



**İSKENDERUN TEKNİK**  
ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**YÜKSEK  
LİSANS  
TEZİ**

**FARKLI KANATLI TÜRÜ  
YUMURTA SARISI İÇEREN  
SULANDIRICILAR İLE  
DONDURULAN SAZAN  
[*Cyprinus carpio*]  
SPERMASININ ÇÖZÜM  
SONU KALİTESİ VE FERTİLİZASYON  
YETENEĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Hasan AVLAR**

SU ÜRÜNLERİ  
ANABİLİM DALI

AĞUSTOS 2023





**FARKLI KANATLI TÜRÜ YUMURTA SARISI İÇEREN  
SULANDIRICILAR İLE DONDURULAN SAZAN  
(*Cyprinus carpio*) SPERMASININ ÇÖZÜM SONU  
KALİTESİ VE FERTİLİZASYON YETENEĞİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Hasan AVLAR**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI**

**İSKENDERUN TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**AĞUSTOS 2023**

## ETİK BEYAN

İskenderun Teknik Üniversitesi lisansüstü eğitim enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülediğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu,
  - Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
  - Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
  - Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
  - Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
  - Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,
- bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim,

İmza

Hasan AVLAR

FARKLI KANATLI TÜRÜ YUMURTA SARISI İÇEREN SULANDIRICILAR İLE  
DONDURULAN SAZAN (*Cyprinus carpio*) SPERMASININ ÇÖZÜM SONU KALİTESİ  
VE FERTİLİZASYON YETENEĞİNİN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Hasan AVLAR

İSKENDERUN TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

Ağustos 2023

ÖZET

Yumurta sarısı, özellikle memeli türlerinin spermasının kriyoprezervasyonu amacıyla kullanılan sulandırıcıların en yaygın kriyoprotektif bileşenlerden biridir. Bununla birlikte yumurta sarılarının balık spermasının dondurulmasındaki etkinliği ile ilgili olarak bilgi eksikliği bulunmaktadır. Bu nedenle bu çalışma, farklı kanatlı türlerine (ördek, kaz ve tavuk ait yumurta sarılarının kriyoprezervasyon işlemini takiben pullu sazan (*Cyprinus carpio*) spermasının çözüm sonu kalitesi ve fertilizasyonu üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması amacıyla yürütülmüştür. Sukroz tabanlı sulandırıcı ile dilüe (1:10) edilen sperm örnekleri; %10, %15, %20 oranlarında farklı kanatlı yumurta sarıları ile takviye edilmiştir. Kontrol grubuna ait sperm örnekleri sadece yumurta sarısı içermeyen sukroz tabanlı sulandırıcı ile dilüe edilmiştir. Dilüsyonu takiben sperma, +4°C’de 10 dakika ekilibre edilerek 0,25 mL payetlere çekilip sıvı azot (LN<sub>2</sub>) yüzeyinin 3 cm üzerinde 10 dk süre ile dondurulup sıvı azaot (LN<sub>2</sub>) içerisine aktarılmıştır. Sperma 35°C’de 30 saniye su banyosunda çözündürüldü ve 1x10<sup>5</sup> spermatozoa/yumurta oranı kullanılarak fertilizasyon işlemi gerçekleştirildi. Çalışma sonuçlarına göre, sukroz tabanlı sulandırıcıya ördek yumurta sarısı ilave edilmesi kontrol grubuna göre çözündürme sonrası progresif motilite (%), progresif motilite süresi (s), canlılık oranı (%) ve döl verimini (%) geliştirmiştir (p<0.05). Elde edilen çalışma sonuçları, pullu sazan spermasının dondurularak saklanmasında sukroz tabanlı sulandırıcıda, tavuk yumurta sarısı yerine alternatif olarak ördek yumurta sarısının kullanılabilirliğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler : Kriyoprezervasyon, Yumurta Sarısı, Fertilite, Sulandırıcı, Sperm

Sayfa Adedi : 55

Danışman : Prof. Dr. Yusuf BOZKURT

INVESTIGATION OF POST-THAW QUALITY AND FERTILIZATION ABILITY OF  
CARP (*Cyprinus carpio*) SPERM CRYOPRESERVED WITH EXTENDERS CONTAINING  
DIFFERENT AVIAN EGG YOLK TYPES

(M. Sc. Thesis)

