

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA (VET) ANABİLİM DALI

**PULLU SAZAN (*Cyprinus carpio* L. 1758) SPERMASININ
DONDURULMASINDA KULLANILAN FARKLI SULANDIRICI VE
KRİYOPROTEKTANLARIN FERTİLİZASYON ÜZERİNE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Buğra SİVASLIGİL

Danışman

Prof. Dr. Fikret KARACA

Doç. Dr. Yusuf BOZKURT

HATAY – 2012

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA (VET) ANABİLİM DALI

**PULLU SAZAN (*Cyprinus carpio* L. 1758) SPERMASININ
DONDURULMASINDA KULLANILAN FARKLI SULANDIRICI VE
KRİYOPROTEKTANLARIN FERTİLİZASYON ÜZERİNE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Buğra SİVASLIGİL

Danışman

Prof. Dr. Fikret KARACA

Doç. Dr. Yusuf BOZKURT

Bu tez, Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından

1103 Y 0117 nolu proje olarak desteklenmiştir.

HATAY – 2012

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DÖLERME VE SUNİ TOHURLAMA (VET) ANABİLİM DALI

**PULLU SAZAN (*Cyprinus carpio* L. 1758) SPERMASININ
DONDURULMASINDA KULLANILAN FARKLI SULANDIRICI VE
KRİYOPROTEKTANLARIN FERTİLİZASYON ÜZERİNE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Buğra SİVASLIGİL

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 21/09/ 2012günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi: Jüri başkanı: Prof.Dr. Fikret KARACA.....
Üye: Doç. Dr. Yusuf BOZKURT.....
Üye: Doç. Dr. Cengiz YILDIZ.....
Üye: Doç. Dr. Gökhan DOĞRUER.....
Üye: Yrd.Doç.Dr. İlker YAVAŞ.....

Bu tez, Enstitümüz Dölerme ve Suni Tohumlama (Vet) Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

.../.../.....

Prof. Dr. İbrahim KÜRTÜL
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince beni yönlendiren, her zaman için yardımlarını ve desteğini esirgemeyen danışman hocalarım Prof. Dr. Fikret KARACA ve Doç. Dr. Yusuf BOZKURT'a, bilgi ve tecrübelerinden istifade ettiğim Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Cengiz YILDIZ ve Yrd. Doç. Dr. İlker YAVAŞ'a, tez çalışmamın istatistiki hesaplamalarında önemli katkıları ve değerlendirmeleri olan Zootekni Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Akın YAKAN'a, tez çalışmasının yürütülmesi aşamasında yardım ve desteklerini eksik etmeyen Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Fatih ÖĞRETMEN'e, tez çalışmamı yürüttüğüm DSİ VI. Bölge Müdürlüğü ile çalışanlarına ve yüksek lisans eğitimim süresince maddi ve manevi desteğini esirgemeyen aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|------|
| Kabul ve Onay | II |
| Teşekkür | III |
| İÇİNDEKİLER | IV |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | VI |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | VII |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ | VIII |
| ÖZET | X |
| ABSTRACT | XII |
| 1.GİRİŞ | 1 |
| 2.GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Sazan Balığının (<i>Cyprinus carpio</i> L. 1758) Tanımı, Dünyaya Yayılışı ve Sistematikteki Yeri | 3 |
| 2.2. Sazan Balığının Morfolojisi ve Ayırıcı Özellikleri | 4 |
| 2.3. Erkek Balıklarda Üreme Sistem | 5 |
| 2.3.1. Testisler ve Kanal Sistemi | 5 |
| 2.3.2. Erkek Balıklarda Üreme Fizyolojisi | 6 |
| 2.3.3. Spermatogenezis | 6 |
| 2.3.4. Spermanın yapısı | 7 |
| 2.3.5. Spermatozoa | 7 |
| 2.3.6. Seminal plazma | 7 |
| 2.3.7. Spermatolojik Özellikler | 8 |
| 2.3.7.1. Sperma Rengi | 8 |
| 2.3.7.2. Sperma Miktarı | 8 |
| 2.3.7.3. Spermatozoa Motilitesi | 9 |
| 2.3.7.4. Spermatozoa Canlılık Süresi | 11 |
| 2.3.7.5. Spermatozoa Yoğunluğu | 11 |
| 2.3.7.6. Sperma pH' sı | 12 |
| 2.4. Balıklardan Spermanın Alınması | 12 |
| 2.4.1. Abdominal Masaj Yöntemiyle Spermanın Alınması | 13 |
| 2.4.2. Balık Spermasının Sulandırılması ve Dondurulması | 13 |

| | |
|---|----|
| 2.5. Dişi Sazan Balığının Üreme Fizyolojisi | 15 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 17 |
| 3.1. Gereç | 17 |
| 3.1.1. Balık Materyali | 17 |
| 3.2. Yöntem | 18 |
| 3.2.1. Dişi ve Erkek Balıklara Hipofiz Enjeksiyonunun Uygulanması | 18 |
| 3.2.2. Balıklardan Spermanın Alınması | 19 |
| 3.2.3. Spermatolojik Özelliklerin Belirlenmesi | 21 |
| 3.2.3.1. Spermanın Makroskopik Muayenesi | 21 |
| 3.2.3.1.1. Spermanın Mikroskobik Muayenesi | 21 |
| 3.2.3.1.2. Spermanın Rengi | 21 |
| 3.2.3.2. Spermanın Mikroskopik Muayenesi | 22 |
| 3.2.3.2.1. Spermatozoa Motilitesi | 22 |
| 3.2.3.2.2. Spermatozoa Canlılık Süresi | 22 |
| 3.2.3.2.3. Spermatozoon Yoğunluğu | 22 |
| 3.2.3.3. Sperma pH'ının Belirlenmesi | 23 |
| 3.2.4. Spermanın Sulandırılması | 24 |
| 3.2.5. Spermanın Dondurulması | 24 |
| 3.2.6. Spermanın Çözdürülmesi | 25 |
| 3.2.7. Dişi Balıklardan Yumurtaların Alınması | 26 |
| 3.2.8. Fertilizasyonu ve İnkübasyon İşlemleri | 26 |
| 3.2.9. Verilerin Değerlendirilmesi | 28 |
| 4. BULGULAR | 29 |
| 5. TARTIŞMA | 35 |
| 6. SONUÇ | 42 |
| 7. KAYNAKLAR | 44 |
| 8. ÖZGEÇMİŞ | 48 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | Sayfa No |
|--|-----------------|
| Şekil 3.1. DSİ VI. Bölge Müdürlüğü Su Ürünleri Baş Mühendisliğinde damızlık sazan balıklarının bulunduğu beton havuzlar..... | 18 |
| Şekil 3.2. Balıklara hipofiz enjeksiyonunun uygulanması | 19 |
| Şekil 3.3. Balıkların sedasyon için tutuldukları tank | 20 |
| Şekil 3.4. Balıktan abdominal masaj yöntemi ile spermanın alınması..... | 21 |
| Şekil 3.5. Sazan spermatozoonlarının faz kontrast mikroskobu ile Thoma lamındaki görünümü..... | 23 |
| Şekil 3.6. Spermanın dondurulmasında kullanılan strafor kutu | 25 |
| Şekil 3.7. Yumurtaların dölleni ve dölleni solüsyonunda bekletilmesi | 26 |
| Şekil 3.8. Çalışmada kullanılan Zuger düzeneği | 27 |
| Şekil 3.9. Yumurtaların fertilizasyon aşamasındaki makroskobik görünümü..... | 28 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | Sayfa No |
|--|-----------------|
| Çizelge 2.1. Bazı balık türlerinde kullanılan sperma sulandırıcıları ve kriyoprotektif maddeler | 16 |
| Çizelge 4.1. Damızlık erkek Pullu Sazan balıklarında elde edilen canlı ağırlık ve boy ölçümleri | 29 |
| Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan Pullu Sazan balıklarına ait spermatolojik özellikler | 30 |
| Çizelge 4.3. Farklı sulandırıcı ve kriyoprotektan kullanılarak sulandırılan spermaların ekulibrasyon sonrası motilite, canlılık süresi ve pH değerleri | 31 |
| Çizelge 4.4. Farklı sulandırıcı ve kriyoprotektan içeren çalışma gruplarında ekulibrasyon sonrası ortalama motilite değerleri | 31 |
| Çizelge 4.5. Farklı sulandırıcı ve kriyoprotektan içeren çalışma gruplarında dondurma- çözme sonrası elde edilen ortalama motilite değerleri | 32 |
| Çizelge 4.6. Çalışma gruplarında dondurma - çözme sonrası elde edilen ortalama spermatozoa canlılık süreleri | 32 |
| Çizelge 4.7. Çalışma gruplarında dondurma - çözme sonrası elde edilen ortalama fertilizasyon oranları | 33 |
| Çizelge 4.8. Çalışma gruplarında 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilen fertilizasyon işlemini takiben 4 ve 5. Günlerde elde edilen larva çıkış oranları | 34 |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|---|--|
| °C | : Derece Santigrat |
| °G | : Derece Gün |
| Ca⁺⁺ | : Kalsiyum |
| CaCl₂ | : Kalsiyum klorür |
| CaCl₂·2H₂O | : Kalsiyum klorid dehidrat |
| Cl⁻ | : Klor |
| cm | : Santimetre |
| DMA | : Dimetil asetamid |
| DMSO | : Dimetil sülfoksid |
| DNA | : Deoksiribonükleik asit |
| FAO | : Food and Agriculture Organisation (Gıda ve Tarım Örgütü) |
| g | : Gram |
| HCl | : Hidrojen klorür |
| HEPES | : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic asit |
| HgCl₂ | : Civa klorür |
| K⁺ | : Potasyum |
| KCl | : Potasyum klorür |
| kg | : Kilogram |
| L | : Litre |
| L. | : Linnaeus |
| mg | : Miligram |
| Mg⁺⁺ | : Magnezyum |
| MgCl₂ | : Magnezyum klorür |
| ml | : Mililitre |
| mm | : Milimetre |
| mmol | : Milimol |
| mOsm | : Miliosmol |
| Na⁺ | : Sodyum |
| Na₂SO₄ | : Disodyum sülfat |
| NaCl | : Sodyum klorür |

| | |
|--------------------------|---|
| NaHCO₃ | : Sodyum bikarbonat |
| pH | : Power of hydrogen |
| s | : Saniye |
| SPSS | : Statistical Package for the Social Sciences |
| TÜİK | : Türkiye İstatistik Kurumu |
| µl | : Mikrolitre |

ÖZET

Pullu Sazan (*Cyprinus Carpio* L. 1758) Spermalarının Dondurulmasında Kullanılan Farklı Sulandırıcı ve Kriyoprotektanların Fertilizasyon Üzerine Etkisi

Araştırmada, pullu sazan (*Cyprinus carpio* L. 1758) spermalarının farklı sulandırıcı ve kriyoprotektan içeren sulandırma solüsyonları ile sulandırılması ve dondurulması amaçlandı. Çalışmada, 3 yaş ve üzeri 11 adet erkek ve 5 adet dişi damızlık balık kullanıldı. Balıklardan sperma abdominal masaj yöntemi ile alındı. Alınan ejakulatlarda ortalama sperma miktarı, spermatozoa motilitesi (%), spermatozoa canlılık süresi (s), spermatozoa yoğunluğu ($\times 10^9$ /ml) ve pH değerleri sırasıyla 14.23 ± 22.16 , 82 ± 7.27 , 575.36 ± 624.63 , $11.5 \pm 3 \times 10^9$ ve 7.7 ± 0.4 olarak tespit edildi. Motilite tayininde spermatozoa aktivasyonu için % 0.3'lük NaCl solüsyonu kullanıldı. Spermaların sulandırılması için Sulandırıcı I (75 mmol/l NaCl, 70 mmol/l KCl, 2 mmol/l CaCl₂, 1 mmol/l MgSO₄, 20 mmol/l Tris), Sulandırıcı II (350 mM glukoz, 30 mM Tris) ve Sulandırıcı III (300 mM glukoz, %10 yumurta sarısı) olarak tanımlanan üç farklı sulandırma solüsyonu hazırlandı. Her sulandırma solüsyonuna %10 oranlarında DMSO, DMA ve Gliserol olmak üzere üç farklı kriyoprotektan ilave edilerek 9 farklı sulandırıcı kriyoprotektan kompozisyonu elde edildi. Spermalar 1:3 oranında sulandırıldıktan sonra 0.25 ml'lik payetlere çekilerek sıvı azot buharında donduruldu. Dondurulan payetler sıvı azot içinde -196 °C'de saklandı. Payetlerin çözdürme işlemi 30 °C'deki su banyosunda 20 saniyede gerçekleştirildi.

Gruplarda ekulibrasyon sonrası motilite oranlarının karşılaştırılmasında Sulandırıcı I ile Sulandırıcı II ve Sulandırıcı I ile Sulandırıcı III arasındaki farklılıkların önemli ($P < 0.001$) olduğu belirlendi. Ekulibrasyon sonrası motilite oranı üzerine kriyoprotektanların etkisinin bulunduğu, Sulandırıcı I ve Sulandırıcı III e ilave edilen DMSO ile DMA ($P < 0.01$) ve Gliserol ($P < 0.001$) arasındaki farklılıkların önemli olduğu tespit edildi. Dondurma çözdürme sonrası spermatozoa motilitesi üzerine sulandırıcıların etkisinin bulunduğu, Sulandırıcı I ile Sulandırıcı III arasında farklılığın önemli olduğu ($P < 0.05$), ancak bu farklılığın oluşumunda kriyoprotektanların ya da sulandırıcı ile birlikte kriyoprotektanların etkisinin bulunmadığı gözlemlendi ($P > 0.05$). Ortalama canlılık süresi en yüksek Sulandırıcı II DMSO grubunda (106.67 ± 43.33 s), en düşük ise Sulandırıcı I DMA grubunda (31.66 ± 9.27 s) elde edildi. Ancak, spermatozoa canlılık süreleri açısından gruplar arasında farklılığın önemli olmadığı tespit edildi ($P > 0.05$). Tüm gruplarda fertilizasyon oranları oldukça yüksek olmasına karşın, Sulandırıcı I ile Sulandırıcı II ve Sulandırıcı I ile Sulandırıcı III arasında farklılıkların önemli olduğu gözlemlendi ($P < 0.01$). Ancak bu farklılığın oluşumunda kriyoprotektanların ya da sulandırıcı ile birlikte kriyoprotektanların etkisinin bulunmadığı gözlemlendi ($P > 0.05$).

Sonuç olarak, üç farklı sulandırıcı ve kriyoprotektan içeren sulandırma solüsyonları ile sulandırılıp dondurulan pullu sazan spermaları ile yapılan fertilizasyon işlemlerinde tüm

deneme gruplarında fertilizasyon oranı oldukça yüksekti. En yüksek fertilizasyon oranı sulandırıcı II DMA grubunda (99.66 ± 0.33), en düşük fertilizasyon oranı ise sulandırıcı I DMSO grubunda (96.00 ± 1.00) elde edildi.

Anahtar Kelimeler: Pullu sazan, Sperma, Sulandırıcı, Kriyoprotektan, Dondurma.

ABSTRACT

Effect on Fertilization of Different Extender and Cryoprotectants Used Cryopreservation of Scaly Carp (*Cyprinus carpio* L.1758) Sperm

In this study, it was aimed to dilute and freeze the semen of scaly carp (*Cyprinus carpio* L.1758) in different cryoprotectants and extenders. In the experiment, 11 male and 5 female over 3-years-old stud carps were used. The semen of the fishes was collected by the method of abdominal massage. The mean semen volume (ml), sperm motility (%), sperm viability time (sec), spermatozoa concentration ($\times 10^9$ / ml) and pH values were 14.23 ± 22.16 , 82 ± 7.27 , 575.36 ± 624.63 , $11.5 \pm 3 \times 10^9$ and 7.7 ± 0.4 , respectively. In order to activation of sperm, 0.3% NaCl the solution was used. For semen dilution three different diluents called as extender I (75 mmol/l NaCl, 70 mmol/l KCl, 2 mmol/l CaCl_2 , 1 mmol/l MgSO_4 , 20 mmol/l Tris), II (350 mM glucose, 30 mM Tris) and III (300 mM glucose, %10 egg yolk) were used. DMSO (10 %), DMA (10 %) and glycerol (10 %) were added to each extender separately, in which nine different extender-cryoprotectant compositions were obtained. After the dilution of sperm at 1:3 ratio, the sperm samples were transferred in 0.25 ml plastic straws (IMV, France). The straws were cryopreserved in liquid nitrogen vapor (-120°C) and then was stored in the liquid nitrogen (-196°C). The frozen straws were thawed in a water bath at 30°C for 20 sec.

According to the comparison of motility rates in the groups after equilibration rates, it was found that extender I was significantly ($P < 0.001$) different from extender II and III. After equilibration, the effects of cryoprotectants on the motility rate was observed and it was found that the difference between DMA and glycerol with DMSO added to extender I and III was significant ($P < 0.01$). It was observed that there was an effect of extenders on the motility of spermatozoa after the thawing of straws. In addition, there was a significant difference between the extender I and III ($P < 0.05$). However, it was found that this difference was not the result of the use of cryoprotectants or extender with cryoprotectants ($P > 0.05$). After the straws were thawed, average lifetime was the highest in the extender II DMSO group (106.67 ± 43.33 sec), and lowest in the extender I DMA group (31.66 ± 9.27 sec). However, in terms of viability of spermatozoa differences between groups were not observed ($P > 0.05$). Although fertilization rates were high in all groups, the extender I was found to be the significant different ($P < 0.01$) from the extender II and III. However, it was observed that cryoprotectants or extenders with cryoprotectants ($P > 0.05$) did not have any effect on the formation of this difference.

