük faydalar elde edecektir. Şu anda bile görüşülen işletmeler sperm muhafaza ile ilgili taleplerini bize açıkça iletmişlerdir. Bu sebeple bu konudaki çalışmalara önem verilip bir an önce sektörün talebi doğrultusunda bu çalışmalar geliştirilmeli ve hızlandırılmalıdır.

**KAYNAKLAR DİZİNİ**

**Akhan, S., Canyurt, M. A., 2005.** Üç Farklı Kuluçkahanedeki Damızlık Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) Stokları Arasında Genetik Çeşitliliğin RAPD-PCR Yöntemiyle Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences, Cilt/Volume 22, Sayı/Issue (1-2): 25-30.

**Alaçam, E., Apaydın, A. M., Aslan, S., Çoyan, K., Demirci, E., Deveci, H., Dinç, D. A., Gökçen, H., İleri, K., İzgür, İ. H., Küplülü, Ş., Salmanoğlu, R., Şenünver, A., Tekeli, T., Tekin, N., Ünal, E. F., Vural, M. R., Yurdaydın, N., 1994.** Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Suni Tohumlama, Doğum ve İnfertilite, 390 s.

**Aleandri, R., Galli, A., 1999.** Patent pending, n.MI99A002200; PCT/EP00/10182 in Salte vd., 2004.

**Altunok, M., Blecke, A. M., Schwark, G. H., 2004.** Cryopreservation of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Sperm. Aquaculture and Aquaculture Ecology. Institute of Animal Husbandry and Genetics, University of Göttingen.

**Balık, S., 1978.** A study on preservation of sperm of Rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) (in Turkish). E.Ü. Fen Fakültesi Dergisi, Seri B, C. II, S.2: 131-142 in Canyurt vd., 2003.

**KAYNAKLAR (devam)**

- Bart, A. N., Wolfe, D. F., Dunham, R. A.,** 1998. Cryopreservation of blue catfish spermatozoa and subsequent fertilization of Channel catfish eggs. *Trans. Am. Fish. Soc.* 127 (5) 819-824 in Cabrita vd., 2001.
- Baynes, S. M. and Scott, A. P.,** 1987. Cryopreservation of rainbow trout spermatozoa: the influence of sperm quality, egg quality and extender composition on post-thaw fertility. *Aquaculture*, 66: 53-67 in Holtz, 1993.
- Bencic, C. B., M., Krisfalusi, J. G., Cloud and R. L., Ingermann,** 2000. Short-term storage of salmonid sperm in air versus oxygen. *North American Journal of Aquaculture*, 62: 19-25 in Canyurt vd., 2003.
- Blaxter, J. H. S.,** 1953. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature (London)*, 172: 1189-1190 in Holtz, 1993.
- Brown, G. G., Mims, S. D.,** 1999. Cryopreservation of paddlefish *Polyodon spathula* milt. *J. World Aquacult. Soc.* 30, 245-249 in Cabrita vd., 2001.
- Brown Jr., D. W., Senger, P. L., Becker, W. C.,** 1991. Effect of group thawing on post-thaw viability of bovine spermatozoa packaged in 5 ml French straws. *J. Anim. Sci.* 69 (6), 2303-2309 in Cabrita vd., 2001.
- Büyükhatipoğlu, S. and Holtz, W.,** 1978. Preservation of trout sperm in liquid or frozen state. *Aquaculture*, 14: 49-56 in Holtz, 1993.

**KAYNAKLAR (devam)**

- Büyükhatipoğlu, Ş. and W., Holtz, 1978.** Preservation of trout sperm in liquid or frozen state. Aquaculture, 14: 45-49 in Canyurt vd., 2003.
- Cabrita, E., Martínez, F., Real, M., Alvarez, R., Herraéz, M. P., 1999.** Effect of different external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreservation of rainbow trout sperm. 36th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, 12-15 July, Marseille, p. 43 in Cabrita vd., 2001.
- Cabrita, E., Robles V., Alvarez, R., Herraéz, M. P., 2001.** Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization. Aquaculture, 201:302.
- Cabrita, E., Robles, V., Alvarez, R., Herraéz, M. P., 2001.** Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization. Aquaculture, 201: 301, 303-304.
- Cabrita, E., Robles, V., Alvarez, R., Herraez, M. P., 2001.** Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization. Aquaculture 201, 301-314 in Sarvi vd., 2006.
- Canyurt, M. A., 1985.** Trout production (in Turkish). E.Ü. Ziraat Fakültesi Haber Bülteni. 43: 4-6 in Canyurt ve Akhan, 2005.