Hasan AVLAR

ISKENDERUN TECHNICAL UNIVERSITY  
INSTITUTE OF GRADUATE STUDIES

August 2023

ABSTRACT

Egg yolk is one of the most widely used cryoprotective components of freezing extenders, especially for cryopreservation of mammalian species' sperm. However, there is lack of information regarding its efficacy on freezing of fish sperm. Thus, the objective of this experiment was to compare the effectiveness of egg yolk from different avian species (duck, goose and chicken) on post-thaw quality and fertility of scaly carp (*Cyprinus carpio*) semen following cryopreservation. Sperm samples diluted (1:10) with the sucrose-based extender were supplemented with 10, 15, 20% ratios of different avian egg yolks. In the control group, sperm samples were diluted with the sucrose-based extender, without egg yolk. Following dilution, sperm was equilibrated at 4°C for 10 min and aspirated into 0.25 mL straws, frozen 3 cm above of liquid nitrogen (LN<sub>2</sub>) surface for 10 min, and plunged directly into the liquid nitrogen (LN<sub>2</sub>). The spermatozoa were thawed in a water bath at 35°C for 30 s and fertilization was carried out using 1x10<sup>5</sup> spermatozoa/egg ratio. Based on the results, supplementation of sperm with duck egg yolk in sucrose-based extender improved post-thaw progressive motility (%), progressive motility duration (s), viability (%) and fertility (%) compared to the control group (p<0.05). The results showed that duck egg yolk could be used as an alternative instead of chicken egg yolk in sucrose-based extender for the cryopreservation of scaly carp sperm.

Key Words : Cryopreservation, Egg Yolk, Fertility, Extender, Sperm  
Page Number : 55  
Supervisor : Prof. Dr. Yusuf BOZKURT

## TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamın tüm aőamalarında, büyük titizlik, sabır ve özveri ile bana destek veren değerli danışman hocam sayın Prof.Dr. Yusuf BOZKURT'a en içten teőekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, bu tezimi diğer canlı türlerinin de korunmasına katkı sağlaması umuduyla, benim bu seviyeye gelmemde büyük emekleri olan babam Mevlt AVLAR'a ve annem Hikmet AVLAR'a en içten teőekkürlerimi borç bilerek ithaf ediyorum.



## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	v
TEŞEKKÜR .....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
RESİMLERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	x
ÇİZELGELERİN LİSTESİ .....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETLERİ.....	5
2.1. Sazan Balığı ( <i>Cyprinus carpio</i> ) Hakkında Genel Bilgiler.....	5
2.2. Sazan Balıklarında Üreme.....	5
2.3. Dişi Sazanlarda Üreme Fizyolojisi .....	6
2.4. Erkek Sazanlarda Üreme Fizyolojisi.....	6
2.5. Testisler ve Kanal Sistemi.....	7
2.6. Spermanın Yapısı.....	7
2.7. Balıklarda Sperm Hücrelerinin Kriyobiyolojik Muhafazası .....	8
2.8. Sperma Sulandırıcıları ve Özellikleri .....	9
2.9. Kriyoprotektanlar ve Özellikleri.....	10
2.10. Yumurta Sarısı ve Fonksiyonu.....	11
2.11. Balık Spermasının Kriyoprezervasyonu Konusunda Yapılan Çalışmalar .....	11
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	15
2.1. Materyal.....	15
3.1.1. Deneme Yeri.....	15

3.1.2. Damızlık balıkların temini ve bakımı .....	15
3.1.3. Damızlık Balıklardan Sperm ve Yumurta Alınması .....	15
3.1.4. Fiziksel Spermatolojik Parametrelerin Belirlenmesi.....	17
3.1.5. Sperma Sulandırıcılarının Hazırlanması .....	18
3.1.6. Kanatlı Türlerine Ait Yumurta Sarılarının Analizi .....	19
3.1.7. Sperm Hücrelerinin Dondurulması .....	19
3.1.8. Dondurulan Sperm Hücrelerinin Çözdürülmesi.....	19
3.1.9. Yumurtaların Fertilizasyonu ve İnkübasyonu.....	20
3.1.10. Verilerin Değerlendirilmesi .....	22
4. SONUÇ .....	23
4.1. Damızlık Erkek Sazan Balıklarının Canlı Ağırlık ve Boy Değerleri .....	23
4.2. Damızlık Sazan Balığının Bazı Spermatolojik Özellikleri .....	23
4.3. Kanatlı Yumurta Sarılarının Kimyasal Kompozisyonu .....	24
4.4. Farklı Oranlarda Sulandırıcıya İlave Edilen Kanatlı Yumurta Sarılarının Ekilibrasyon Sonrası Motilite Üzerine Etkileri.....	24
4.5.Farklı Oranlarda Sulandırıcıya İlave EdilenKanatlı Yumurta Sarılarının Ekilibrasyon Sonrası Motilite Süresi Üzerine Etkileri.....	25
4.6. Farklı Oranlarda Sulandırıcıya İlave Edilen Kanatlı Yumurta Sarılarının Çözdürme Sonrası Motilite Üzerine Etkileri.....	25
2.7. Farklı Oranlarda Sulandırıcıya İlave Edilen Kanatlı Yumurta Sarılarının Çözdürme Sonrası Motilite Süresi Üzerine Etkileri.....	26
2.8. Farklı Oranlarda Sulandırıcıya İlave Edilen Kanatlı Yumurta Sarılarının Çözdürme Sonrası Canlılık Üzerine Etkileri .....	27
2.9. Farklı Oranlarda Sulandırıcıya İlave Edilen Kanatlı Yumurta Sarılarının Çözdürme Sonrası Fertilizasyon Üzerine Etkileri.....	27
5. TARTIŞMA .....	29
KAYNAKLAR.....	36
DİZİN .....	43