In conclusion, fertilization rates were considerably high in all experiment groups in which the semen of *Cyprinus carpio* (L.1758) were cryopreserved in liquid nitrogen vapor after diluting with three different extender-cryoprotectant compositions. Fertilization rate

was the highest in the extender II DMA group (99.66 ± 0.33), and lowest in the extender I DMSO group (96.00 ± 1.00).

Key Words: Scaly carp, Semen, Extender, Cryoprotectant, Cryopreservation.

1. GİRİŞ

Su ürünleri yetiştiriciliği; sağlıklı beslenme, doğal balık stoklarına olan av baskısının azaltılması, istihdam, döviz girdisi ve kırsal kalkınmaya katkı sağlaması gibi yönlerden önemli bir üretim sektörüdür. Kontrollü balık üretimi, hayvansal protein ihtiyacının karşılanabilmesi için günümüzde oldukça büyük boyutlara ulaşmıştır. FAO tarafından dünyada en hızlı büyüyen gıda sektörü olarak belirlenmiş olan su ürünleri yetiştiriciliğinde, Türkiye’de de önemli gelişmeler gözlenmektedir. Yeterli ve dengeli beslenmenin temeli olan hayvansal ürün talebinin karşılanmasında su ürünleri yetiştiriciliği doğal bir kaynak özelliği taşımaktadır (FAO 2011).

TÜİK verilerine göre Türkiye’de 2010 yılında, yaklaşık 485.939 tonu avcılıkla, 167.141 tonu yetiştiricilikle olmak üzere toplam 653.080 ton su ürünleri üretilmiştir (TÜİK 2011).

Ülkemizde balık yetiştiriciliği üretim ve pazarlama yönünden gelişme göstermekle beraber, bu gelişime paralel olarak özellikle ıslah konusunda önemli sorunlarla karşılaşmaktadır. Bu soruna getirilebilecek çözümlerin başında kriyopreservasyon yöntemlerinin kullanılması gelmektedir. Sperma kriyopreservasyon yöntemi, balık yetiştiriciliğinde uygulanan ıslah programlarında büyük önem taşımaktadır (Akçay ve ark. 2004).

Balıkçılık endüstrisi uzun yıllar sağlıklı larvaların üretimi için, yumurta kalitesinin sperm kalitesinden daha önemli olduğu görüşüne sahip bulunmaktaydı. Ancak son yıllarda erkek damızlıklardan kaliteli sperma elde edilmesinin de larva üretiminde önemli olduğu görüşü kabul görmektedir (Rurangwa ve ark. 2004).

Yetiştiricilik koşullarında ancak iyi kalitede sperma kullanılarak yüksek oranda döl verimi elde edilebildiğinden sperma kalitesinin bilinmesi oldukça önemlidir. Çünkü spermatolojik özelliklerden herhangi birinde meydana gelen olumsuzluklar, döllenmeyi doğrudan etkilemekte, steril nitelikteki erkek damızlıkların işletmeden çıkarılması ile de önemli bir ekonomik kazanç elde edilmektedir (Bozkurt ve Seçer 2006). Spermatozoonun fizyolojik özelliklerini ve sperma kalitesinin belirlenmesi için yapılan çalışmalarda yaygın şekilde kullanılan parametreler; sperm hareketliliği, canlılık süresi, seminal plazmanın

biyokimyasal özellikleri, spermatozoonun yapısı ve sperm sulandırma oranlarının saptanması olarak ifade edilmektedir (Bromage ve Roberts 1995).

Türkiye’de çiftlik hayvanlarının yetiştiriciliğinde geniş bir kullanım alanı bulmasına rağmen, balık yetiştiriciliğinde dondurulmuş sperma kullanımı ve dondurulmuş sperma kullanarak yeterli düzeyde uygulama ve döl verimi başarısına henüz ulaşamamıştır. Yapılan literatür incelemelerinde, pullu sazan spermasının spermatolojik özelliklerini ortaya koyan ve dondurulan pullu sazan spermasının fertilité yeteneğinin belirlenmesine yönelik araştırmaların sınırlı sayıda olduğu görölmektedir (Akçay ve ark. 2004). Balık spermasının dondurularak (kriyopreservasyon) uzun süre başarılı bir şekilde saklanması ve uygun metotların seçilmesi, balık yetiştiriciliğinde damızlık stoğun organizasyonu açısından oldukça önemlidir. Başarılı bir kriyopreservasyonda sulandırıcının bileşimi ve kullanılan kriyoprotektanlar önemli rol oynamaktadır (Munkittrick ve Moccia 1984).

Bu çalışmada; pullu sazan (*Cyprinus carpio*)’ların sperma kalitesinin belirlenmesi, spermanın farklı kimyasal kompozisyona sahip sulandırıcı ve kriyoprotektanlar ile muamele edilerek sıvı azot buharında dondurularak muhafaza edilebilirliğı ve dondurulan spermanın çözdürülerek fertilizasyon yeteneğinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Balıklar (Latince: *Pisces*) poikloterm olan, neredeyse sadece suda yaşayan ve solungaçları ile solunum yapan, soğuk kanlı, çift gözlü kalp yapısına sahip, çoğunun vücudu pullu, genellikle yumurta ile üreyen omurgalı hayvanlardır (Vikipedi 2012)

Omurgalılar arasında en fazla türe sahip olan balıklarda, tür sayısının 40000 civarında olduğu bildirilmektedir (Vikipedi 2012). Memelilerin tür sayısı ise sadece 4500'dür. Bu nedenle, balıklar günümüzde yaşayan omurgalıların yarıdan fazlasını oluşturmaktadır. Bu kadar fazla sayıda türe sahip olan balıklar morfoloji, fizyoloji ve özellikle de reproduktif faaliyetler yönünden çeşitlilik göstermektedirler (Billard ve Cosson 1992, MEGEP 2006).

2.1. Sazan Balığının (*Cyprinus carpio* L. 1758) Tanımı, Dünyaya Yayılışı ve Sistematikteki Yeri

Bazı bölgelerde Üzgün, Akpullu ve Borak da denilen sazan tatlı su kökenli bir balıktır. Sazan balığı sıcak durgun gölleri ve yavaş akan suları sevmekte, tabanı kumlu, çamurlu ve su altı bitkilerinin iyi geliştiği ortamlardan hoşlanmaktadır. Ana vatanı, Anadolu'dan Uzakdoğu'ya kadar uzanan geniş bir alanı kapsamaktadır. Sazan balığının yayılış alanlarına göre 3 alt türü bildirilmektedir (Tekelioğlu 2005, Deveciyan 2006).

1. Avrupa ve Transkafkasya Sazanı (Adi Sazan: *Cyprinus carpio*, LINNAEUS, 1758). Yayılış alanı Hazar havzası ve Aral bölgesi.
2. Uzakdoğu ve Çin Sazanı (Amur Sazanı: *Cyprinus carpio haematopterus*). Yayılış alanı Kuzey Çin ve Amur havzası.
3. Vietnam Sazanı (*Cyprinus carpio fossicola*). Yayılış alanı Çin'in güney bölgeleri ile Vietnam'dır.

Sazan balığı Avrupa ve diğer kıtalara insan eli ile götürülmüş ve yaygınlaştırılmıştır. Avrupa'nın çeşitli ülkelerinde 7. ve 8. yüzyıllardan beri yetiştiriciliğinin yapıldığı

bildirilmektedir. Ülkemizde ise sazan yetiştiriciliğinin mazisi çok yeni olup, son 50-55 sene içerisinde kurulan işletmelerde üretilmektedir (Tekelioğlu 2005).

Sazan, Ostariophysaires takımının büyük *Cyprinidae* ailesinin tipik balığını oluşturur. Sazanın balığının sistematikteki yeri aşağıda belirtildiği şekilde yapılmıştır (Tekelioğlu 2005).

| | | |
|-----------|------------------------------------|---------------------|
| Sınıf | : Pisces | : Balıklar |
| Alt Sınıf | : Osteichthyes | : Gerçek kemikliler |
| Üst Takım | : Teleostei | : Kemikli balıklar |
| Takım | : Ostariophysyi | : Sazan nevalesi |
| Alt Takım | : Cyprinoidea | : Sazan benzerleri |
| Familiya | : Cyprinidae | : Sazangiller |
| Cins | : Cyprinus | : Sazan cinsi |
| Tür | : <i>Cyprinus carpio</i> (L. 1758) | : Sazan |

Bu takımın adı *Cypriniiformes* olarak da bildirilmektedir. Takımın belli başlı özelliği, işitme organlarına yüzme kesesini bağlayan küçük bir kemik zinciridir. *Cyprinidae* ailesi balıklarının karakteristik özellikleri; tek sırt yüzgecinin olması, vücutlarının çoğu zaman çok büyük pullarla kaplı olması, dudaklarının dikensiz, çenelerinin dişsiz olması ve çiğneme işleminin yutaktaki dişlerle sağlanmasıdır. *Cyprinidae*/Sazangiller ailesinin denizde yaşayan hiçbir üyesi bulunmamaktadır (Tekelioğlu 2005).

2.2. Sazan Balığının Morfolojisi ve Ayırıcı Özellikleri

Sazan balığının baş ve sırt kısımları esmer yeşil, yanlar ise yeşilimsi sarı renktedir. Sazan balıklarında vücut füze şeklinde, bazı melez türlerinde enli olabildiği gibi, yanlardan hafif yassılaştırmış görünümündedir. Yanlardan yassılaştırma daha az olup, vücut oval bir görünüş kazanmış ve daima boyu, yüksekliğinden daha fazladır. Genellikle vücut düzgün

ve iri pullarla kaplıdır. Adi sazandan melezleme sonucu elde edilmiş olan türlerde pullar azalmış veya yoktur, baş kısmı pulsuzdur (Atay 1987, MEGEP 2006).

Sazanların hava keseleri iki odacıklıdır. Sırt yüzgeçleri uzun, göğüs ve karın yüzgeçleri çift, diğer yüzgeçleri ise tektir (Çelikkale 1988, Emre 2004). Aynalı sazan olarak da adlandırılan kültür sazanı, doğal sazanının kültüre edilmiş formudur. Doğal sazana göre daha yüksek sırtlı, tıknaz, vücudunun büyük kısmı pulsuz, pulları vücudunun değişik bölgelerine dağılmış ve yuvarlaktır. Aynalı Sazan hızlı gelişen ve yapay yetiştiricilik şartlarına iyi uyum sağlayan ve yem değerlendirmesi yüksek olan bir türdür. Aynalı sazanların 20 - 25 yıl hatta 35 - 40 yıl yaşadıkları ve boylarının 1 m'nin üzerine çıktığı ağırlıklarının ise 25 - 30 kg'a ulaştığı bildirilmektedir (Geldiay ve Balık 1999, MEGEP 2006).

Boğaz bölgesine yerleşmiş ve besinleri öğütme görevini üstlenmiş olan yutak (Farinks) dişleri görülmekte olup, türlerin sistematik ayrımında önemli bir karakter olarak dikkate alınır. Farinksin iç cidarında bulunan dişler ise sazangiller ailesi üyelerinde görülmektedir (Atay 1987, Sarihan ve Tekelioğlu 2005).

Karın yüzgeçlerinin yeri göğüs yüzgeçlerinin arkasında olup abdominal tip yüzgeç görülmektedir. Sazanlarda gerçek mide yoktur; onun için yemek borusu iyi gelişmiş olup, doğrudan doğruya bağırsağa bağlanır. Anüsün şekli cinsleri ayırıcı karakter olarak kullanılabilir. Dişi sazanda anüs konvex veya kabarık durumda olduğu halde, erkekte konkav görünüştedir. Sazan balığı ses titreşimlerine karşı çok hassastırlar. Sebebi, titreşimleri hava kesesinden iç kulağa nakleden ve weber kemikleri denilen bir seri kemik sisteminin (4 adet kemik) mevcut olmasıdır (Sarihan ve Tekelioğlu 2005, MEGEP 2006) .

2.3. Erkek Balıklarda Üreme Sistemi

2.3.1. Testisler ve Kanal Sistemi

Erkek balıkların üreme sistemi testisler ve bunlara bağlı kanal sisteminden oluşmaktadır. Testisler vücut boşluğunun medio - dorsalinde, uzunlamasına ve çift olarak yer almaktadır. Testisler vücut boşluğunun çeperine “mezorşiyum” adı verilen ligament ile bağlıdır (Billard 1992, Suquet ve ark. 1993).

Testislerin büyüklükleri ve rengi üreme mevsimine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Ergin balıklarda testisler vücut ağırlığının %12'sine kadar erişebilmektedir. Renkleri krem-beyaz olup, yüzeyi pürüzsüzdür (Billard 1992).

Testisler, testiküler kapsül ile sarılı bulunmaktadır. Bu kapsül testisin içerisine girintiler yaparak spermatogenetik birimleri oluşturur. Spermatogenetik birimlerin her biri rete testis adı verilen bir kanal ağı ile bağlantılı bulunmaktadır. Spermatogenetik birimlerin içlerinde üreme hücreleri (spermatogonium) ve sertoli hücreleri olmak üzere iki tip hücre bulunur. Sertoli hücrelerinin, besleyici ve destekleyici rol oynadığı ve hormon sentezlediği bildirilmektedir (Loir 1990, Çelikkale 1991).

2.3.2. Erkek Balıklarda Üreme Fizyolojisi

Reproduktif etkinliğin başlaması için yumurtadan çıktıktan sonra erkek balığın belirli bir vücut ağırlığına ulaşması, uygun değerde sıcaklık, ışık ve düzenli bir hormonal mekanizma gerekmektedir. Genellikle erkekler dişilerden daha erken seksüel olgunluğa ulaşırlar. Ayrıca bireydeki tür, yaş, boy ve fizyolojik yapı puberteyi etkilemektedir (Çelikkale 1991).

Beslenme ve büyüme için optimum su sıcaklığı 23 - 25 °C'dir. Bulunduğu suyun sıcaklığı ve besin madde içeriğine bağlı olarak erkekler 2 - 3 yaşında cinsel olgunluğa erişirler. Erkek balıklar spermalarını yumurtaların üzerine püskürterek bir çeşit bombardıman ile dömlü yumurta sayısının artmasını sağlarlar. Ülkemizde sazan balığının üreme periyodu Mayıs-Temmuz aylarındadır (Tekelioğlu 2005, Çağltay 2007).

2.3.3. Spermatogenezis

Reproduktif siklus, reproduktif eksen diye adlandırılan ve hormon salınımını düzenleyen beyin – hipofiz – gonadlar arasında düzenlenmektedir. Hipofiz gonadotropinleri (GTHs) olarak adlandırılan follikül stimüle edici hormon (FSH) ve luteinleştirici hormon (LH) reproduksiyonun hormonal kontrolünde anahtar rol oynamaktadırlar. GTHs'nin salınımı beyin yoluyla gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH)'un stimüle edici etkisi ile olmaktadır (Cabrita ve ark. 2009).

Spermatogenezisin başlangıcında, spermatogonia'lar hacim olarak büyür ve primer spermatozoitler oluşur. Primer spermatozoitler mayoz bölünme geçirerek sekonder spermatozoitlere, her bir sekonder spermatozoitin mayoz bölünme geçirmesi sonucu ise spermatid 'ler oluşmaktadır. Spermatid'ler haploit kromozomlu olup çevreleri bir membran ile kaplıdır. Spermatid'ler belli bir süre sonra bir çeşit metamorfoz geçirerek spermatozoonlara dönüşmektedir (Woynorovich ve Horvath 1980).

2.3.4. Spermanın yapısı

Sperma, spermatozoa ve seminal plazmadan oluşan, genellikle beyaz-krem renğinde yarı visköz hücresel bir sıvıdır (Bozkurt 2004).

2.3.5. Spermatozoa

Balık spermatozoa'ları baş, orta ve kuyruk olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır. Sazanlarda baş kısmında akrozom bulunmaz, sitoplazma ve mitokondrileri içeren oldukça kısa bir orta kısma sahiptirler (Billard 1988).

Sazan spermatozoonlarının baş kısmı küresel bir yapıdadır (Jamieson 1991). Spermatozoa'nın orta kısmı kısadır. Spermatozoa'nın orta kısmında düzensiz ve asimetric bir yapılaşma söz konusu olup 8-10 adet mitokondri bulunmaktadır (Bozkurt 2004). Spermatozoa'lar testisin kanal boşluklarında toplanmakta ve çevre şartları uygun oluncaya kadar inaktif bir şekilde kalmaktadır. Testislerde inaktif bir şekilde bulunan spermatozoa, su ile temasa geçtiğinde hareket kabiliyeti kazanmaktadır (Akçay ve ark. 1995; Gorda 1995).