**KAYNAKLAR (devam)**

- Canyurt, M. A., Akhan, S., Takma, Ç., 2003.** Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) Spermalarının Kısa Süre Saklanması Üzerine Bir Araştırma. E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences, Cilt/Volume 20, Sayı/Issue (3-4): 537 – 542.
- Cloud, J. G., W. H., Miller and M. J., Levanduski, 1990.** Cryopreservation of sperm as a means to store Salmonid germ plasm and to transfer genes from wild fish to hatchery populations. The progressive Fish-Culturist, 52: 51-53 in Canyurt vd., 2003.
- Conget, P., Fernandez, M., Herrera, G., Minguell, J. J., 1996.** Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa using programmable freezing. Aquaculture 144, 319-329 in Cabrita vd., 2001.
- Erdahl, A. W., Erdahl, D. A., Graham, E. F., 1984.** Some factors affecting the preservation of salmonid spermatozoa. Aquaculture, 43: 341.
- Erdahl, D. A., Graham, E. F., 1980.** Cryopreservation of spermatozoa of the brown, brook and rainbow trout. Cryo-lett. 1, 203-208 in Robles vd., 2003.
- Erdahl, D. A., Graham, E. F., 1980.** Preservation of spermatozoa of brook trout and rainbow trout. Cryo-Lett. 1, 203-208 in Cabrita vd., 2001.
- Erkoçak, A., 1980.** Özel Histoloji, Dolaşım/Lenfatik/İç Salgı/Üriner Genital ve Sinir Sistemleri. Ankara Üniversitesi Yayınları, 389, 270 s.

**KAYNAKLAR (devam)**

- Fauvel, C, Suquet, M., Dreanno, C, Zonno, V., Menu, B.,** 1998. Cryopreservation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa in experimental and production simulating conditions. *Aquat. Living Resour.* 11 (6), 387-394 in Cabrita vd., 2001.
- Gall, G. A. E.,** 1991. Genetics and reproduction in fish culture. *J. Anim. ScL*, 69: 4216-4220 in Holtz, 1993.
- Gall, G. A. E., P. A., Crandell,** 1990. The rainbow trout. *Aquaculture.* 100: 1-10 in Akhan ve Canyonurt, 2005.
- Gupta, S. D. and S. C., Rath,** 1991. A preliminary study on quantitative assessment of milt of *Labeo rohita* (Ham.). *Proc. Nat. Symp. Freshwat. Aqua.*, 43-45 in Canyonurt vd., 2003.
- Gupta, S. D. and S. C., Rath,** 1993. Cryogenic preservation of carp milt and its utilization in seed production. *The Third Indian Fisheries Forum Proceedings*, 11-14 October, Pantnagar, pp.77-79 in Canyonurt vd., 2003.
- Holtz, W.,** 1993. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm: practical recommendations. *Aquaculture*, 110:97-100.
- Holtz, W., Schmidt-Baulain, R. and Meiners-Gefken, M.,** 1991. A simple saccharide extender for cryopreservation of rainbow trout (*Oncorkynchus mykiss*) sperm. *Proc. 4th Int. Symp.Reprod. Physiol. Fish*, 7-12July 1991, Norwich,UK,pp. 250-252 in Holtz, 1993.