## RESİMLERİN LİSTESİ

<b>Resim</b>	<b>Sayfa</b>
Resim 3.1. Şanlıurfa / Bozova Tarım ve Orman Bakanlığı'na bağlı sazan üretim tesisinde damızlık sazan balıkların barındırıldığı toprak havuzlar.....	15
Resim 3.2. Damızlık balıkların anestezi madde ile uyuşturulması.....	16
Resim 3.3. Dişi damızlık sazan balıklarından abdominal yöntemle yumurta sağımı.....	16
Resim 3.4. Erkek damızlık sazan balıklarından abdominal masaj yöntemi ile tüplere sağılan sperm örnekleri.....	17
Resim 3.5. Spermatolojik özelliklerin mikroskopta incelenmesi.....	17
Resim 3.6. Sperma sulandırıcısının hazırlanması.....	18
Resim 3.7. %10, %15, %20 oranlarında kaz yumurta sarısı içeren sperma sulandırıcıları.....	18
Resim 3.8. %10, %15, %20 oranlarında ördekyumurtasarı içeren sperma sulandırıcıları.....	19
Resim 3.9. Payetlerde dondurulan sperm hücrelerinin su banyosunda çözündürülmesi.....	20
Resim 3.10. Tavuk yumurta sarısı içeren sulandırıcı gruplarında döllenmiş yumurta görüntüleri.....	21
Resim 3.11. Ördek yumurta sarısı içeren sulandırıcı gruplarında döllenmiş yumurta görüntüleri.....	21
Resim 3.12. Kaz yumurta sarısı içeren sulandırıcı gruplarında döllenmiş yumurta görüntüleri.....	22
Resim 3.13. Kontrol grubunda döllenmiş yumurta görüntüleri.....	22

**ŞEKİLLERİN LİSTESİ**

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 4.1. Farklı kanatlı yumurta sarılarının sazan ( <i>Cyprinus carpio</i> ) spermasının ekilibrasyon sonrası progresiv motilite üzerine etkisi.....	24
Şekil 4.2. Farklı kanatlı yumurta sarılarının sazan ( <i>Cyprinus carpio</i> ) spermasının ekilibrasyon sonrası progresiv motilite süreleri üzerine etkisi.....	25
Şekil 4.3. Farklı kanatlı yumurta sarılarının sazan ( <i>Cyprinus carpio</i> ) spermasının çözüm sonu progresiv motiliteleri üzerine etkisi.....	26
Şekil 4.4. Farklı kanatlı yumurta sarılarının sazan ( <i>Cyprinus carpio</i> ) spermasının çözüm sonu progresiv motilite süreleri üzerine etkisi .....	26
Şekil 4.5. Farklı kanatlı yumurta sarılarının sazan ( <i>Cyprinus carpio</i> ) spermasının çözüm sonu canlılık oranları üzerine etkisi.....	27
Şekil 4.6. Farklı kanatlı yumurta sarılarının sazan ( <i>Cyprinus carpio</i> ) spermasının çözüm sonu fertilizasyon oranları üzerine etkisi.....	28

**ÇİZELGELERİN LİSTESİ**

<b>Çizelge</b>	<b>Sayfa</b>
Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan kanatlı türlerine ait yumurtaların bazı kimyasal içerikleri .....	23
Çizelge 4.2. Sazan ( <i>Cyprinus carpio</i> ) balığının ortalama spermatolojik özellikleri (n=13).....	23
Çizelge 4.3. Çalışmada kullanılan kanatlı türlerine ait yumurtaların bazı kimyasal içerikleri .....	24



## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklamalar</b>
°C	Santigrat derece
pH	Asitlik Bazlık Dengesi
cm	Santimetre
g	gram
l	litre
mg	Miligram
mg/l	Miligram/Litre
<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklamalar</b>
CLC	Chelesterol Loaded Cyclodextrin
DHA	Docosahexaenoic Asit
DNA	DeoksiriboNükleik Asit
DMA	Dimetil Asetamid
DMSO	Dimetil Sülfoksit
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EY	(Egg Yolk)Yumurta Sarısı
GE	Kaz Yumurta Sarısı
GSH	Glutasyon Serbest Radikalleri
GSH-Px	Glutasyon Pereoksidaz
HDL	Yüksek Yoğunluklu Lipoproteinler
IGF	Büyüme Hormonu
LN <sub>2</sub>	Likid Nitrojen
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler
MDA	Methylenedioxyamphptamine
PCB	Poliklorlu Bifenil