2.3.6. Seminal plazma

Seminal plazmanın bileşimini Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , Cl^- , glukoz, sakroz gibi şekerler ve protein komponentleri oluşturmaktadır (Bozkurt 2004). Sazan seminal plazmasında LDH (laktat dehidrojenaz), MDH (malat dehidrojenaz), acetate-butyrate esteras, alanyl-leucine aminopeptidaz gibi enzimsel aktiviteler bulunduğu bildirilmiştir (Billard ve Cosson

1990). Seminal plazmayı oluşturan maddeler yaşam ve çevre koşullarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Piironen 1985).

Spermanın kimyasal içeriği türden türe ve üreme sezonunun dönemlerine göre farklılıklar gösterse de, genellikle Na^{++} ve K^{++} 'ca zengin olup ayrıca Mg^{++} ve Ca^{++} 'da içermektedir (Stoss 1983).

2.3.7. Spermatozojik Özellikler

2.3.7.1. Sperma Rengi

Birçok balık türünde sperma beyaz - krem renge sahiptir. Bundan dolayı balık spermasına “balık sütü” de denilmektedir (Seçer 1998).

2.3.7.2. Sperma Miktarı

Sperma miktarı, spermatozoa motilitesi ve spermatozoa yoğunluğu balıklarda sperma kalitesini gösteren önemli spermatozojik özelliklerdendir. Sperma miktarı ise balığın sperma veriminin ve spermatozoa sayısının göstergelerindedir (Aral ve ark. 2004). Spermanın miktarı, tür ve ırklar arasında hatta bir balık topluluğunun bireyleri arasında önemli farklılıklar göstermektedir (Cabrita ve ark. 2009).

Spermatozoonlar, balık testislerinde tüm yıl boyunca bulunabilmekte ve su sıcaklığının uygun olması durumunda da hormonal uyarım ile yıl boyunca sperma alınabilmektedir (Weil 1980). Özellikle su sıcaklığı, sperma alma aralığı, yaş, dişinin varlığı ve bakım-besleme şartları sperma miktarı üzerine doğrudan etkilidir (Büyükhatipoğlu ve Holtz 1984). Bozkurt ve Seçer (2005) sperma miktarına ilişkin olarak, üreme mevsiminin başında düşük olan sperma miktarının üreme mevsiminin ortasında artış gösterdiğini ve üreme mevsiminin sonunda ise tekrar azaldığını belirtmektedir. Gjerde (1984), sperma miktarı ile vücut ağırlığı ve vücut uzunluğu arasında pozitif bir ilişki bulunduğunu kaydetmektedirler.

Bozkurt ve Seçer (2006), aynalı sazan balıklarında üreme mevsimi boyunca spermatozojik özelliklerini inceledikleri çalışmalarında Nisan ayında sperma miktarı en yüksek 4.8 ml, en düşük 0.8 ml; Mayıs ayında sperma miktarını en yüksek 55.3 ml, en

düşük 2.0 ml ve Haziran ayında sperma miktarını en yüksek 2.4 ml, en düşük 0.1 ml olarak bildirmektedirler.

Horvath ve Lukowicz (1982), sazan, ot sazanı, gümüş sazanı ve büyükbaş sazanda ortalama sperma miktarlarını sırasıyla 10 - 20 ml, 10 - 20 ml, 5 - 15 ml ve 10 - 12 ml olarak kaydetmektedirler. Akçay ve ark. (2004) yaptıkları bir çalışmada, 15 adet aynalı sazanda sperma miktarını 1 ml ile 40 ml arasında oldukça değişken bir hacim aralığında ve ortalama 13.26 ml olarak bildirmektedirler.

2.3.7.3. Spermatozoa Motilitesi

Motilite, tek yönde ve güçlü hareket eden spermatozoonların, hareketsiz ve diğer hareket biçimi gösteren spermatozoonlara oranı olarak ifade edilir. Işık mikroskopunda 200 ya da 400 büyütme ile belirlenebilmektedir (Akçay ve ark. 2004). Spermatozoa motilitesi, spermatozoonların dölleme kapasitesi ve sperma kalitesi hakkında fikir veren önemli bir göstergedir. Motil özellik taşımayan spermatozoonların yumurta membranına penetre olamadığı ve yumurtayı dölleyemediği belirtilmektedir (Honeyfield ve Krise 2000, Aral ve ark. 2004).

Spermatozoon motilitesini belirlemek için farklı solüsyonlar kullanılabilir (Tvedt ve ark. 2001). Motilite muayenesinde 10 µl sperma, 1 ml SSP (suni seminal plazma; 1.6 mM CaCl₂, 120 mM NaCl, 30 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM NaHCO₃, pH 8) ile sulandırılır ve sonra bu örnekten bir damla Bovin Serum Albumin (BSA) kaplanmış mikroskop lamı üzerine yerleştirilir. Daha sonra 25 µl işletme suyu ile aktive edilen sperma, 400 büyütmede tesadüfi mikroskopik alanlarda ileriye doğru hareket eden spermatozoon oranı % olarak belirlenir. Motilitenin gerçeğe yakın olarak tespit edilebilmesi için en az 3 farklı mikroskop sahasında değerlendirmeler yapılarak ortalamasının alınması gerektiği kaydedilmektedir (Tvedt ve ark. 2001, Çoyan 2002).

Morisawa ve Morisawa (1986)'ya göre, birçok balık türünde motilite değerlendirmesi skala yöntemi ile yapılmaktadır. Bu yöntemde göre spermatozoa motilitesi -, ±, +, ++, +++ ve ++++ şeklinde değerlendirilmektedir. Bu skalada “-” spermatozoa'nın tamamının hareketsiz olduğunu, “±” spermatozoada titreşim hareketi görüldüğü, “+”

spermatozoa'nın %10 - 25 oranında motil olduğunu, “++” spermatozoa'nın %25 - 49 oranında motil olduğunu, “+++” spermatozoa'nın %50 - 75 oranında motil olduğunu, “++++” ise spermatozoa'nın %75 ve üzerinde motil olduğunu belirtmektedir. Suquet ve ark. (1992) ise motilite sınıflandırmasını, immotil sperma için 0, %0 – 20 motil hücreler için 1, %20 – 40 için 2, %40 – 60 için 3, %60 – 80 için 4 ve %80 – 100 için 5 puan üzerinden gerçekleştirmişlerdir.

Balık spermasının önemli özelliklerinden birisi, spermatozoonların testislerden ayrıldıktan sonra motil karakterde olmamasıdır. Bunun nedeni seminal plazmanın iyon kompozisyonuna ve ozmotik basıncının yüksek olmasına bağlı olarak açıklanmaktadır (Morisawa ve ark. 1983). Ancak, ejakülasyondan sonra su ile temas ettiklerinde hareket kabiliyeti kazanırlar. Bunun da en önemli nedeninin seminal plazmada bulunan K^+ iyonları olduğu belirtilmektedir. Ayrıca seminal sıvı ozmotik basıncının yüksekliği (306 mOsm) ve sukroz gibi şekerlerin varlığı da spermatozoa motilitesini engelleyen önemli faktörlerdir.

Sperma balıktan alındıktan sonra spermatozoonlar hareketsiz kalmaktadırlar. Birçok balık türünde, ozmotik basınçtaki azalma, hareketsiz olan spermatozoadaki motiliteyi başlatabilmektedir. Spermatozoadaki motilite ve motilite süresi başarılı bir fertilizasyon için gerekli olmaktadır. Bu durum spermatozoanların ovuma ulaşip dölleyebilme yeteneğini göstermektedir. İyi kalitede bir spermada, bu iki özelliğe ait değerlerin yüksek olduğu bildirilmektedir (Bozkurt 2004).

Spermatozoa motilitesi üzerinde mevsimsel değişimin önemli rol oynadığı çeşitli araştırmacılar tarafından belirtilmektedir (Bozkurt ve Seçer 2006, Cabrita ve ark. 2010, Hatipoğlu ve Akçay 2010). Özellikle üreme mevsiminin ortasında sperma miktarı, motilite, canlılık süresi, yoğunluk ve toplam spermatozoon sayısında belirgin bir artış, sperma pH'sında ise azda olsa bir azalma olduğu kaydedilmektedir (Bozkurt ve Seçer 2006). Spermanın en yüksek motiliteye sahip olduğu dönemin üreme sezonunun ortaları olduğu kaydedilmektedir (Cabrita ve ark. 2010, Hatipoğlu ve Akçay 2010).

2.3.7.4. Spermatozoa Canlılık Süresi

Balık spermasının canlılık süresi, sperma alındıktan sonra küçük bir damla sperma örneği lam üzerine bırakılır, daha sonra balık türüne özgü aktivasyon sıvısı sperma üzerine ilave edilir. Hazırlanan preparatta spermatozoa hareketlilik süresi 100 ya da 200 büyütme ile izlenerek saniye olarak kaydedilir. Canlılık süresi aynı cinsin farklı bireyleri arasında da değişiklik göstermektedir (Tekin ve ark. 2003). Dış döllenmeye (ovipar) sahip balıklarda sperm motilite süresi çok kısadır (Hatipoğlu ve Akçay 2010). Balıklarda yaşın ilerlemesiyle birlikte sperma hacmi, motilite, canlılık süresi ve toplam spermatozoon sayısının arttığı, ancak spermatozoon yoğunluğunun azaldığı bildirilmektedir (Tekin ve ark. 2003).

Ortam sıcaklığı, canlılık süresini etkileyen önemli bir faktördür. Düşük sıcaklığa sahip ortamda spermatozoa daha uzun süre hareketli kalırken, yüksek sıcaklığa sahip ortamlarda bu süre daha kısa olduğu kaydedilmektedir (Stoss 1983).

Bozkurt ve Seçer (2005), üreme mevsimi boyunca yaptıkları çalışmada canlılık süresinin üreme mevsiminin ortasında artış gösterdiğini kaydetmektedirler. Yine aynalı sazanlarda yapılan başka bir çalışmada, aynalı sazan damızlıklardan alınan spermaların canlılık süresi saniye (s) olarak Nisan ayında en yüksek 310, en düşük 56, Mayıs ayında en yüksek 1635, en düşük 282, Haziran ayında en yüksek 860, en düşük 106 olarak bildirilmektedir (Bozkurt ve Seçer 2006).

2.3.7.5. Spermatozoa Yoğunluğu

Yoğunluk, birim hacimde bulunan spermatozoa sayısı olarak kabul edilir. Spermatozoa yoğunluğu hemositometrik yöntemle ($\times 10^9/\text{ml}$) belirlenebilmektedir. Hemositometrik yöntemde, 1/100 - 1/1000 oranları arasında Hayem solüsyonu (5 g Na_2SO_4 , 1 g NaCl , 0.5 g HgCl_2 , 200 ml distile su), %10'luk NaCl çözeltisi veya serum fizyolojik içerisine birkaç damla formalin damlatılması ile hazırlanan solüsyonlar kullanılabilir. Sayım için çeşitli lamlar kullanılmakla beraber pratikte "Thoma" lamı kullanılmaktadır (Çoyan 2002).

Zhukinskiy ve Alekseenko (1983), sazanlarda spermatozoa yoğunluğunu üreme mevsiminin başlangıcında, ortasında ve sonunda sırasıyla 15.2×10^9 , 11.5×10^9 ve 12.1×10^9 spermatozoon/ml olarak belirtmektedirler.

2.3.7.6. Sperma pH' sı

pH, spermanın değerlendirilmesinde kullanılan önemli bir parametredir. Balıklarda sperma pH'sı genel olarak oldukça geniş değer (5.5-9.5) aralıkları arasında seyretmektedir (Tekin ve ark. 2003). Sperma pH'sındaki değişimlerin belirlenmesi, spermadaki spermatozoa oranı ve morfolojisi hakkında bilgi verebilmektedir (Aral ve ark. 2004). Spermaya idrar veya mukusun karışması osmolaritenin ve pH'sının düşmesine neden olduğu bildirilmektedir (Özgöray ve Akçay 2010).

Lahnsteiner ve ark. (1998), seminal plazma pH'sı ile potansiyel hareketli spermatozoa yüzdesi, doğrusal hareketli spermatozoa ve spermatozoanın yüzme hızı arasında belirgin bir korelasyon olduğunu bildirmektedir. Araştırmacılar (Lahnsteiner ve ark. 1998) sazan spermatozoasının potansiyel hareketliliğini etkileyen en önemli özelliğinin pH olabileceğini ileri sürmektedir.

Krasznai ve ark. (1995) sazan spermatozoalarının hipoozmotik ortamda seyreltikten sonra, pH'sında zamana bağımlı değişimler olduğunu ve bununda hareketliliği başlattığını belirtmektedirler.

2.4. Balıklardan Spermanın Alınması

Balıklarda sperma kalitesinin en üst düzeyde tutulması için, öncelikle balıklar stressiz koşullarda tutulmalıdır. Bu koşullara; üreme sezonunun pik yaptığı sırada spermanın alınması, seksüel olgunluğa ulaşmış ve sağlıklı saf ırk balıkların seçimi, taşıma sırasında hayvanların anestezi altına alınması (fenoksietanol, benzokain, Quinaldine, MS-222 veya herhangi uygun bir anestezik) ve insanlardan balıklara gelecek zararların en aza indirilmesi de dâhildir. Toplanabilir spermanın hacim ve kalitesi, mevcut balığın sperma miktarı ve erkeklerin boyutuna bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Sperma doğrudan

cam mezur, şişe, steril şırınga, eppendorf, pipet, test tüpü, plastik torba veya petri kaplarına alınabilmektedir (Cabrita ve ark. 2009).

2.4.1. Abdominal Masaj Yöntemiyle Spermanın Alınması

Abdominal masaj, balığın karnına hafifçe bastırarak elin kranialden kaudale doğru hareketleri ile spermanın alınması (sağılma) işlemidir. Balıktan sperma almak için, balığın sudan çıkartılması, balığın gövdesindeki mukus yapışmalarının ve suyun silinmesi ve özellikle balığın ürogenital kanalın açılış alanının (genital papilla) temiz ve kuru olması gerekmektedir. Sperma almaya başlamadan önce, idrar ve fekal bulaşık içeriğin dışarıya atılması için balığın karnına nazikçe masaj yapılmalıdır. Sperma almak için, ürogenital kanal çıkışında sperma sızıntısı olan damızlık balıklar tercih edilmelidir. Nazikçe balığın karnını sıvazlayarak sperma alırken, spermanın su, mukus, balığın pulu, kan, safra sıvısı veya periton sıvısı ile kirlenmemesine dikkat edilmelidir. Abdominal masajla sağılan sperma temiz, kuru, önceden etiketlenmiş kaplara konulmalıdır. Mukus, su, kan ve dışkı ile kontamine olmuş spermada genellikle spermatozoonlar aktive olmaktadır. Toplanan sperma örnekleri aerobik ortamda 4 - 5 °C altında tutulmalıdır. Sağımdan hemen sonra spermanın muayenesi yapılmalı, sulandırma ve dondurma işlemlerine geçilmelidir. Dondurma ya da daha sonraki çalışmalar için %90 ve üzeri motilite gösteren spermalar tercih edilmelidir (Cabrita ve ark. 2009).

2.4.2. Balık Spermasının Sulandırılması ve Dondurulması

Balık spermasının dondurulması özellikle son yıllarda akuakültür alanında giderek artan bir ilgi görmektedir. Bunun sebeplerini; değerli balık türlerine ait genlerin muhafaza edilmesine imkan vermesi, yıl boyunca gamet hücrelerinden faydalanılmasına olanak sağlaması, gamet transportuna imkan vermesi ve işletmenin yem masraflarından tasarruf edilmesine imkan vermesi şeklinde sıralamak mümkündür (Mongkonpunya ve ark. 2000).

Spermanın muhafazası için farklı yaklaşımlarda bulunmaktadır. Bunlar; farklı gazlar ile doyurulmuş medyumlarda spermanın tutulması, sıfır ve üzerindeki sıcaklıklarda spermanın saklanması, dondurma ve kurutma şeklinde sıralanabilir. Ancak, bugüne kadar,

düşük sıcaklıkta muhafazanın en etkili yaklaşım olduğu, balık spermasının ilk başarılı dondurulması ise 1953 yılında Blaxter tarafından gerçekleştirilmiştir. Balık spermasının dondurulması işlemi daha sonra yaygın olarak uygulanmış, sadece balık hibridizasyonu ve üretimi için değil, hem biyolojik çeşitlilik üzerindeki programların yürütülmesi, hem de tehlike altındaki türlerin korunması için rutin bir araç haline gelmiştir. Soyu tükenen ya da tükenmekte olan türlerin korunması için gamet bankaları oluşturulmaktadır (Kopeika ve ark. 2007). Rana ve Gilmour (1996) son yıllarda, 200'den fazla balık türünün spermasının başarıyla dondurulduğunu kaydetmektedir.