**KAYNAKLAR (devam)**

- Hörstgen-Schwark, G.**, 1991. Biotechnology and genetic improvement of fish. Proc. 2nd Int. Symp. Application of New Technology in Animal Industry, Seoul, Korea, pp. 45-58 in Holtz, 1993.
- Kayalı, H., Şatıroğlu, G., Taşyürekli, M.**, 1992. İnsan Embriyolojisi. Tıp Dizisi 2, 29, İstanbul, 312 s.
- Labbe, C., Maisse, G.**, 2001. Characteristics and freezing tolerance of brown trout spermatozoa according to rearing water salinity. Aquaculture, 201: 290.
- Lahnsteiner, F.**, 2000. Semen cryopreservation in the Salmonidae and in the northern pike Aquacult. Res. 31, 245-258 in Lahnsteiner vd., 2002.
- Lahnsteiner, F., Mansour, N., Weismann T.**, 2002. A new technique for insemination of large egg batches with cryopreserved semen in the rainbow trout. Aquaculture, 209: 362.
- Lahnsteiner, F., Patzner, R. A., Weismann, T.**, 1996. Semen cryopreservation of salmonid fishes: influence of handling parameters on the postthaw fertilization rate. Aquaculture Research, 27: 661-662.
- Lahnsteiner F., Weismann T. & Patzner R. A.** (1994) Neue Gesichtspunkte zur Gefrierkonservierung von Salmonidensamen. *Österreichs Fischerei* 4, 84-89 in Lahnsteiner vd., 1996.



**KAYNAKLAR (devam)**

**Lahnsteiner F., Weismann T. & Patzner R. A.** (1995) A uniform method for cryopreservation of salmonid fishes. *Aquaculture Research* 26, 801-807 in Lahnsteiner vd., 1996.

**Lahnsteiner F., Weismann T. & Patzner R. A.** (1995) A uniform method for cryopreservation of semen of salmonid fish (*Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta f. fario*, *Salmo trutta f. lacustris*, *Coregonus* sp.). *Aquaculture Research* 26, 801-807 in Lahnsteiner vd., 1997.

**Lahnsteiner, F., Weismann, T., Patzner, R. A.**, 1995. A uniform method for cryopreservation of semen of salmonid fish (*Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta fario*, *Salmo trutta lacustris* *Coregonus* sp.). *Aquacult. Res.* 26, 801-807 in Cabrita vd., 2001.

**Lahnsteiner, F., Weismann, T., Patzner, R. A.**, 1995. A uniform method for cryopreservation of semen of the salmonid fishes *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), *Salmo trutta fario* L., *Salmo trutta f. lacustris* L. *Coregonus* sp. *Aquaculture Research* 26, 801-807 in Sarvi vd., 2006.

**Lahnsteiner, F., Weismann, T., Patzner, R. A.**, 1996. Cryopreservation of semen of the grayling (*Thymallus thymallus*) and the Danube salmon (*Hucho hucho*). *Aquaculture* 144, 265-274 in Cabrita vd., 2001.

**KAYNAKLAR (devam)**

- Lahnsteiner F., Weismann T. & Patzner R. A.** (1996b) Semen cryopreservation of salmonid fish. Influence of handling parameters on the postthaw fertilization rate. *Aquaculture Research* 27, 659-671 in Lahnsteiner vd., 1997.
- Lahnsteiner, F., Weismann, T., Patzner, R. A.,** 1997. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1.2 ml and 5 ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. *Aquaculture Research*, 28: 471-472.
- Lahnsteiner, F., Weismann, T., Patzner, R. A.,** 1997. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1.2 ml and 5 ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. *Aquacult. Res.* 28, 471-479 in Cabrita vd., 2001.
- Legendre, M. and Billard, R.,** 1980. Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep-freezing. *Reprod. Nutr. Dev.*, 20: 1859-1868 in Holtz, 1993.
- Meiners-Gefken, M., Schmidt, R. and Holtz, W.,** 1987. Response of female rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to 6 month light cycles with continuous or interrupted day light periods. *Proc. 3rd Int. Symp. Reprod. Physiol. Fish*, 2-7 August 1987, St. John's, Newfoundland, Canada, p. 309 in Holtz, 1993.