Balıklar, Kaliforniya çöllerindeki sıcak sulardan Antarktika'daki soğuk sulara, tatlı sulardan yüksek oranlı tuzlu sulara kadar dünyadaki tüm yüzey sularında yaşamaktadır. Balıklarda, bu farklı ortamlarda yaşamak için, morfolojik ve fizyolojik özelliklerinde önemli farklılıklar olmuştur. Balıklar farklı çevre koşullarında hayatta kalmak için, uyum mekanizmaları geliştirmek zorunda kalmışlardır. Bu nedenle balık türleri arasında sperma dondurulma protokolleri için önemli farklılıklar görülmektedir. Örneğin, deniz ve tatlı su türlerinin üreme hücrelerinin çözündürme sonrası motilitelerinde çarpıcı bir farklılık bulunmaktadır. Tatlı su balığı spermasının dondurulması daha güç iken, deniz türlerinin spermasının başarılı olarak dondurulması ilk kriyoprotektan keşfinden hemen sonra gerçekleşmiştir. Düşük sıcaklıkta tatlı su balığı spermasının depolanması için birçok protokol mevcut olmasına rağmen, bu teknolojiyi geliştirmek için çalışmalara hala gereksinim bulunmaktadır. Genelde kriyoprezervasyon işleminden sonra tatlı su balıklarında ortalama %40 - 90 oranında spermatozoon zarar görürken, bu oran deniz balıklarında sadece %10 - 20 oranındadır. Türler arasındaki fark, muhtemelen balığın çevresinden dolayı geliştirilen kendi hücresel özelliklerinin bir sonucudur. Balık sperması çözülme sonrası motilite başarısı, büyük ölçüde ekstrasellüler medyumdaki osmotik değişikliklere olan duyarlılıklardan kaynaklanmaktadır (Kopeika ve ark. 2007). Tatlı su türleri 0 - 50 mOsm bir ortamda yaşamaktayken, deniz balıkları 600 - 1000 mOsm bir değer aralığında yaşamaktadır. Seminal plazma osmolalitesi türler arasında farklılık göstermektedir. Örneğin, Sibiryaya mersin balığı (*Acipenser baeri*) 20 - 60 mOsm spermaya sahip iken, tatlı su veya deniz suyu teleost balılarında ise 230 ve 320 mOsm (Gallis ve ark. 1991) arasında sperma ozmolaritesi vardır. Tatlı su balığının sperma aktivasyonu, hücre dışı ozmolaritenin azalması ile, tuzlu su balıklarında ise dış osmolarite artışı ile gerçekleşmektedir. Deniz balığı türlerinde spermada ozmolarite artışı, ortama zararlı

olmayıp, kriyoprotektan uygulaması sırasında ve kriyoprezervasyonda artmış ozmolarite kolayca tolere edebilir. Tatlı su balıklarında, sperma ozmolaritedeki artışa doğal olarak alışık değildir. Bu nedenle kriyoprotektan ilavesi, dondurulması ve dengeleme sırasında strese maruz kalmaktadır. Donmaya karşı direncin (kryoresistansın), balık türleri arasında hatta aynı türün bireyleri arasında da yüksek değişkenlik gösterdiği bildirilmektedir. Tatlı su balığı en çok araştırma yapılan balık türleri olup, balıkların bireysel ve türe özgü özelliklerinden dolayı, spermanın kriyoprezervasyonu için güvenilir protokoller geliştirmek gerekmektedir (Kopeika ve ark. 2007).

Başarılı bir kriyoprezervasyon, dondurulacak spermanın kalitesi ile yakından ilgilidir. Spermatozoonun yapısı ve spermanın kriyoresistansı, seminal plazmanın fizikokimyasal kompozisyonuna, spermanın kalitesine, hacmine, türe, ırka hatta bireysel olarak arasında önemli farklılıklar göstermektedir. Buna ek olarak, spermatozoonun dayanıklılığı balığın sağlık durumu, sosyal hiyerarşi, beslenme, spermayı depolama süresi ve depolama koşulları, sperma toplama teknikleri ve mevsime göre de değişmektedir. Bu nedenlerle seçilen balıktan alınan spermanın kalitesi dondurma işleminden önce dikkatle incelenmelidir. Spermanın herhangi bir kontaminasyon ile kirlenmemesi ve spermanın alınmasından sonra dondurma işleminden önce kendi enerji rezervlerini tüketmemesi için spermanın güvenli olarak muhafaza edilmesi tavsiye edilmektedir. Sperma örnekleri aerobik koşullarda, 4 - 5 °C' de muhafaza edilmelidir ve balıktan alınır alınmaz dondurulmalıdır. Balık sperması, alındıktan sonra hızla fonksiyonlarında bozulma gerçekleşmektedir (Cabrita ve ark. 2009). Bazı balık türlerinde kullanılan sperma sulandırıcıları ve kriyoprotektif maddeler Çizelge 2.1'de görülmektedir.

2.5. Dişi Sazan Balığının Üreme Fizyolojisi

Cinsi olgunluğa erişmiş bir dişi sazan balığının başlıca morfolojik özelliği; şişkin ve yumuşak bir abdomen ile kırmızı renkte genital papilaya sahip olmasıdır. Ergin dişi sazanlar doğal ortamları olan göller ve yavaş akan nehirlerde su sıcaklığı 18 – 22 °C olduğunda gruplar halinde yumurtlarlar. Bitkilere yapışan yumurtalardan 3 – 4 günde larva çıkışı olur. Yumurtlama Mayıs - Temmuz ayları arasında su sıcaklığı 18 – 20 °C'ye ulaştığında sığ ve bol bitkili su kesimlerinde olur. Sazanın üremesinde en önemli faktör su sıcaklığı olduğundan, kuzey ülkelerinde nadiren ürer veya hiç üremezler. Yumurtlama bir

haftada tamamlanır. 1 kg vücut ağırlığına sahip olgun bir sazan balığı 200 – 300 bin yumurta bırakabilir. Yumurtaları şeffaf ve yapışkan olup yaklaşık 1 mm çapındadır. Döllenme sonrası su alarak şişmiş yumurtanın çapı 1.6 mm kadardır. Su bitkilerinin üzerine bırakılan yumurtalar 3 – 4 günde (60 – 70 °G) açılır. Yumurtadan çıkan larvaların boyu 5 mm kadardır. Yumurtadan çıkan larvalar 1 – 3 gün süreyle baş kısımlarından su bitkilerine tutunurlar (Bakos 1995, László ve ark. 2002, Sarıhan ve Tekelioğlu 2005, MEGEP 2006) .

Çizelge 2.1. Bazı balık türlerinde kullanılan sperma sulandırıcıları ve kriyoprotektif maddeler (Kopeika 2007).

| Balık Türü | Medium içeriği | Miktar |
|----------------------------------|---|--|
| Sazan (<i>Cyprinus Carpio</i>) | NaCl KCl CaCl ₂ ·6H ₂ O MgSO ₄ ·7H ₂ O NaHCO ₃ Sucrose D-Mannitol Tris-oxymethyl-aminomethane basis Glutathione red Polyvinyl alcohol Yumurta sarısı HCl H ₂ O Ethylene glycol | 42 mg 6 mg 18 mg 62 mg 280 mg 137 mg 1,5 g 1.697 g 56 mg 5 mg 12.0 ml pH 8.1 100 ml 19.6 ml |
| Mersin Balığı | Tris-HCl buffer Yumurta sarısı DMSO | 0.05 M 20% 25% |
| Alabalık | NaCl KCl CaCl ₂ ·2H ₂ O MgSO ₄ ·7H ₂ O HEPES H ₂ O Methanol Bovine serum albumin Sucrose Yumurta sarısı | 600 mg 315 mg 15 mg 20 mg 470 mg 100 ml 10 ml 1.5 g 0,5 g 7 ml |

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Çalışma Adana Devlet Su İşleri 6. Bölge Müdürlüğü Balık Üretim İstasyonu'nda yürütüldü (Şekil 3.1). Üretim istasyonu bünyesinde yetiştirilen cinsel olgunluğa erişmiş, damızlık nitelikli pullu sazanlar (*Cyprinus carpio*) çalışma materyalini oluşturdu. Çalışma Haziran – Temmuz aylarında yapılmıştır. Çalışma sırasında havuz suyu sıcaklığı 21 - 22.5 °C olarak ölçüldü.

3.1.1. Balık Materyali

Mevcut çalışmada sağlıklı ve damızlık niteliğindeki, 3 yaş ve üzerinde olan 11 adet erkek ve 5 adet dişi damızlık kullanıldı. Balıkların canlı ağırlıkları 10 g hassasiyetli terazi ile “kg” olarak, uzunlukları ise ölçüm cetveli ile “cm” olarak belirlendi. Balıklar günde 1 defa olmak üzere %30 protein ihtiva eden pelet yem (4 numara alabalık yemi) ile beslendi. Yemleme her gün 16.00'da havuzun aynı yerinden yapıldı.



Şekil 3.1. DSİ VI. Bölge Müdürlüğü Su Ürünleri Baş Mühendisliğinde damızlık sazan balıklarının bulunduğu beton havuzlar.

3.2. Yöntem

3.2.1. Dişi ve Erkek Balıklara Hipofiz Enjeksiyonunun Uygulanması

Bir yardımcı; balıkları havuzdan çıkartıp, enjeksiyon ve dikiş işleminin yapılacağı üzeri suni deri kaplı sünger masanın üzerine aldı ve balık masanın üzerinde hazır halde bekleyen havlunun üzerine konulup ters duracak şekilde tutuldu.

Damızlık balıklara 1 mg/kg oranında sazan hipofiz ekstraktı (C.P.E., Pituitary Extract, Argent Chemical Lab., USA) hesap edilerek erkek damızlıklara sağımdan 12 saat önce 1 ml olarak tek enjeksiyon, dişi damızlıklara ise ilk enjeksiyondan 8 - 10 saat sonra 2.5 mg/kg oranında hesap edilerek iki enjeksiyon tarzında yapıldı. Enjeksiyonlar, pektoral yüzgeçlerden birinin altına yapıldı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Balıklara hipofiz enjeksiyonunun uygulanması.

Enjeksiyon işleminin ardından dişi balıkların sağım işlemi öncesi yumurtlamasını engellemek için anüslerine “X” şeklinde dikiş atıldı. Dişi ve erkek balıkların sağımı son enjeksiyondan 8 - 12 saat sonra yapıldı.

3.2.2. Balıklardan Spermanın Alınması

Sperması alınacak balıklar bir gün önceden toprak havuzlardan sağımın yapılacağı bölümdaki beton havuzlara alındı. Bu bölüme alınmalarından sonra yemlemeye son verildi. Sperma ve yumurta alınacağı gün balıklar 25 litrelik daha küçük bir tanka alındı (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Balıkların sedasyon için tutuldukları tank.

Sperma alma işlemi öncesi, erkek damızlık balıkların sedasyonunda karanfil yağı (Eugenol) kullanıldı. 1 ml Eugenol (Merck Chemical, Germany), 5 ml ethanolde çözdürüldü ve 50 µl/L dozunda balıkların suyuna karıştırıldı. Balıkların sedasyonlarından sonra sperma abdominal masaj yöntemi ile alındı. Bir yardımcı tarafından balıklar havuzdan çıkartıp sağımın yapılacağı üzeri suni deri ile kaplı sünger masada hazır halde bekleyen havlunun üzerine konulup abdomen kısmı boşluğa gelecek şekilde tutuldu. Öncelikli olarak balığın anüsü ve çevresi temiz bir havlu yardımıyla bulaşmayı engellemek için silinerek temizlendi. Sol elin baş ve diğer parmakları U şeklinde tutularak balığın karnına hafifçe bastırarak ve kranialden kaudale doğru sıvazlanarak sperma alma (sağılma) işlemi gerçekleştirildi (Şekil 3.4). Alınan spermalar, kuluçkahane içerisinde

spermatozoaların zarar görmemesi için direkt güneş ışığına kapalı olan sperma muayene odasına termos içerisinde (7 - 10 °C'de) nakledildi.



Şekil 3.4. Balıktan abdominal masaj yöntemi ile spermanın alınması.

3.2.3. Spermatojik Özelliklerin Belirlenmesi

3.2.3.1. Spermanın Makroskopik Muayenesi

3.2.3.1.1 Spermanın Miktarı

Alınan spermalarda sperma miktarı, dereceli cam mezürler ile ml olarak belirlendi.

3.2.3.1.2. Spermanın Rengi

Alınan spermalarda spermanın rengi, çıplak gözle ile sübjektif olarak belirlendi.

3.2.3.2. Spermanın Mikroskopik Muayenesi

3.2.3.2.1. Spermatozoa Motilitesi

Spermatozoa motilite tayini; buz aküleri üzerinde oluşturulan bir cam soğutma tablası (4 – 10 °C) kullanılarak belirlendi. Bu amaçla soğutma tablası üzerindeki lama pastör pipeti ile alınan spermadan küçük bir damla bırakıldı. Spermatozoa aktivasyonu için sperma damlasının üzerine pastör pipeti ile yaklaşık 2 - 3 damla %0.3'lük NaCl solüsyonu bırakıldı ve lamel kapatılarak hızla 200 büyütmede trinoküler faz kontrast mikroskopunda Tvedt ve ark. (2001) bildirdiği yöntemle % olarak belirlendi. Her bir sperma örneğinde üç farklı mikroskop sahasında belirlenen motilite değerlerinin ortalaması alınarak spermatozoa motilitesi tespit edildi.

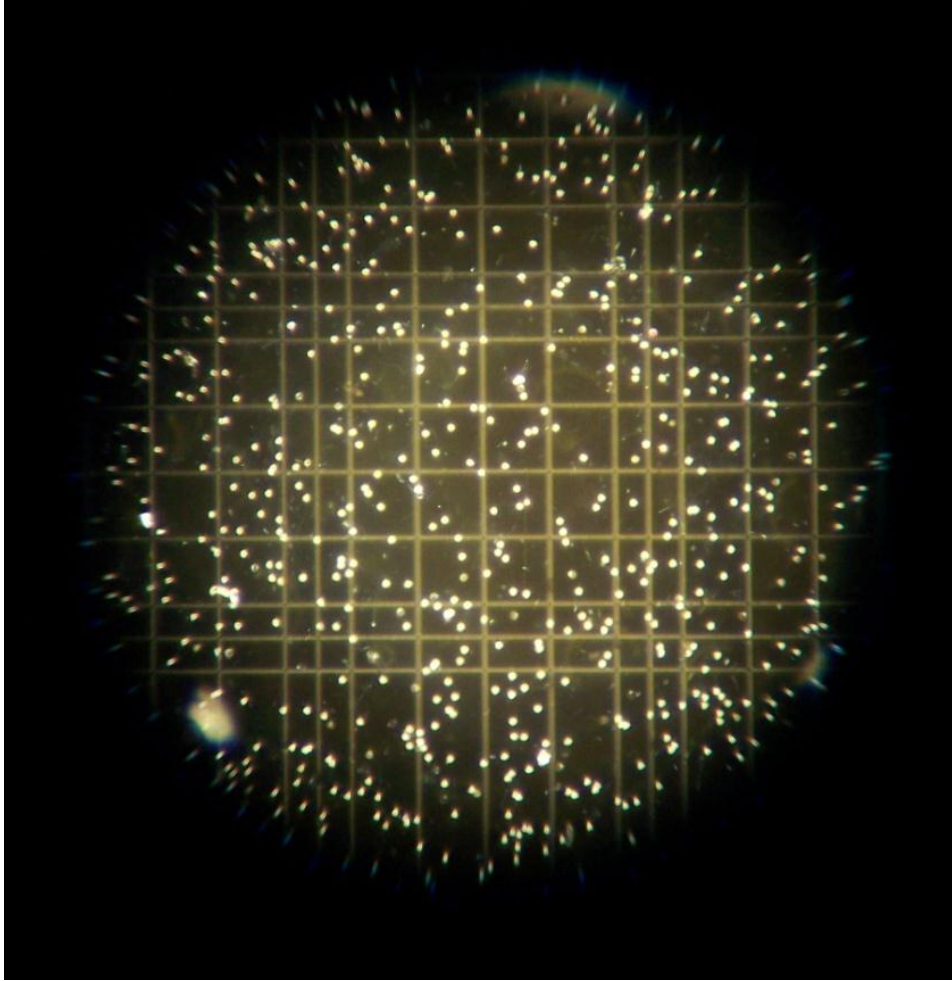
3.2.3.2.2. Spermatozoa Canlılık Süresi

Spermatozoa canlılık süresi, sperma alındıktan sonra küçük bir damla sperma örneği mikroskop üzerindeki lama bırakılıp, daha sonra aktivasyon solüsyonu (%0,3'lük NaCl) sperma üzerine ilave edildi. Hazırlanan preparatta spermatozoa hareketlilik süresi 200'lük büyütme ile izlenerek canlılık süresi hassas kronometre yardımıyla saniye olarak belirlendi.

3.2.3.2.3. Spermatozoon Yoğunluğu

Spermatozoon yoğunluğu hemositometrik yöntem ile belirlendi ve elde edilen veriler $\times 10^9/\text{ml}$ olarak ifade edildi. Alyuvar pipetinin 0.1 çizgisine kadar hayem (5 g Na_2SO_4 , 1 g NaCl, 0.5 g HgCl_2 , 200 ml distile su) solüsyonu çekilerek, 1/1000 oranında sulandırıldı. Alyuvar pipeti baş ve işaret parmağıyla tutularak 3 - 5 dakika hafif bilek hareketleri ile sallanarak spermanın homojen karışımı sağlandı. Pipetteki homojen karışımdan 2 - 3 damla pamuk yardımıyla alındıktan sonra, örnek önceden hazırlanan Thoma lamına bırakıldı. Thoma lamı 3 dakika kadar bekletildikten sonra 5 adet üst ve 5 adet alt olmak üzere toplam 10 karedeki spermalar sayıldı. Elde edilen değerler

formüldeki (Sayılan spermatozoa sayısı / Büyük kare alanı (10/25 mm²) x Büyük kare yüksekliği (1/10 mm) x Sulandırma derecesi (1/1000)) yerlere konarak spermatozoa yoğunluğu belirlendi (Şekil 3.6).



Şekil 3.5. Sazan spermatozoonlarının faz kontrast mikroskobu ile Thoma lamındaki görünümü.

3.2.3.3. Sperma pH' sının Belirlenmesi

Spermanın pH'sı pH ölçüm kağıtları ile belirlendi.

3.2.4. Spermmanın Sulandırılması

Spermmanın sulandırılmasında üç farklı sulandırıcı kullanıldı. Sulandırıcı I: 75 mmol/l NaCl, 70 mmol/l KCl, 2 mmol/l CaCl₂, 1 mmol/l MgSO₄, 20 mmol/l Tris, (pH: 8) (Lahnsteiner ve ark. 2000). Sulandırıcı II: 350 mM glukoz, 30 mM Tris (pH: 8) (Horvath ve ark. 2003). Sulandırıcı III: 300 mM glukoz, %10 yumurta sarısı, (pH: 4.5) (Tekin ve ark. 2003). Her sulandırıcıya kriyoprotektan olarak %10 oranlarında DMSO, DMA ve Gliserol ilave edilerek Sulandırıcı I DMSO, Sulandırıcı I DMA, Sulandırıcı I Gliserol, Sulandırıcı II DMSO, Sulandırıcı II DMA, Sulandırıcı II Gliserol, Sulandırıcı III DMSO, Sulandırıcı III DMA ve Sulandırıcı III Gliserol olmak üzere 9 farklı sulandırma solüsyonu hazırlandı. Sulandırma solüsyonları 8 - 12 °C'de buzdolabına bırakıldı.

Yüzde 85 ve üzerinde motilite oranına sahip olan 5 sperma numunesinden 3 ml alınarak toplam 15 ml sperma karışımı elde edildi. Sperma numunesinin 3 - 5 dakika hafif dairesel bilek hareketi ile homojen karışımı sağlandı. Sperma 8 - 12 °C'deki buzdolabına bırakıldı.

Spermmanın sulandırılması amacıyla hazırlanan üzeri etiketlenen 9 adet 5 ml'lik cam mezürlere sperma numunesinden 0.75 ml konuldu. Her sperma numunesi üzerine 1 ml'lik pipetlerle önceden belirlenen sulandırma solüsyonundan 2.25 ml kademeli olarak ilave edildi (1 kısım sperma : 3 kısım sulandırıcı). Böylece 9 farklı sulandırılmış sperma numunesi elde edildi. Sulandırılmış sperma numuneleri 45 dakika süre ile 8 - 12 °C'de ekulibrasyona bırakıldı. Ekulibrasyon işlemi tamamlandıktan sonra her bir sulandırılmış sperma numunesinin motilite oranı, canlılık süresi ve pH değerleri tespit edildi.

3.2.5. Spermmanın Dondurulması

Ekulibrasyon işleminden sonra her bir sulandırılmış sperma numuneleri farklı renklerdeki 0.25 ml'lik payetlere çekildi ve açık ucu Polivinil alkol (PVA) ile kapatıldı. Her bir sulandırılmış sperma numunesinden 12 adet payet hazırlandı. Payetlerin dondurulmasında boyu 21 cm, eni 16 cm ve yüksekliği 11.5 cm olan kapaklı strafor kutu kullanıldı. Strafor kutu içerisine payetler azot seviyesinin 3 cm üzerinde olacak raf oluşturuldu ve konulacak azot seviyesi işaretlendi. Dondurma işlemi öncesi strafor kutu

soğutuldu ve azot seviyesi kontrol edildikten sonra her gruba ait payetler raflara dizilerek kutunun kapağı kapatıldı ve 10 dakika süre ile sıvı azot buharında (-120 °C) donduruldu (Şekil 3.7). Dondurma işlemi sonrası payetler raflardan sıvı azot içerisine alındı ve 10 dakika burada bekletildi (-196 °C). Bu işlemin ardından payetler uzun bir pens yardımı ile farklı renklerdeki gobletlere yerleştirilerek sıvı azot tankına alındı ve burada depolandı (-196 °C).



Şekil 3.6. Spermanın dondurulmasında kullanılan strafor kutu.

3.2.6. Spermanın Çözdürülmesi

Payetlerden dondurulan spermanın çözündürme işlemi 30 °C'deki su banyosunda 20 saniyede gerçekleştirildi. Çözündürme işleminin hemen ardından tüm gruplarda spermanın motilitesi ve canlılık süresi belirlendi.

3.2.7. Dişi Balıklardan Yumurtaların Alınması

Dişi damızlık balıklara uygulanan ikinci hipofiz enjeksiyonundan 12 saat sonra eugenol ile anestezi edilen balıklardan yumurta abdominal masaj yöntemi ile kuru bir kap içerisine alındı. Alınan yumurtalar laboratuvara termos içinde (7 – 10 °C) nakledildi.

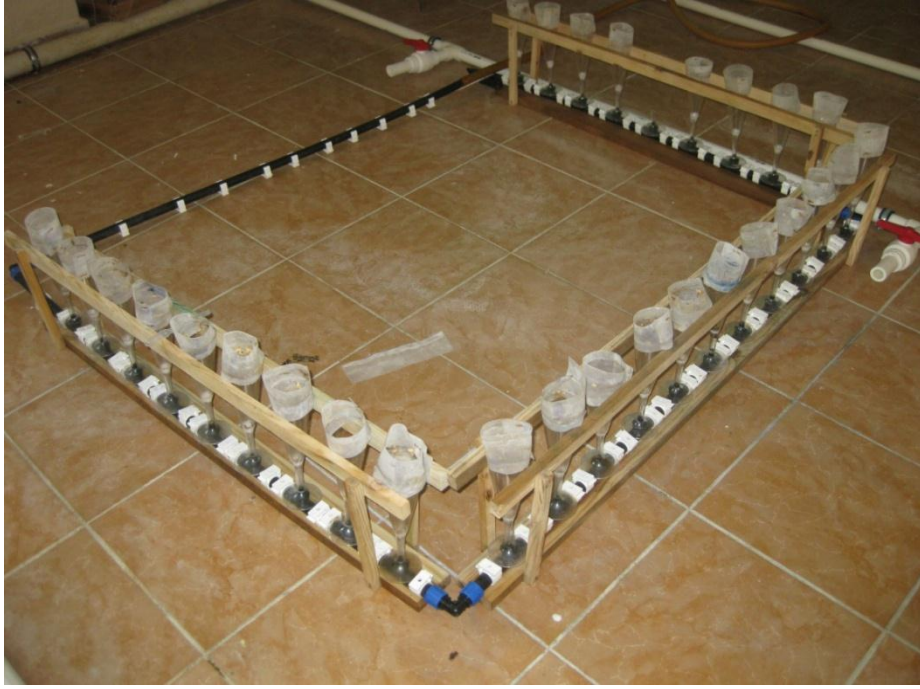
3.2.8. Fertilizasyonu ve İnkübasyon İşlemleri

Balıklardan kuru bir kaba sağılan yumurtalar, her bir grup için 3 tekrarlı olmak üzere toplam 27 porselen kap ve petri kutusuna dağıtıldı. Fertilizasyon işlemi için her bir deneme grubu için 500 adet yumurta kullanıldı. Fertilizasyon kuru dölleme tekniği ile yaklaşık tohumlama dozu toplam 1.7×10^6 spermatozoon/yumurta olacak şekilde gerçekleştirildi. Kısaca payetlerin çözdürülme işleminden hemen sonra sperma, porselen kap ve petrilerdeki yumurtalar üzerine bırakılarak 10 saniye kaz tüyü ile karıştırıldı ve üzerine 30 ml dölleme solüsyonu olarak Woynarovich solüsyonu (3 g üre, 4 g NaCl, 1 lt distile H₂O) ilave edilerek 30 dakika karıştırıldı (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Yumurtaların döllemesi ve dölleme solüsyonunda bekletilmesi.

Yumurtaların yapışkanlığının giderilmesi amacıyla 0.5 – 0.7 g/l oranında hazırlanan tannik asit solüsyonu kullanıldı. Tannik asit solüsyonu ile 10 dakikalık 3 - 4 işlemden sonra yumurtalar işletme suyu ile yıkandı. Fertilizasyon işlemi tamamlanan yumurtalar hazırlanan Zuger düzeneğine yerleştirildi ve inkübasyon periyodu boyunca 0.13 L/dk su debisi ile 20 – 22 °C su sıcaklığında yaklaşık 3 - 4 gün inkübasyonu sağlandı (Şekil 3.8). Fertilizasyon değerlendirilmesi; fertilizasyon işleminden 24 saat sonra her bir zuger şişesinden alınan 100'er adet yumurtanın mikroskop altında incelenmesi ile yapıldı (Şekil 3.9). Hücre bölünmeleri görülen yumurtaların döllendiği kabul edilerek fertilizasyon oranı yüzde (%) olarak hesaplandı (Bozkurt ve ark. 2005). İnkübasyon periyodu sonunda Zuger şişelerindeki yumurta ve larva sayısı dikkate alınarak her gruptaki larva çıkış oranı yüzde (%) olarak belirlendi (Bozkurt ve Seçer 2005)



Şekil 3.8. Çalışmada kullanılan Zuger düzeneği.



Şekil 3.9. Yumurtaların fertilizasyon aşamasındaki makroskobik görünümü.

3.2.9. Verilerin Değerlendirilmesi

Çalışmada, eküibrasyon sonrası ve dondurma-çözdürme sonrası motilite oranı ile canlılık süresi ve fertilizasyon oranlarına ait değerler için çalışma grupları arasındaki farklılığın önem kontrolü 2 yönlü varyans analizi ile yapıldı. Araştırmada verilerin analizinde sulandırıcı ve kriyoprotektanlar sabit faktör olarak kabul edildi ve farklılığı önemli olan gruplar Mann-Whitney U testi ile belirlendi. Tüm analizler SPSS 14.0 paket program kullanılarak yapıldı (Lisans no: 9869264).

4. BULGULAR

Çalışmada kullanılan 11 adet damızlık erkek pullu sazana (*Cyprinus carpio*) ait canlı ağırlık ve boyları Çizelge 4.1’de görülmektedir. Balıklarda canlı ağırlıklar en düşük 1170 g, en yüksek 3620 g, ortalama 1988 ± 608 g olarak, boyları ise en düşük 40 cm, en yüksek 58 cm, ortalama 47.81 ± 10.18 cm olarak tespit edildi.

Çizelge 4.1. Damızlık erkek pullu sazan balıklarında elde edilen canlı ağırlık ve boy ölçümleri

| Sıra No | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | Ortalama |
|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------------|
| Ağırlık (g) | 1170 | 1880 | 2510 | 1380 | 1925 | 3620 | 2215 | 2197 | 1806 | 1440 | 1725 | 1988±608 |
| Boy (cm) | 40 | 49 | 52 | 44 | 45 | 58 | 51 | 50 | 47 | 42 | 48 | 47.81±10.18 |

Taze spermada elde edilen sperma miktarı, sperma rengi, spermatozoa motilitesi, spermatozoon yoğunluğu ve sperma pH’sı Çizelge 4.2’de sunulmuştur. Sperma miktarı en düşük 4.5 ml, en yüksek 36.4 ml, ortalama 14.23 ± 22.16 ml, motilite oranı en düşük %70, en yüksek %90, ortalama 82 ± 7.27 , canlılık süresi en düşük 225 s, en yüksek 1200 s, ortalama 575.36 ± 624.63 s, spermatozoon yoğunluğu en düşük 9.3×10^9 /ml, en yüksek 14.5×10^9 /ml, ortalama $11.5 \pm 3 \times 10^9$ /ml ve pH en düşük 7.3, en yüksek 8.0, ortalama 7.7 ± 0.4 olarak tespit edildi. Balıklarda sperma rengi gözlemlenerek değerlendirildi ve anormal bir renge rastlanması. Sperma rengi tüm ejakulatlarda süt beyazı olarak belirlendi.

Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan pullu sazan balıklarına ait spermatolojik özellikler.

| Sıra | Miktar (ml) | Motilite (%) | Canlılık Süresi (sn) | Yoğunluk ($\times 10^9/\text{ml}$) | pH |
|----------|-------------------|---------------|----------------------|--------------------------------------|---------------|
| 1 | 7.3 | 90 | 225 | 14.2 | 7.9 |
| 2 | 11.2 | 70 | 327 | 10.1 | 7.7 |
| 3 | 36.4 | 80 | 342 | 9.3 | 8.0 |
| 4 | 4.5 | 90 | 620 | 14.5 | 7.9 |
| 5 | 11 | 80 | 330 | 10.9 | 7.7 |
| 6 | 27 | 90 | 540 | 11.0 | 8.0 |
| 7 | 10.1 | 85 | 1200 | 13.7 | 7.7 |
| 8 | 8 | 80 | 792 | 10.1 | 7.4 |
| 9 | 20 | 80 | 617 | 9.8 | 7.3 |
| 10 | 11 | 90 | 590 | 13.4 | 7.6 |
| 11 | 10.1 | 75 | 746 | 9.7 | 7.7 |
| Ortalama | 14.23 \pm 22.16 | 82 \pm 7.27 | 575.36 \pm 624.63 | 11.5 \pm 3 | 7.7 \pm 0.4 |

Çalışmada, dondurulma işlemi için motilitesi %85 ve üzeri olan ejakülatlar kullanıldı. Bu amaçla 1, 4, 6, 7 ve 10 sıra numaralı balıklara ait ejakülatlar eşit miktarlarda birleştirildikten sonra elde edilen 15 ml miksin spermatolojik muayenesinde motilite %80, canlılık süresi 780 s, yoğunluk $13.3 \times 10^9/\text{ml}$ ve pH 7.7 olarak tespit edildi.

Farklı sulandırıcı ve kriyoprotektan kullanılarak sulandırılan spermaların ekulibrasyon sonrası motilite, canlılık süresi, ve pH değerleri Çizelge 4.3'te görülmektedir. Yapılan değerlendirmelerde en yüksek motilite Sulandırıcı III DMSO grubunda (81.67 ± 1.66), en düşük motilite oranı ise Sulandırıcı I Gliserol (30.0 ± 5.77) grubunda elde edildi. Canlılık süresi en yüksek Sulandırıcı II DMSO (875 s) en düşük ise Sulandırıcı I Gliserol (131 sn) grubunda elde edildi. Çalışmada 3 temel sulandırıcıda da DMSO ilave edilen gruplarda canlılık sürelerinin en yüksek olduğu gözlemlendi. Ekulibrasyon sonrası Sulandırıcı I ve Sulandırıcı II de DMSO, DMA ve Gliserol ilave edilen gruplarda pH değerlerinin 8.3'ün üzerinde, Sulandırıcı III DMSO, DMA ve Gliserol gruplarında ise 6.3'ün altında olduğu belirlendi.

Çizelge 4.3. Farklı sulandırıcı ve kriyoprotektan kullanılarak sulandırılan spermaların ekulibrasyon sonrası motilite, canlılık süresi ve pH değerleri.

| Sulandırıcılar | Kriyoprotektan | Motilite (%) | Canlılık Süresi (sn) | pH |
|-----------------|----------------|--------------|----------------------|-----|
| Sulandırıcı I | DMSO | 63,33 ±3,33 | 748 | 8.3 |
| | DMA | 46,67 ±3,33 | 440 | 8.5 |
| | Gliserol | 30.0 ±5,77 | 131 | 8.3 |
| Sulandırıcı II | DMSO | 76,67 ±3,33 | 875 | 8.3 |
| | DMA | 76,67 ±3,33 | 623 | 8.5 |
| | Gliserol | 76,67 ±3,33 | 520 | 8.6 |
| Sulandırıcı III | DMSO | 81,67 ±1,66 | 714 | 6.3 |
| | DMA | 63,33 ±3,33 | 326 | 6.2 |
| | Gliserol | 63,33 ±3,33 | 584 | 6.0 |

Çalışma gruplarında ekulibrasyon işlemi sonrasında motilite değerlendirmeleri 3 kez tekrarlandı. Ancak uzun zaman alması nedeniyle spermanın canlılık süreleri tüm gruplarda bir kez yapılabildi. Bu nedenle ekulibrasyon işlemi sonrasında gruplar sadece motilite değerleri açısından karşılaştırıldı. Gruplarda ekulibrasyon sonrası motilite oranlarının karşılaştırılmasında Sulandırıcı I ile Sulandırıcı II ve Sulandırıcı I ile Sulandırıcı III arasındaki farklılıkların önemli ($P<0.001$) olduğu belirlendi (Çizelge 4.4). Ekilübrasyon sonrası motilite oranı üzerine kriyoprotektanların etkisinin bulunduğu, Sulandırıcı I ve Sulandırıcı III'e ilave edilen DMSO ile DMA ($P<0.001$) ve Gliserol ($P<0.001$) arasındaki farklılıkların önemli olduğu tespit edildi. Ayrıca, Sulandırıcı I ve Sulandırıcı III gruplarında, ekulibrasyon sonrası elde edilen motilite oranları üzerine hem sulandırıcıların hem de kriyoprotektanların etkisinin olduğu gözlemlendi ($P<0.01$).