**KAYNAKLAR (devam)**

- Moczarski, M.**, 1976. Deep freezing of carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm. Bulletin De L'Academia Polonaise des Sciences, 15 (3): 187-190 in Canyon vd., 2003.
- Moczarski, M. and M., Koldras**, 1976. Properties of tench (*Tinca tinca* L.) sperm and experiments with freezing it at -196°C. Acta Ichthyologica et Piscatoria, 11 (2): 40-49 in Canyon vd., 2003.
- Moore, A. A.**, 1987. Short-term storage and cryopreservation of walleye semen. The Progressive Fish Culturist, 49: 40-43 in Canyon vd., 2003.
- Mounib, M. S.**, 1978. Cryogenic preservation of fish and mammalian spermatozoa. J. Reprod. Fertil., 53:13-18 in Holtz, 1993.
- Mounib, M. S.**, 1978. Cryogenic preservation of fish and mammalian spermatozoa. J. Reprod. Fertil., 53:13-18 in Labbe-Maisse, 2001.
- Nagase, H. and Niwa, T.**, 1964. Deep freezing bull semen in concentrated pellet form. 1. Factors affecting survival of spermatozoa. 4th Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. Vol. 3: 410-415 in Holtz, 1993.
- Ohta, H. and T., Izawa**, 1996. Diluent for cool storage of Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. Aquaculture, 142: 107-118 in Canyon vd., 2003.

**KAYNAKLAR (devam)**

- Ohta, H., T., Unuma and H., Nagoya**, 2000. Diluents for cool storage of milt and for artificial fertilization in the Amago salmon *Oncorhynchus masou ishikawae*. Nippon Suisan Gakkaishi, 66 (1): 88-89 in Canyon vd., 2003.
- Ott, A. G. and Horton, H. F.**, 1971. Fertilization of steelhead trout (*Salmo gairdneri*) eggs with cryopreserved sperm. J. Fish. Res. Board Can., 28: 1915-1918 in Holtz, 1993.
- Rana, K.**, 1995. Preservation gametes. In: N.R. Bromage and R.J. Roberts (Eds.) Broodstock Management and Egg and Larval Quality, pp 53-76. Cambridge University Press, Cambridge.SAS, 1985. SAS User's Guide St. 1985 Eds. SAS Ins. Inc., Carry, N.C. in Canyon vd., 2003.
- Richardson, G. F., Miller, T. L., McNiven, M. A.**, 2000. Cryopreservation of Arctic charr *Salvelinus alpinus* semen in various extenders and in three sizes of straw. Aquacult. Res. 31, 307-315 in Cabrita vd., 2001.
- Richardson, G. F., Wilson, C. E., Crim, L. W., Yao, X. Z.**, 1999. Cryopreservation of yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*) semen in large straws. Aquaculture 174, 89-94 in Cabrita vd., 2001.
- Robles, V., Cabrita, E., Cuñado, S., Herráez, M. P.**, 2003. Sperm cryopreservation of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): parameters that effect its ağabeylity for freezing. Aquaculture, 224: 205.

**KAYNAKLAR (devam)**

- Salte, R., Gali, A., Falaschi, U., Fjalestad, K. T., Aleandri, R.,** 2004. A protocol for the on-site use of frozen milt from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) applied to the production of progeny groups: comparing males from different populations. *Aquaculture*, 231: 339-340.
- Sarvi, K., Niksirat, H., Mojazi, A. B., Mirtorabi, S. M., Rafiee, G. R., Bakhtiyari, M.,** 2006. Cryopreservation of semen from the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*). *Aquaculture*, 256: 564–565.
- Scott, A. P. and S. M., Baynes,** 1980. A review of biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *J. of Fish Biology*, 17: 707-739 in *Canyurt vd.*, 2003.
- Steinberg, H., Hedder, A., Baulain, R., Holtz, W.,** 1995. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen in straws. *Proceeding of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. University of Texas, Austin. 2-8 July, 146 pp in *Cabrita vd.*, 2001.
- Stoss, J.,** 1983. Fish gamet preservation and spermatozoa physiology. In: W.S. Hoar, D.J. Randall and E.M. Donaldson (eds.) *Fish Physiology*, Vol. 9, Part B. Academic Press, New York in *Canyurt vd.*, 2003.