Çizelge 4.4. Farklı sulandırıcı ve kriyoprotektan içeren çalışma gruplarında ekilübrasyon sonrası ortalama motilite değerleri.

| Motilite (%) | $\bar{x} \pm SEM$ | | | Sulandırıcı: $F=58.122$, $P<0.001$ Sulandırıcı I ve Sulandırıcı II arasında *** Sulandırıcı I ve Sulandırıcı III arasında *** |
|--------------|-------------------|----------------|-----------------|---|
| | Sulandırıcı I | Sulandırıcı II | Sulandırıcı III | |
| DMSO | 63.33 ±3.33 | 76.66±3.33 | 81.67±1.66 | Kriyoprotektan: $F=18.317$, $P<0.001$ DMSO ve DMA arasında *** DMSO ve Gliserol arasında *** Sulandırıcı x Kriyoprotektan: $F=6.244$, $P<0.01$ R Squared: 0.908 |
| DMA | 46.66 ±3.33 | 76.66±3.33 | 63.33±3.33 | |
| Gliserol | 30.00 ±5.77 | 76.66±3.33 | 63.33±3.33 | |

Çalışma gruplarında dondurma-çözdürme sonrası elde edilen ortalama motilite değerleri Çizelge 4.5’da görülmektedir. En düşük motilite değeri Sulandırıcı I DMSO (%10) ve DMA (%10) gruplarında, en yüksek motilite ise Sulandırıcı III DMSO (%40) grubunda elde edilmiştir. Dondurma çözdürme sonrası spermatozoa motilitesi üzerine sulandırıcıların etkisinin bulunduğu, Sulandırıcı I ile Sulandırıcı III arasında farklılığın önemli olduğu ($P<0.05$), ancak bu farklılığın oluşumunda kriyoprotektanların ya da sulandırıcı ile birlikte kriyoprotektanların etkisinin bulunmadığı gözlemlendi ($P> 0.05$).

Çizelge 4.5. Farklı sulandırıcı ve kriyoprotektan içeren çalışma gruplarında dondurma- çözdürme sonrası elde edilen ortalama motilite değerleri.

| Motilite (%) | $\bar{X} \pm SEM$ | | | Sulandırıcı: $F=5.780$, $P<0.05$ Sulandırıcı I ve Sulandırıcı III arasında* |
|--------------|-------------------|-------------------|------------------|---|
| | Sulandırıcı I | Sulandırıcı II | Sulandırıcı III | |
| DMSO | 10.00 \pm 0.00 | 30.00 \pm 10.00 | 40.00 \pm 5.77 | Kriyoprotektan: $F=0.512$, $P>0.05$ |
| DMA | 10.00 \pm 0.00 | 33.33 \pm 12.01 | 23.33 \pm 6.66 | Sulandırıcı x Kriyoprotektan: $F=1.354$, $P>0.05$ |
| Gliserol | 23.33 \pm 8.81 | 23.33 \pm 6.66 | 36.66 \pm 3.33 | R Squared: 0.500 |

Çalışmada elde edilen dondurma-çözdürme sonrası ortalama canlılık süreleri Çizelge 4.6’da görülmektedir. Ortalama canlılık süresi en yüksek Sulandırıcı II DMSO grubunda (106.67 \pm 43.33 s), en düşük ise Sulandırıcı I DMA grubunda (31.66 \pm 9.27 s) elde edilmiştir. Ancak, spermatozoa canlılık süreleri açısından gruplar arasında farklılığın önemli olmadığı tespit edildi ($P>0.05$).

Çizelge 4.6. Çalışma gruplarında dondurma - çözdürme sonrası elde edilen ortalama spermatozoa canlılık süreleri.

| Canlılık Süresi (s) | $\bar{X} \pm SEM$ | | | Sulandırıcı: $F=3.127$, $P>0.05$ Kriyoprotektan: $F=0.455$, $P>0.05$ |
|---------------------|-------------------|--------------------|-------------------|---|
| | Sulandırıcı I | Sulandırıcı II | Sulandırıcı III | |
| DMSO | 33.33 \pm 3.33 | 106.67 \pm 43.33 | 103.33 \pm 3.33 | Sulandırıcı x Kriyoprotektan: $F=0.543$, $P>0.05$ |
| DMA | 31.66 \pm 9.27 | 98.33 \pm 46.93 | 55.00 \pm 22.91 | R Squared: 0.342 |
| Gliserol | 62.33 \pm 23.77 | 80.00 \pm 36.05 | 93.33 \pm 6.66 | |

Araştırmada, her bir sulandırıcı kriyoprotektan grubu ile dondurma-çözdürme işleminden sonra 3 tekrarlı olarak yapılan fertilizasyon denemelerinde elde edilen fertilizasyon oranları Çizelge 4.7’de verilmiştir. Tüm gruplarda fertilizasyon oranları oldukça yüksek olmasına karşın, Sulandırıcı I ile Sulandırıcı II ve Sulandırıcı I ile Sulandırıcı III arasında farklılıkların önemli olduğu gözlemlendi ($P < 0.01$). Ancak bu farklılığın oluşumunda kriyoprotektanların ya da sulandırıcı ile birlikte kriyoprotektanların etkisinin bulunmadığı gözlemlendi ($P > 0.05$).

Çizelge 4.7. Çalışma gruplarında dondurma - çözdürme sonrası elde edilen ortalama fertilizasyon oranları.

| Fertilizasyon Oranı (%) | $\bar{X} \pm SEM$ | | | Sulandırıcı: $F=8.595$, $P < 0.01$ Sulandırıcı I ve Sulandırıcı II arasında ** Sulandırıcı I ve Sulandırıcı III arasında ** Kriyoprotektan: $F=0.310$, $P > 0.05$ Sulandırıcı x Kriyoprotektan: $F=1.238$, $P > 0.05$ R Squared: 0.558 |
|-------------------------|-------------------|------------------|------------------|--|
| | Sulandırıcı I | Sulandırıcı II | Sulandırıcı III | |
| DMSO | 96.00 \pm 1.00 | 99.00 \pm 0.57 | 98.66 \pm 0.33 | |
| DMA | 96.33 \pm 1.20 | 99.66 \pm 0.33 | 98.66 \pm 0.66 | |
| Gliserol | 98.00 \pm 1.00 | 98.66 \pm 0.33 | 98.33 \pm 3.33 | |

Çalışma gruplarında 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilen fertilizasyon işlemi takiben 4 ve 5. günlerde elde edilen larva çıkış oranları Çizelge 4.8’de görülmektedir. Araştırmada, Sulandırıcı I, II, III DMSO grupları ile Sulandırıcı I DMA ve Sulandırıcı III Gliserol gruplarında hiç larva çıkışı gözlenmedi. Sulandırıcı I Gliserol grubunda %1, Sulandırıcı II DMA grubunda %0.66, Sulandırıcı III DMA grubunda %10 larva çıkışı tespit edildi. Farklı sulandırıcı ve kriyoprotektan içeren çalışma gruplarında elde edilen larva çıkış oranlarının çok düşük olması ve 5 grupta hiç larva çıkışının olmaması nedeniyle istatistiksel karşılaştırma yapılamadı.

Çizelge 4.8. Çalışma gruplarında 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilen fertilizasyon işlemini takiben 4 ve 5. günlerde elde edilen larva çıkış oranları.

| Larva Çıkış Oranı (%) | | 1.Tekrar | 2.Tekrar | 3.Tekrar | Ortalama |
|-----------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Sulandırıcı I | DMSO | - | - | - | - |
| | DMA | - | - | - | - |
| | Gliserol | - | 1 | 2 | 1 |
| Sulandırıcı II | DMSO | - | - | - | - |
| | DMA | 2 | - | - | 0.66 |
| | Gliserol | 1 | 2 | - | 1 |
| Sulandırıcı III | DMSO | - | - | - | - |
| | DMA | 10 | 20 | - | 10 |
| | Gliserol | - | - | - | - |

5. TARTIŞMA

Araştırmada sperma miktarı; en yüksek 36.4 ml, en düşük 4.5 ml ve ortalama 14.23 ± 22.16 ml olarak belirlendi. Horvath ve Lukowicz (1982), üreme mevsimi boyunca sperma miktarının sazan balıklarında 10 - 20 ml, ot sazanında 10 - 20 ml, gümüş sazanında 5 - 15 ml, büyükbaş sazanda ise 10 - 12 ml arasında değiştiğini bildirmektedir. Akçay ve ark. (2002), 15 adet aynalı sazanda yaptığı çalışmada sperma miktarını en düşük 1 ml, en yüksek 40 ml olmak üzere ortalama 13.26 ± 2.51 ml olarak bildirmektedirler. Faramarzi (2012), gümüş sazanları üzerinde yaptığı çalışmada sperma miktarını 13.17 ± 5.39 ml olarak bildirmiştir. Tabakoğlu (2005), yaptığı çalışmada hormon enjeksiyonu yapılan ve yapılmayan iki ayrı grupta ölçtüğü sperma miktarını ortalama 9.67 ± 1.23 ml ve 3.59 ± 81 ml olarak kaydetmektedir. Yavaş ve Bozkurt (2011)'un ot sazanlarında sperma miktarını 7.6 ± 2.8 ml olarak belirtmektedirler. Ot sazanları üzerine yapılan başka bir çalışmada (Bozkurt ve ark. 2011), sperma miktarı 7.2 ± 0.4 ml olarak bildirilmektedir. Elde edilen bu değerler bazı araştırmacıların bulguları (Horvath ve Lukowicz 1982, Akçay ve ark. 2002, Faramarzi 2012) ile benzerlik, bazı araştırmacıların bulguları (Tabakoğlu 2005, Yavaş ve Bozkurt 2011, Bozkurt ve ark. 2011) ile farklılık arz etmektedir. Sazan balıkları mevsime bağlı olarak reproduktif etkinlik göstermektedir. Bireylerin gamet üretim ve verimi özellikle mevsimsel değişiklikler olmak üzere birçok etkene bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Benzer şekilde Zhukinskiy ve Alekseenko (1983)'nun, on beş adet damızlık sazan balığıyla yaptığı çalışmada sperma kalitesinin üreme mevsiminin ortasında en yüksek seviyede olduğunu belirtmekte ve bu dönemin öncesinde ve sonrasında ise sperma kalitesinin düştüğünü belirtmesi bu araştırmada elde edilen bulguları destekler özelliindedir. Büyükhatipoğlu ve Holtz (1984), sperma miktarı üzerinde yaş, sağım zamanı, sağım aralıkları ve dişi balık varlığının da önemli bir rol oynadığını kaydetmektedirler. Oluşan bu farklılıkların özellikle beslenme şartları, yaş, boy, ağırlık, beslenme, işletme suyunun yapısı, çevresel koşullar ve sperma alım yöntemlerindeki farklılıklara bağlı olarak şekillendiği düşünülmektedir.

Çalışmada pullu sazan spermasının renginin tüm balıklarda süt beyazı renginde olduğu tespit edildi. Süt beyazı rengi; Bozkurt (2004), Faramarzi (2012), Tabakoğlu (2005) ve Bozkurt ve ark. (2009)'nın yaptıkları çalışmalarda tespit ettikleri renk ile benzerlik

göstermektedir. Sperma renginin sazanlarda büyük çoğunlukla süt beyazdan krem rengine kadar değişebildiği ve bu renk değişiminin özellikle beslenme, çevre şartları ve hastalık etkileri ile meydana gelebileceği bildirilmektedir (Seçer 1998, Aas ve ark. 1991). Bu çalışmada elde edilen sperm rengi, önceki çalışmalarda belirtilen sperm renk aralığıyla uyum içerisinde olduğu gözlemlendi.

Bu çalışmada spermatozoa motilitesi en yüksek %90, en düşük %70 ve ortalama 82 ± 7.27 olarak belirlenmiştir. Araştırmada elde edilen motilite sonuçları araştırmacıların çalışmalarında (Linhart ve ark. 2000, Akçay ve ark. 2002, Warnecke ve Pluta 2003, Bozkurt 2004, Tabakoğlu 2005, Bozkurt 2006, Yavaş ve Bozkurt 2011, Bozkurt ve ark. 2011) bildirdikleri motilite değerleri ile benzer olduğu görüldü. Çalışmada elde edilen motilite oranı yapılan literatür taramalarında yalnızca Faramarzi (2012)'nin tespit ettiği motilite oranından yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Faramarzi (2012), gümüş sazanları üzerinde yaptığı çalışmada spermatozoa motilitesini %60 ile %75 arasında, ortalama %63.18 olarak kaydetmektedir. Bu farklılığın kullanılan aktivasyon solüsyonlarına, sulandırma oranlarına, damızlık balığa, beslenme, saklama koşullarına, çevresel faktörlere, yaşa ve çalışmanın yapıldığı zamana bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Araştırmada spermatozoonların canlılık süreleri en yüksek 1200 s, en düşük 225 s ve ortalama 575.36 ± 624.62 s olarak belirlendi. Aynalı sazanda yapılan benzer çalışmalarda canlılık sürelerini Bozkurt (2006) 552 s, Akçay ve ark. (2002) 517 ± 0.90 ve Bozkurt (2004) 360.16 ± 177.00 s olarak bildirmektedirler. Çalışmada elde edilen canlılık süreleri araştırmacıların bulguları ile uyumlu olduğu tespit edildi. Aynalı sazanlarda 18 - 21 °C'deki canlılık sürelerini Suzuki (1959) 30 saniye, Elster ve Mann (1952) 55 saniye, Musselius (1951) 60 saniye ve Perchec ve ark. (1993)'da 30 - 40 saniye olarak bildirmektedirler. Oluşan farklılıklar ortam sıcaklığı, aktivasyon solüsyonu, kullanılan sulandırma oranı, yaş ve çevresel faktörlere bağlanabilir. Düşük sıcaklığa sahip ortamda spermatozoa daha uzun süre hareketli kalırken, yüksek sıcaklığa sahip ortamlarda bu sürenin daha kısa olduğu ifade edilmektedir (Stoss 1983).

Araştırmada saptanan spermatozoa yoğunluğu en düşük 9.3×10^9 /ml, en yüksek 14.5×10^9 /ml, ortalama $11.5 \pm 3 \times 10^9$ /ml olarak tespit edilmiştir. Emri ve ark. (1998), üreme mevsimi boyunca sazanlarda spermatozoa yoğunluğunun $7 \pm 1 \times 10^9$ ile $14 \pm 2 \times 10^9$ /ml arasında değiştiğini, Lubzens ve ark. (1997) ise spermatozoa yoğunluğunun 5.6×10^9 ile

32.5 x10⁹/ml arasında değiştiğini ve ortalama 14.97 ±5.35 x10⁹/ml olduğunu belirtmektedirler. Faramarzi (2012), gümüş sazanları üzerinde yaptığı çalışmada spermatozoa yoğunluğunu 29.67 x10⁹/ml olarak tespit ettiğini belirtmiştir. Yavaş ve Bozkurt (2011)'un üreme doneminde ot sazanları üzerinde yaptıkları çalışmada spermatozoa yoğunluğunu 16.8 x10⁹/ml olarak kaydetmektedirler. Ot sazanları üzerine yapılan başka bir çalışmada (Bozkurt ve ark. 2011), spermatozoa yoğunluğunun 12.4 x10⁹/ml olarak bildirmektedir. Akçay ve ark. (2002), 15 adet aynalı sazanda spermatozoa yoğunluğunu en düşük 11.7 x10⁹/ml, en yüksek 24.625 x10⁹/ml olmak üzere ortalama 17.33 ±1.22 x10⁹/ml olarak belirtmektedirler. Araştırmada elde edilen ortalama spermatozoon yoğunluğu genel olarak literatür (Lubzens ve ark. 1997, Emri ve ark. 1998, Bozkurt ve ark. 2011, Yavaş ve Bozkurt 2011) verileri ile uyumlu olmakla birlikte, bazı araştırma (Faramarzi 2012, Akçay ve ark. 2002) bulgularıyla farklılık arz etmekteydi. Bu farklılıkların sulandırma oranı, yaş, üreme mevsimi ile değerlendirme yönteminin farklı olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Tabakoğlu (2005) yaptığı çalışmada boy büyüdükçe, toplam spermatozoa yoğunluğununda doğru orantıda arttığını bildirmiştir. Balık spermasının yoğun olması nedeniyle düşük sulandırma oranları sayım işlemini zorlaştırmakta ve yanılđı payını artırmaktadır.

Araştırmada saptanan sperma pH'sı en düşük 7.3, en yüksek 8.0, ortalama 7.7 ±0.4 olarak tespit edilmiştir. Sperm pH'sının ölçümünde, bazı araştırmacıların (Plouidy ve Billard, 1982, Kruger ve ark. 1984) yaptığı gibi pH indikatör kağıtları kullanılmıştır. Zhukinskij ve Bilko (1984), pH ölçümünü standart pH elektrodu ile yapmışlar ve değerin sazanlar için 7.85 ile 8.37 arasında olduğunu bildirmektedir. Akçay ve ark. (2002), 15 adet aynalı sazanda yaptığı çalışmada sperma pH'sını ortalama 8.06 ±0.08, Faramarzi (2012), gümüş sazanları üzerinde yaptığı çalışmada sperma pH'sını ortalama 7.59 ±0.74, Yavaş ve Bozkurt (2011)'un ot sazanları üzerinde yaptıkları çalışmada sperma pH'sını ortalama 7.2, ot sazanları üzerine yapılan başka bir çalışmada da (Bozkurt ve ark. 2011), sperma pH'sı ortalama 7.3 olarak tespit edildiği kaydedilmektedir. Çalışmada elde edilen sperma pH değerleri araştırmacıların bulgularıyla paralellik arz etmektedir.

Araştırmada sulandırma işlemini takiben ekulibrasyon sonrası saptanan motilite değerleri, en yüksek Sulandırıcı III DMSO grubunda (%81.67 ±1.66), en düşük motilite oranı ise Sulandırıcı I Gliserol (30.0 ±5.77) grubunda tespit edildi. Bozkurt ve ark. (2009),

ot sazanlarında yaptıkları çalışmada, sulandırıcı I ile 4 °C'de 2 saat sonrasında Mayıs, Haziran ve Temmuz aylarında motilite değerlerini sırasıyla %55 ±6.93, %60 ±2.3 ve %50 ±4.04 olarak, sulandırıcı III ile %65 ±4.04, %70 ±5.77 ve %55 ±4.04 olarak bildirmektedirler. Bozkurt (2004), aynalı sazanlarda sulandırıcı II'yi kullandığı çalışmasında spermatozoa motilitesini 4 °C'de 12 saat sonrasında Nisan, Mayıs ve Haziran aylarında sırasıyla %70.00 ±10.00, %70.00 ±10.00 ve %66.67 ±5.77 olarak tespit ettiğini bildirmektedir. Bozkurt ve ark. (2011), ot sazanı üzerinde yaptıkları çalışmada %10 gliserol ilave edilen sulandırıcılar ile 4 °C'de 30 dakika ekulibre edilmiş spermatozoa motilitesinin %70'in üzerine çıktığı ifade edilmektedir. Ekulibrasyon işlemi sürecinde kullanılan sulandırıcının bileşimi, sulandırma oranı, saklama sıcaklığı, saklama şartları ve ekulibrasyon süresinin uzamasına bağlı olarak spermatozoa zarar görebilmektedir. Ekulibrasyon sırasında ortaya çıkan en önemli değişiklikler hiç şüphesiz spermatozoa motilitesinde azalma ve spermatozoa'nın morfolojisinde meydana gelen bozulmalardır. Wayman ve ark. (1996)'a göre sulandırma oranını artırmanın motilite üzerinde pozitif bir etkisi bulunmaktadır. Oluşan farklılıkların çalışılan balık türünün, üreme periyodunun, kullanılan sulandırıcının ve kriyoprotektanların, sulandırma oranlarının, saklama sıcaklığının, saklama süresinin ve değerlendirme tekniklerinin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Araştırmada ekulibrasyon sonrası saptanan canlılık sürelerinde yapılan değerlendirmelerde, canlılık süresi en yüksek Sulandırıcı II DMSO (748 s) en düşük ise Sulandırıcı I Gliserol (131 s) grubunda elde edildi. Çalışmada 3 temel sulandırıcıda da DMSO ilave edilen gruplarda canlılık sürelerinin en yüksek olduğu gözlemlendi. Bozkurt ve ark. (2009), ot sazanı üzerinde sulandırıcı I ile yaptıkları çalışmada, sulandırma işleminden 2 saat sonra (4 °C) Mayıs, Haziran ve Temmuz aylarında canlılık sürelerini sırasıyla 124 ±6.93 s, 107 ±4.62 s ve 108 ±1.15 s olarak, sulandırıcı III ile 145 ±6.93 s, 215 ±2.88 s ve 126 ±5.19 s olarak tespit ettiklerini bildirmektedirler. Bozkurt (2004), aynalı sazanlarda sulandırıcı II ile yaptıkları çalışmada, sulandırma işleminden 12 saat sonra (4 °C) Nisan, Mayıs ve Haziran aylarında sırasıyla 425.00 ±113.08 s, 132.67 ±23.02 s ve 380.00 ±55.67 s olarak belirtmektedir. Oluşan farklılıkların çalışılan balık türünün, üreme periyodunun, kullanılan sulandırıcının ve kriyoprotektanın, sulandırma oranlarının, sperma saklama sıcaklığının, sperma saklama süresinin ve değerlendirme tekniklerinin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Araştırmada belirlenen pH, ekulibrasyon sonrası Sulandırıcı I ve Sulandırıcı II de DMSO, DMA ve Gliserol ilave edilen gruplarda pH değerlerinin 8.3 ün üzerinde, Sulandırıcı III DMSO, DMA ve Gliserol gruplarında ise 6.3'ün altında olduğu belirlendi. Bozkurt (2004), aynalı sazanlarda sulandırıcı II'yi kullandığı çalışmasında sulandırma işleminden 12 saat sonra (4 °C) pH'yı Nisan, Mayıs ve Haziran aylarında sırasıyla 7.16 ±0.28, 7.16 ve 7 olarak tespit ettiğini bildirmektedir. Oluşan bu farklılığın kullanılan sulandırıcı, kriyoprotektan, sperma saklama sıcaklığı ve sperma saklama süresinden kaynaklandığı düşünölmektedir.

Çalışma gruplarında dondurma-özdürme sonrası elde en düşük motilite değeri Sulandırıcı I DMSO (%10) ve DMA (%10) gruplarında, en yüksek motilite ise Sulandırıcı III DMSO (%40) grubunda elde edildi. Yavaş ve Bozkurt (2011)'un ot sazanları üzerinde yaptıkları çalışmada dondurma-özdürme sonrası sulandırıcı III ile %5 gliserol kullanılan spermada motilite değerini %72.3 ±2.6 olarak bildirmektedirler. Akçay ve ark. (2002), aynalı sazanda iyonik sulandırıcıya %15 DMSO, DMA ve gliserol ilave ederek yaptıkları çalışmada dondurma-özdürme sonrası sperma motilitesini kullandıkları iki ayrı sulandırıcı için sırasıyla %35, %10, %30 ve %60, %50, %40 olarak tespit ettiklerini kaydetmektedirler. Bozkurt ve ark. (2011), ot sazanı üzerinde yaptıkları çalışmada kullandıkları iyonik sulandırıcıya %10 gliserol ilave etmiş ve dondurulan payetleri 30 °C'de 10 saniyede özdürme sonrası en yüksek motilite değeri %85 olarak elde ettiğini bildirmektedirler. Akçay ve ark. (2004), aynalı sazanda yaptıkları çalışmada %15 DMSO ilave edilmiş iyonik sulandırıcı ile dondurulup-özdürölmüş spermaların motilitesinin %55 olarak belirtmektedirler. Bozkurt ve ark. (2005), aynalı sazanlarda yaptıkları çalışmada %15 DMA ilave edilmiş spermaların dondurma-özdürme sonrası motilitesinin %40.0 ±6.2 olarak belirtmektedirler. Oluşan bu farklılıkların spermanın dondurulma şekilleri, dondurma şartları, spermanın dondurma işlemi öncesi spermatolojik özellikleri, kullanılan kriyoprotektan ve sulandırıcı içerikleri, dondurulan spermanın hacmi, sperma özdürme ısı ve özdürme süresine bağlı olarak şekillendiği düşünölmektedir.

Çalışmada elde edilen dondurma-özdürme sonrası ortalama canlılık süresi en yüksek Sulandırıcı II DMSO grubunda (106.67 ±43.33 s), en düşük ise Sulandırıcı I DMA grubunda (31.66 ±9.27 s) elde edilmiştir. Akçay ve ark. (2002), aynalı sazanda iyonik sulandırıcıya %15 DMSO, DMA ve gliserol ilave ederek yaptıkları çalışmada dondurma-

çözdürme sonrası spermatozoa canlılık süresini kullandıkları iki ayrı sulandırıcı için sırasıyla 78 s, 10 s, 120 s ve 250 s, 183 s, 190 s olarak kaydetmektedirler. Bozkurt ve ark. (2011), ot sazanı üzerinde yaptıkları çalışmada kullandıkları sulandırıcıya %10 gliserol ilave etmiş ve dondurulan payetleri 30 °C'de 10 saniyede çözdürmüşler ve çalışma sonucunda iki ayrı sulandırıcı için buldukları canlılık sürelerini 28 s ve 37 s olarak tespit ettiklerini bildirmektedir. Bozkurt ve ark. (2005), aynalı sazanlarda yaptıkları çalışmada %15 DMA ilave edilmiş spermaların dondurma-çözdürme sonrası spermatozoa canlılık süresini 147.1 ± 11.3 s olarak tespit etmişlerdir. Oluşan bu farklılıkların sulandırma oranlarına, ekulibrasyon süresine, dondurma işlemine, spermanın dondurma işlemi öncesi spermatolojik özellikleri, kullanılan kriyoprotektan ve sulandırıcı içeriklerine, dondurulan spermanın hacmine, çözdürme ısısı ve çözdürme süresine bağlı olarak şekillendiği düşünülmektedir.

Araştırmada, her bir sulandırıcı kriyoprotektan grubu ile dondurma-çözdürme işleminden sonra olarak yapılan fertilizasyon denemelerinde elde edilen fertilizasyon oranları en yüksek Sulandırıcı II DMA grubunda ($\%99.66 \pm 0.33$), en düşük ise Sulandırıcı I DMSO grubunda ($\%96.00 \pm 1.00$) elde edildi. Bozkurt ve ark. (2011), ot sazanı üzerinde yaptıkları çalışmada fertilizasyon oranını ortalama $\%95.63 \pm 0.52$ olarak, Yavaş ve Bozkurt (2011) ise $\%64.2 \pm 3.6$ olarak bildirmektedirler. Bozkurt ve ark. (2005), aynalı sazanlarda yaptıkları çalışmada buldukları fertilizasyon oranını ortalama $\%28.2 \pm 2.5$ olarak kaydetmektedirler. Cognie ve ark. (1989), adi sazanda yaptığı çalışmada kriyoprotektan olarak gliserol ve DMSO ilave edilerek dondurulmuş spermanın çözdürme sonrası fertilizasyon oranını sırasıyla %30 ve %40 olarak bildirmektedirler. Zhang and Liu (1991), ot sazanı spermasına glikoz ve DMSO ilave edilerek dondurup çözdürdükleri spermanın fertilizasyon oranını %73.8 olarak kaydetmektedirler. Çalışmada elde edilen fertilizasyon oranı Bozkurt ve ark. (2011) bildirdiği oranlara benzer, diğer araştırmacıların bulgularından yüksek olduğu tespit edildi. Oluşan bu farklılıkların sulandırma oranlarına, spermanın dondurulma yöntemine, dondurma işlemi öncesi spermatolojik özelliklerine, kullanılan kriyoprotektan ve sulandırıcı içeriklerine, dondurulan spermanın hacmine, çözdürme ısısına ve çözdürme süresine bağlı olarak şekillendiği düşünülmektedir.

Araştırmada, Sulandırıcı I, II, III DMSO grupları ile Sulandırıcı I DMA ve Sulandırıcı III Gliserol gruplarında hiç larva çıkışı gözlenmedi. Sulandırıcı I Gliserol

grubunda %1, Sulandırıcı II DMA grubunda %0.66, Sulandırıcı III DMA grubunda %10 larva çıkışı tespit edildi. Çalışmada tüm deneme gruplarında fertilizasyon oranı oldukça yüksek elde edilmesine karşın, larva çıkışlarında başarı sağlanamaması fertilizasyondan sonra embriyonik gelişimin belirli bir safhadan sonra devam etmediğini göstermektedir. Embriyonik gelişimin belirli bir safhadan sonra devam etmemesinin muhtemel nedeninin, spermanın dondurma işlemi sırasında gördüğü DNA hasarları ile ilgili olabileceğini düşündürmektedir (Yıldız ve ark. 2007, Yıldız ve ark. 2010).

6. SONUÇ

Çalışmada, üç farklı sulandırıcı ve kriyoprotektan içeren sulandırma solüsyonları ile sulandırılıp dondurulan pullu sazan spermasında;

1. Araştırmada kullanılan damızlık pullu sazan spermasının spermatolojik özelliklerinin fizyolojik sınırlar içerisinde olduğu gözlemlendi,

2. Eküibrasyon işlemi sonrası en yüksek motilite değerleri Sulandırıcı III DMSO grubunda, en düşük ise Sulandırıcı I Gliserol grubunda, en yüksek spermatozoa canlılık süre Sulandırıcı II DMSO, en düşük ise Sulandırıcı I Gliserol grubunda elde edildi. Eküibrasyon sonrası spermatozoa motilitesi üzerine sulandırıcıların, kriyoprotektanların ve sulandırıcı ile birlikte kriyoprotektanların birlikte etkisinin olduğu görüldü,

3. Dondurma ve çözme sonrası en yüksek motilite oranı Sulandırıcı III DMSO grubunda, en düşük motilite oranları ise Sulandırıcı I DMSO ve DMA gruplarında elde edildi. Çözme sonu motilite oranı üzerine sulandırıcının etkisinin bulunduğu tespit edildi.

4. Dondurma ve çözme sonrası spermatozoa canlılık süresi en yüksek Sulandırıcı II DMSO grubunda, en düşük ise Sulandırıcı I DMA grubunda elde edildi. Ancak gruplar arasında farklılık gözlemlenmedi,

5. Dondurulan sperma ile yapılan fertilizasyon işlemi sonucunda, fertilizasyon oranı en yüksek Sulandırıcı II DMA grubunda, en düşük ise Sulandırıcı I DMSO grubunda elde edildi. Gruplar arasında farklılıkların oluşumunda sulandırıcı etkisinin olduğu gözlemlendi.

6. Dondurulup çözümlenen sperma ile yapılan fertilizasyon işlemlerinde tüm deneme gruplarında fertilizasyon oranı oldukça yüksek olmasına karşın, larva çıkışlarında başarı sağlanamadı.

Çalışmada elde edilen sonuçlara göre, pulla sazan sperması ile ileride yapılacak araştırmalarda aşağıda belirtilen önerilerin dikkate alınması gerektiği kanaatine varılmıştır.

1. Dondurma çözdürme sonrası yüksek motilite ve canlılık sürelerine sahip gruplardaki fertilizasyon oranı ile düşük motilite ve canlılık süresine sahip gruplardaki fertilizasyon oranlarının benzer olması, payetlere konulan spermatozoon sayısı ile ilgili olabilir.

2. Çalışmada payetlere fazla sayıda spermatozoon konulması düşük motilite ve canlılık sürelerindeki olumsuzlukları engellediği kanaatine varılmıştır. Dolayısıyla payetlere konulan sperma dozu düşürülerek yapılacak araştırmalarda sulandırıcı ve kriyoprotektan etkisinin ortaya konulması gerekmektedir.

3. Çalışmada tüm deneme gruplarında larva çıkışlarında başarı sağlanamamasının nedenlerini ortaya koyacak çalışmalara ihtiyaç olduğu görölmüştür. Bu amaçla araştırmada kullanılan sulandırıcı ve kriyoprotektan kombinasyonları ile yapılacak sulandırma ve dondurma çalışmalarının her aşamasın spermanın morfolojik muayenesi ve DNA analizlerinin yapılması yararlı olacaktır.

4. Dondurulmuş sperma ile yapılacak fertilizasyon işlemi sonrası embriyonik gelişim aşamalarının değerlendirileceği araştırmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Böylece embriyonik gelişimin hangi aşamada durduğu ve bunun nedenlerinin ne olduğu ortaya konulmalıdır.

5. Dondurulup çözdürülen balık sperması ile yapılan araştırmalarda embriyonik gelişimin devam etmemesinin muhtemel bir nedeni olarak polispermi araştırılmalıdır.