**KAYNAKLAR (devam)**

- Stoss, J. and T., Refstie,** 1983. Short-term storage and cryopreservation of milt from atlantic salmon and sea trout. *Aquaculture*, 30: 229-236 in *Canyurt vd.*, 2003.
- Stoss, J., Holtz, W.,** 1983. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm IV. The effect of DMSO concentration and equilibration time on sperm survival, sucrose and KCl as extender components and the osmolality of the thawing solution. *Aquaculture*, 32: 321.
- Stoss, J. and W., Holtz,** 1983. Successful storage of chilled rainbow trout (*Salmo gairdneri*) spermatozoa for up to 34 days. *Aquaculture*, 31: 229-236 in *Canyurt vd.*, 2003.
- Suquet, M., C., Dreanmo, C., Fauvel, J., Cosson and R., Billard,** 2000. Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research*, 31: 231-243 in *Canyurt vd.*, 2003.
- T.C. Başbakanlık Türkiye İstatistik Kurumu,** 2007. Su Ürünleri İstatistikleri 2005. Yayın No. 3045, Ankara, 75 s., ISSN 1013-6177.
- Tiersch, T. R.,** 1995. Cryopreservation of fish sperm: laboratory, hatchery and field studies of twenty species. *Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish.* University of Texas, Austin. 2-8 July, 147 pp in *Cabrita vd.*, 2001.

**KAYNAKLAR (devam)**

**Torreta, M. E., Wevar, C. A., Forchetti, O. D., Moschetti, E.,** 1996. Effect of freezing at different levels above liquid nitrogen, with or without a thawing diluent, on the post thawing quality of boar semen frozen in large straws. Av. Prod. Anim. 21, 179-184 in Cabrita vd., 2001.

**Üçüncü, İ., Ergen, G., Arıkan, H.,** 2006. Histoloji. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Zooloji Anabilim Dalı, 198, Bornova-İZMİR, 362 s.

**Van Heerden E. J., H. J., Van Vuren and G. J., Steyn,** 1993. Development and evaluation of sperm diluents for the artificial insemination of rainbow trout (*O. mykiss*). Aquatic Living Resources, 6: 57-62 in Canyurt vd., 2003.

**Wheeler, P. A., Thorgaard, G. H.,** 1991. Cryopreservation of rainbow trout semen in large straws. Aquaculture 93, 95-100 in Cabrita vd., 2001.

**Wheeler, P. A., Thorgaard, G. H.,** 1991. Cryopreservation of rainbow trout semen in large straws. Aquaculture 93, 95-100 in Sarvi vd., 2006.

<<http://wilson-leedy.com/CASA/zfish%20sperm.jpg>> (2007, Temmuz 2).

<<http://www.astrographics.com/GalleryPrints/Display/GP2059.jpg>> (2007, Temmuz 2).

<[http://www.biology.ualberta.ca/facilities/microscopy/uploads/gallery/ESEM/11c-fish\\_sperm\\_medium.jpg](http://www.biology.ualberta.ca/facilities/microscopy/uploads/gallery/ESEM/11c-fish_sperm_medium.jpg)> (2007, Temmuz 2).

**KAYNAKLAR (devam)**

<<http://www.mhhe.com/socscience/sex/common/ibank/ibank/0024.jpg>>

(2007, Temmuz 2).

<<http://www.nikonsmallworld.com/gallery.php?grouping=year&year=2002&imagepos=11>> (2007, Temmuz 2).



**EKLER**

- Ek 1. Resim 1, Manisa İlindeki Araştırma Yapılan Alabalık Çiftliğinden Genel Görünümler
- Ek 2. Resim 2, Çalışmalarda Kullanılan Plastik Tüpler
- Ek 3. Resim 3, Alabalıkların Yakalanmasıyla Genital Bölgelerinin Temizlenmesini Takip Eden İşlemlerden Görünümler
- Ek 4. Resim 4, Alabalıkların Genital Bölgelerinin Temizlenmesinden Sonra Balıklara Masaj Yoluyla Uygulanan Sağım Yönteminden Görünümler
- Ek 5. Resim 5, Spermilerin Sağıldıktan Sonra İçine Konulacakları Saklama Kapları İçindeki Buzlar Üzerinde Bekletilen Muhafaza Tüplerinden Genel Görünümler
- Ek 6. Resim 6, Tire'deki Alabalık Tesisinden Genel Görünümler
- Ek 7. Resim 7, Fethiye'deki Çalışmalarda Kullanılan Pastör Pipetler
- Ek 8. Resim 8, Fethiye'deki Çalışmalarda Kullanılan Kuru Buz ve Spermilerin Kuru Buz İçindeki Deliklere Konulduktan Sonraki Tablet (Pelet) Haline Dönüşmüş Şekillerinden Görünümler