7. KAYNAKLAR

1. **Aas GH, Refstie T, Gjerde B.** Evaluation of milt quality of atlantic salmon, *Aquaculture*, **1991**, s. 95: 125-132.
2. **Akçay E, Bozkurt Y, Kayam S.** Cryopreservation of mirror carp (*Cyprinus carpio* L. 1758) semen: with emphasis on post-thaw motility. 1st International Congress on Aquaculture, Fisheries Technology and Environmental Management. ECEP - Athens, Greece, 8-10 June **2002**. s. 5.
3. **Akçay E, Bozkurt Y, Seçer S, Tekin N.** Cryopreservation of Mirror Carp Semen. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, **2004**, 28 (5): 837-843.
4. **Akçay E, Tekin N, Seçer S.** Balık spermasının prezervasyonu. *Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Dergisi*, **1995**, 12 (3-4): 367-373.
5. **Aral F, Şahinöz E, Doğu, Z, Demirkol R.** Atatürk Baraj Gölü'ndeki *Carasobarbus luteus* (Heckel, 1843)'un Spermatolojik Özelliklerinin Belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi, Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, **2004**, Cilt II, Sayı XII, 72-77.
6. **Atay D.** *İçsu Balıkları ve Üretim Tekniği*. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara, **1987**, No:1035. s. 467.
7. **Bakos J.** Fish Propagation Hatchery Techniques and Broodstock Management. Hungary, **1995**, WES/226. s.120.
8. **Billard R.** Artificial Insemination and Gamete Management. *Mar. Behav. Physiol*, **1988**, s. 14: 1-21.
9. **Billard, R.** Reproduction in rainbow trout: sex differentiation , dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes. *Aquaculture*, **1992**, 100; 263-298.
10. **Billard R, Cosson MP.** *Controls of Sperm Motility*. The Energetics of Sperm Motility. CRC Press, Boca Raton, Florida, **1990**, s. 153-173.
11. **Billard R, Cosson MP.** Some Problems Related to the Assesment of Sperm Motility in Freshwater Fishes. *Journal of Experimental Zoology*, **1992**, s. 261; 122-131.
12. **Bozkurt Y.** Aynalı Sazan (*Cyprinus caprio* L. 1758) Spermasının Bazı Spermatolojik Özelliklerinin Belirlenmesi ve Farklı Sulandırıcılar ile Kısa Süreli Saklanması Değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2004**.
13. **Bozkurt Y.** Relationship Between Body Condition and Spermatological Properties in Scaly Carp (*Cyprinus carpio*) Semen, *J. Anim. Vet. Adv.*, **2006**, s. 5: 412-414.
14. **Bozkurt Y, Seçer S.,** Aynalı Sazan (*Cyprinus Carpio*) Balıklarında Spermatolojik Özelliklerin Üreme Mevsimi Boyunca Bireysel Olarak Değişimi, *Türk Sucul Yaşam Dergisi*, **2005**, Yıl III, Sayı IV, 485-489.
15. **Bozkurt Y, Seçer S.** Aynalı Sazan (*Cyprinus carpio*) Balıklarında Üreme Mevsimi Boyunca Spermatolojik Özelliklerin Belirlenmesi. *E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, **2006**, Volume 23, Suppl. (1/2): 195-198.
16. **Bozkurt, Y, Akçay E, Tekin N, Seçer S.** Effect of Freezing Techniques, Extenders and Cryoprotectants on the Fertilization Rate of Frozen Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Sperm. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, **2005**, 57 (2): 125-130
17. **Bozkurt Y, Öğretmen F, Seçer FS.** Effect of Different Extenders and Storage Periods on Motility and Fertilization Success of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) Sperm During Spawning Season. *Ankara Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, **2009**, 15 (3) 277-284.
18. **Bozkurt Y, Yavaş İ, Öğretmen F, Sivışgil B, Karaca F.** Effect of Glycerol on Fertility of Cryopreserved Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) Sperm. *The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*, **2011**, IIC:63.2011.635, 6 pages
19. **Bromage NR, Roberts RJ.(EDS)**, *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Blackwell Science Ltd., Oxford, England, **1995**, 424 pp.
20. **Büyükhatipoğlu S, Holtz W.** Sperm Output in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) Effect of Age, Timing and Frequency of Stripping and Presence of Females, *Aquaculture*, **1984**, s. 37: 63-71.
21. **Cabrera E, Robles V, Herráez P.** *Methods in Reproductive Aquaculture Marine and Freshwater Species*, CRC Press, Boca Raton, London, **2009**, s 1-532.
22. **Cabrera E, Sarasquete C, Martinez-Paramo S, Robles V, Beirao J, ve ark.** Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *J. Appl. Ichthyol.* **2010**, s. 26: 623-635.
23. **Cognie F, Billard R, Chao NH.** La Cryoconservation de la Laitance de la Carpe, *Cyprinus carpio*. *J. Appl. Ichthyol.*, **1989**, s. 5: 165-176.

24. **Çağltay F.** *İçsu Balıkları Yetiştiriciliği*, . Nobel Kitapevleri, Adana, **2007**.
25. **Çelikkale S.** *İçsu Balıkları ve Yetiştiriciliği*. Karadeniz Teknik Üniversitesi Sürmene Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Yüksekokulu, Trabzon, **1988**, No.3.
26. **Çelikkale S.** *Balık Biyolojisi*. Karadeniz Teknik Üniversitesi Sürmene Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Yüksekokulu, Trabzon, **1991**, Yayın No:101, s. 387.
27. **Çoyan K.** (Ed.) *Evcil Hayvanlarda Dölerme ve Suni Tohumlama*. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayın Ünitesi, Konya, **2002**.
28. **Deveciyan K.** *Türkiye'de Balık ve Balıkçılık*, 2. Baskı, Aras Yayıncılık, İstanbul, Türkiye, **2006**.
29. **Elster J, Mann H.**, Weitere Untersuchungen Über Die Physiologie Der Befruchtung Und Die Zuordnung Der Gameten Bei Fischen. *Arch Hydrobiol Suppl*, **1952**, s. 20: 267-276.
30. **Emre Y.** *Sazan yetiştiriciliği*. T.C. Başbakanlık Güneydoğu Anadolu Projesi Bölge Kalkınma İdaresi Başkanlığı, **2004**.
31. **Emri M, Marian T, Tron L, Balkay L, Krasznai Z.** Temperature Adaptation Changes Ion Concentrations in Spermatozoa and Seminal Plasma of Common Carp Without Affecting Sperm Motility. *Aquaculture*, **1998**, s. 167; 85-94.
32. **FAO.** The state of fisheries and agriculture 2010, **2011**, Rome.
33. **Faramarzi M.** Assessment of Reproductive Parameters in Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *World Journal of Fish and Marine Sciences*, **2012**, s. 4 (3): 244-248.
34. **Gallis JL, Fedrigo E, Jatteau P, Bonpant E, Billard R.** In: *Acipenser Actes du premier colloque international sur le Sturgeon*. Cemagref Publishers, Bordeaux, France, **1991**, pp. 143–151.
35. **Geldiay R, Balık S.** *Türkiye Tath su Balıkları*. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, İzmir, **1999**, Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları No:46, Ders Kitabı Dizini No:16., s. 532.
36. **Gjerde B.** Variation in Semen Production of Farmed Atlantic Salmon and Rainbow Trout. *Aquaculture*, **1984**, s. 40: 109-114.
37. **Gorda S.** *Frozen Gene Bank*. Fish Genetics for Hatchery Managers-Teaching Material, University of Chanto, Faculty of Fisheries, Chanto, Vietnam, **1995**, s. 166-181.
38. **Hatipoğlu T, Akçay E.** Fertilizing Ability of Short-term Preserved Spermatozoa Abant Trout (*Salmo trutta abanticus* T, 1954), *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, **2010**, s. 57: 33-38.
39. **Honeyfield DC, Krise WF.** *Cryopreservation in Aquatic species*. Measurement of Milt Quality and Factors Affecting Viability of Fish Spermatozoa. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, **2000**, pp 49-58.
40. **Horváth Á, Miskolczi E, Urbányi B.** Cryopreservation of common carp sperm. *Aquat Living Resour*, **2003**, s. 16, 457.
41. **Horvath L, Lukowicz M.** Tables with Data of Hatchery Procedures and Rearing Process of Some Bred Warm Water Fishes, *Aquacultura Hungarica*, **1982**, vol. III, s. 212-219.
42. **Jamieson BGM.** *Fish Evolution and Systematics: Evidence from spermatozoa*. Cambridge University Press, England, **1991**.
43. **Kopeika E, Kopeika J, Zhang T.** *Cryopreservation and Freeze-drying Protocols*. Cryopreservation of Fish Sperm. 2th. Ed., Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, **2007**, s. 203-218.
44. **Krasznai Z, Marian T, Balkay L, Gasper RJr veTron L.** Potassium Channels Regulate Hypo-osmotic Shock-induced Motility of Common Carp, *Cyprinus carpio*, Sperm, *Aquaculture*, **1995**, s. 129: 123–128.
45. **Kruger JCW, Smit GL, Van Vuren JHJ, Ferreira JT.** Some Chemical and Physical Characteristics of the Semen of *Cyprinus carpio* L. and *Oreochromis mossambicus* (Peters), *J. Fish Biology*, **1984**, s. 24: 263-272.
46. **Lahnsteiner F, Berger B, Horváth A, Urbanyi B, Weismann T.** Cryopreservation of Spermatozoa in Cyprinid Fishes, *Theriogenology*, **2000**, s. 54: 1477-1498.
47. **Lahnsteiner F, Berger B, Weismann T, Patzner RA.** Determination of Semen Quality of the Rainbow Trout by Sperm Motility, Seminal Plasma Parameters and Spermatozoal Metabolism, *Aquaculture*, **1998**, s. 163: 163-181.
48. **László H, Gizella T, Chris S.** *Carp and Pond Fish Culture*, 2th Ed., Fishing New Books, USA, **2002**.
49. **Linhart O, Rodina M, Cosson J.** Cryopreservation of Sperm in Common Carp *Cyprinus carpio* : sperm motility and hatching success of embryos, *Cryobiology*, **2000**, s. 41: 241-250.
50. **Loir M.** Interstitial Cells from the Testis of the Trout in Vivo and in Primary Culture. *Cell and Tissue Research*, **1990**, s. 261, P. 133-144.
51. **Lubzens E, Daube N, Pekarsky I, Magnus Y, Cohen A, ve ark.** Carp (*Cyprinus carpio* L.) Spermatozoa Cryobanks- strategies in Research and Application, *Aquaculture*, **1997**, s. 155: 13-30.

52. **MEGEP** (T.C. Milli Eğitim Bakanlığı, Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi). Denizcilik, Balıklar. T.C. Milli Eğitim Bakanlığı, **2006**, Ankara.
53. **Mongkonpunya, K., T. Pupipat and T.R. Tiersch**, 2000. Cryopreservation of sperm of Asian catfishes including the Endangered Mekong Giant Catfish. In: Cryopreservation in Aquatic Species. Tiersch, T.R. and P.M. Mazik, Editors. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, 2000. p. 108-116.
54. **Morisawa M, Suzuki K, Morisawa S**. Effects of Potassium and Osmolality on Spermatozoon Motility of Salmonid Fishes, *The Journal of Experimental Biology*, **1983**, s. 107: 105-113.
55. **Morisawa S, Morisawa M**. Acquisition of Potential for Sperm Motility in Rainbow Trout and Chum Salmon, *The Journal of Experimental Biology*, **1986**, s. 126: 89- 96.
56. **Munkittrick KR, Moccia RD**. Advances in the Cryopreservation of Salmonid Semen and Suitability for a Production Scale Artificial Fertilization Program, *Theriogenology*, **1984**, s. 21: 645-659.
57. **Musselius VA**. How to Store Carp Milt and to Determine its Quality, **1951**, s. 27: 51-53.
58. **Özgöray ED, Akçay E**. Deniz Balıklarında Sperma, Yumurta ve Embriyo Dondurulması (Derleme), *Lalahan Hay. Arast. Enst. Derg.*, **2010**, s. 50 (1) 53-64.
59. **Perchev G, Chauvaud L, Suquet M, Cosson J, Andre F ve ark**. Evulation des Carecteristiques du Mouvement et de la Teneur en ATP au Cours de la Periode de Mobilite des Spermatozoides de Carpe et de Turbot ,Poissons Teleosteens, *C.R. Acad. Agric.*, **1993**, s. 79: 117-126.
60. **Piironen J**. Variation in the Properties of Milt from the Finnish Landlocked Salmon (*Salmo salar* *Salmo salar* m. sebago Girard) During a Spawning Season, *Aquaculture*, **1985**, s. 48: 337-350.
61. **Plouidy MG, Billard R**. The Chemical Composition of the Companion Fluids of the Gametes in the Common Carp (*Cyprinus carpio*). Reproductive Physiology of Fish, Proc. Int. Symp. PUDOC, Wageningen, Netherlands, **1982**, s. 134.
62. **Rana KJ, Gilmour A**. Cryopreservation of Fish Spermatozoa: effect of cooling methods on the reproducibility of cooling rates and viability. Refrigeration and Aquaculture Conference. Bordeaux, France, 20-22 March **1996**, s. 3-12.
63. **Rurangwa E, Kime DE, Ollevier F, Nash JP**. The Measurement of Sperm Motility and Factors Affecting Sperm Quality in Cultured Fish, *J.Aquac.*, **2004**, s. 234: 1-28.
64. **Sarıhan E, Tekelioğlu N**. *Balık Üretimi*. 5. Baskı, Nobel Kitapevleri, Adana, **2005**.
65. **Seçer S**. Su Ürünleri ve Balık Yetiştiriciliği, *Ankara Bölgesi Veteriner Hekimler Odası Üretim Dergisi*, **1998**, s. 5-6; 26-42.
66. **Stoss J**. *Fish Physiology*. Fish Gamete Preservation and Spermatozoon Physiology. Academic Press, New York, USA, **1983**, s. 305-350.
67. **Suquet M, Dorange G, Omnes MH, Normant Y, Le Roux A ve ark**. Composition of the Seminal Fluid and Ultrastructure of the Spermatozoon of Turbot (*Scophthalmus maximus*), *Journal of Fish Biology*, **1993**, s. 42: 509-516.
68. **Suquet M, Omnes MH, Normant Y, Fauvel C**. Influence of Photoperiod, Frequency of Stripping and Presence of Females on Sperm Output in Turbot (*Scophthalmus maximus*, L.). *Aquaculture and Fisheries Management*, **1992**, s. 23: 217-225.
69. **Suzuki R**. Sperm Activation and Aggregation During Fertilization in Some Fishes :III Non Species Specificity of Stimulating Factör, *Anot Zool Jap.*, **1959**, s. 32: 105 - 111.
70. **Tabakoğlu ŞS**. Hipofiz Uygulanmış ve Uygulanmamış Farklı Boy Gruplarına Ait Aynalı Sazan (*Cyprinus carpio*)'ların Sperm Kalitelerinin İncelenmesi. Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, **2005**.
71. **Tekelioğlu N**. *İç Su balıkları Yetiştiriciliği*. Nobel Kitapevleri, Adana, **2005**.
72. **Tekin N, Seçer S, Akçay E, Bozkurt Y**. Cryopreservation of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Semen, *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, **2003**, s. 55 (3): 208-212.
73. **TÜİK**. T.C. Türkiye İstatistik Kurumu Başkanlığı, Haber Bülteni, 20/07/2012, sayı:10863.
74. **Tvedt HB, Benfey TJ, Martin-Robichaud DJ, Power J**. The Relationship Between Sperm Density, Spermocrit, Sperm Motility and Fertilization Success in Atlantic Halibut, Hippoglossus Hppoglossus, *Aquaculture*, **2001**, s. 194: 191-200.
75. **Wikipedia**, 2012. Balık. Erişim: <http://tr.wikipedia.org/wiki/Bal%C4%B1k>. Erişim tarihi: 29.07.2012
76. **Warnecke D, Pluta HJ**. Motility and Fertilizing Capacity of Frozen / Thawed Carp (*Cyprinus carpio*) Sperm Using Dimethyl-acetamide as the Main Cryoprotectant, *Aquaculture*, **2003**, s. 215: 167-185.
77. **Wayman WR, Thomas RG, Tiersch TR**. Cryopreservation of Sperm of Spotted Seatrout (*Cynoscion nebulosus*), *Gulf Research Reports*, **1996**, 9 (3): 183-188.

78. **Weil C.** La Fonction Gonadotrope de l'Hypophyse au Cours du Cycle Sexuel Chez Deux Poissons Teleosteens, la Carpe Commune (*Cyprinus carpio*) et la Truite Arc-enciel (*Salmo gairdneri*); Son Controle par l'Hypothalamus, les Gonades et les Facteurs Externes, *These d'Etat*, **1980**, s. 250.
79. **Woynarovich E, Horvath L.** The Artificial Propagation of Warm-water Finfishes: A manuel for extension. *FAO Fisheries Technical Paper*, **1980**, No: 201.
80. **Yavaş I, Bozkurt Y.** Effect of Different Thawing Rates on Motility and Fertilizing Capacity of Cryopreserved Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) Sperm, *Biotechnol, Equip.*, **2011**, s. 25: 2254-2257.
81. **Yıldız C, Law N, Ottaviani P, Jarvi K, McKerlie C.** Comparison of Sperm Quality and DNA Integrity in MouseSperm Exposed to Various Cooling Velocities and Osmotic Stress, *Theriogenology*, **2010**, s. 74: 1420-1430.
82. **Yıldız C, Ottaviani P, Law N, Ayearst R, Liu L ve ark.** Effects of Cryopreservation on Sperm Quality, Nuclear DNA Integrity, in Vitro Fertilization, and in Vitro embryo Development in the Mouse, *Society for Reproduction and Fertility*. **2007**, 1470-1626.
83. **Zhang X, Liu Y.** Study of Cryopreservation of Fish Spermatozoa, *Acta Sci. Nat. Univ. Norm. Hunanensis*, **1991**, s. 14: 255-259.
84. **Zhukinskij VN, Bilko VP.** Effect of Semen pH on Embryo Viability in Some Cyprinid Fishes, *J. Ichthyol.*, **1984**, s. 24(3): 64-76.
85. **Zhukinskiy VN, Alekseenko VR.** Semen Quality in Common Carp, *Cyprinus carpio*, and White Amur, *Ctenopharyngodon idella (Cyprinidae)*, in Different Periods of the Spawning Season and as Influenced by Extraction Methods, *Journal of Ichthyology*, **1983**, s. 23: 124-133.

8. ÖZGEÇMİŞ

Temmuz 1984 yılında Adana'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Antakya'da tamamladı. 2002 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni kazandı ve 2008 yılında mezun oldu. Askerlik hizmetini 2010 yılında tamamladıktan sonra Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisansa başladı.