Resim 1. Manisa ilindeki araştırma yapılan alabalık çiftliğinden genel görünümler (orijinal).



Resim 2. Çalışmalarda kullanılan plastik tüpler (orijinal).



Resim 3. Alabalıkların yakalanmasıyla genital bölgelerinin temizlenmesini takip eden işlemlerden görüntüler (orijinal).



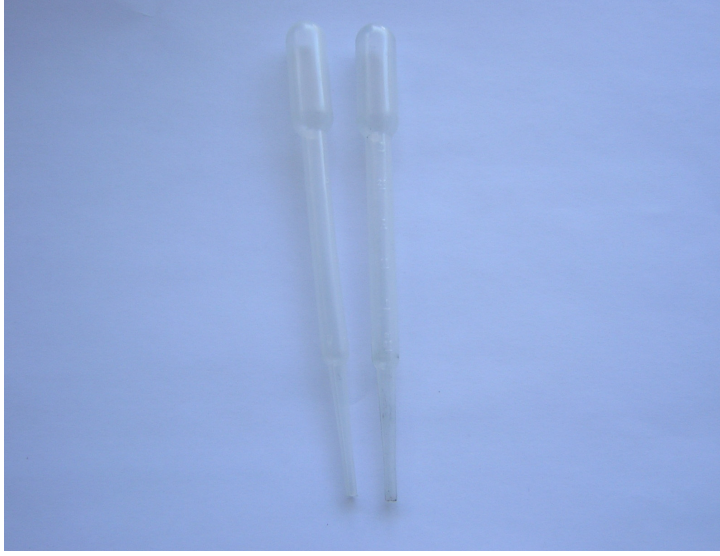
Resim 4. Alabalıkların genital bölgelerinin temizlenmesinden sonra balıklara masaj yoluyla uygulanan sağım yönteminden görünüm (orijinal).



Resim 5. Spermlerin sağıldıktan sonra içine konulacakları saklama kapları içindeki buzlar üzerinde bekletilen muhafaza tüplerinden genel görünümler (orijinal).



Resim 6. Tire'deki alabalık tesisinden genel görünümler (orijinal).



Resim 7. Fethiye’deki çalışmalarda kullanılan Pastör pipetler (orijinal).





Resim 8. Fethiye'deki çalışmalarda kullanılan kuru buz ve spermlerin kuru buz içindeki deliklere konulduktan sonraki tablet (pelet) haline dönüşmüş şekillerinden görünüm (orijinal).

**ÖZGEÇMİŞ**

**Adı, Soyadı** : Ali Özcan BABAOĞLU  
**Uyruğu** : T.C.  
**Doğum yeri ve tarihi** : Manisa - 08.03.1981  
**Medeni Hali** : Bekar  
**Yabancı Dili** : İngilizce (iyi derecede), Almanca (az derecede), Fransızca (az derecede)

**EĞİTİM DURUMU**

**Ortaöğrenim ve Lise** : İzmir Güzelbahçe 60. Yıl Anadolu Lisesi,  
1993-1999  
**Üniversite** : Ege Üni. Su Ürünleri Fak. Yetiştiricilik Böl.,  
2000-2005  
**Yüksek Lisans** : Ege Üni. Fen Bilimleri Enst., Su Ürünleri  
Yetiştiricilik Anabilim Dalı, 2005-2007.

**ÇALIŞMA ALANLARI**

Alabalık Yetiştiriciliği ve Spermlerin Muhafazası