<b>PVA</b>	Poli Vinil Alkol
<b>RNA</b>	Ribo Nükleik Asit
<b>ROS</b>	Reaktif Oksijen Türleri



## 1. GİRİŞ

Su ürünleri, protein oranı yüksek, amino asit içeriği, vitamin ve mikro- yönünden zengin, ayrıca çoklu doymamış yağ asitlerini içeren değerli bir besin maddesidir. Su ürünleri, insan beslenmesine katkısı, istihdam oluşturması, sanayiye hammadde sağlaması ve ihracat potansiyeli sayesinde ülke ekonomileri için oldukça önemlidir (Aydın ve Sayılı, 2009). Tüm dünyada, dünya nüfusunun artması, tatlı su ve denizlerdeki doğal balık stoklarının azalmasına bağlı olarak akuakültür sektörüne yönelik yatırımlar artmıştır. Bu durum akuakültür sektörünün öneminin ve büyümesinin artmasına yol açarak, akuakültürü en hızlı büyüyen gıda sektörü konumuna getirmiştir.

Ülkemizde akuakültür sektörünün geçmişi çok eski olmamasına rağmen oldukça hızlı bir gelişme göstermiştir. Ülkemizde su ürünlerinin akuakültür yoluyla üretim miktarı 2022 yılında 514.805 tona ulaşarak toplam su ürünleri üretiminin %60.6'sını oluşturmuştur (TÜİK, 2022). Türkiye'de en fazla yetiştiriciliği yapılan balık türleri tatlı su balıklarından gökkuşacağı alabalığı ile deniz balıklarından çipura ve levrek olup bu türlerin üretimi oldukça yoğun bir şekilde yapılmaktadır.

Diğer taraftan dünya'da yaklaşık 3.000 yıllık yetiştiricilik tarihine sahip olan ve en fazla üretimi yapılan balık türü olan sazan balığının, su kaynakları ve iklim şartları çok uygun olmasına rağmen, yetiştiricilik sektöründen gereken ilgiyi görememekte olup buna bağlı olarak ülkemizdeki yetiştiriciliği gittikçe azalmaktadır.

Ticari yetiştiricilikte olduğu kadar sportif ve rekreatif balıkçılıkta da oldukça kıymetli olan sazan balığı, ülkemiz iç sularının hemen hemen tamamında mevcuttur. 2022 yılı itibariyle ülkemiz iç sularında sazan üretimi 293 ton olarak gerçekleşmiştir (TÜİK, 2022).

Ülkemiz iklim koşullarında sazan balığının pazar boyuna ulaşabilmesi için yaklaşık 2-2,5 yıllık bir süreye ihtiyaç duyulmaktadır. Bu durum, sazan balığının, uygun su koşullarında 9-10 ay gibi kısa bir sürede pazar boyuna gelen alabalık ile rekabet etmesini güçleştirmektedir. Ülkemiz akuakültür sektöründe alabalık ve alternatif deniz balığı üreticileri devlet tarafından desteklenmesine rağmen devlet desteklemesinden yoksun olan sazan üretiminde maliyetlerin yükselmesi bu türün yetiştiriciler tarafından kültüre alınmasını zorlaştırmakta ve dolayısıyla üretim miktarı düşük kalmaktadır.

Dolayısıyla ülkemizde gerek doğal stokların takviyesi ve gerekse akuakültür koşullarında sazan balığının üretimine yönelik olarak kamu bünyesinde faaliyet gösteren kuluçkahaneler kurulmuştur. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı ile Orman ve Su İşleri Bakanlığı bünyesindeki bu kuluçkahanelerde üretilen sazan balıkları iç suların balıklandırılmasında ve ticari işletmelerin yavru ihtiyaçlarının karşılanmasında kullanılmaktadır.

Ülkemizde akuakültür sektörü üretim ve pazarlama yönünden gelişme göstermekle beraber, özellikle ıslah konusunda önemli sorunlarla karşılaşmakta olup önemli verim kayıpları meydana gelmektedir. Bu sorunlara çözüm sağlayabilecek önemli uygulamalardan birisi hiç şüphesiz sperma kriyoprezervasyon (dondurarak muhafaza) yöntemidir.

Akuakültür sektöründe kriyoprezervasyon yönteminin uygulanmasıyla; genetik olarak üstün özelliklere sahip erkek damızlık balıklardan elde edilen birey sayısının artırılabilmesi, arzu edilen genetik özelliklerin nesiller boyunca aktarılabilmesi, genetik materyalin kolay bir şekilde transportunun sağlanabilmesi, yıl boyunca erkek gamet hücrelerinden faydalanılabilmesi ve sperm bankalarının kurulması mümkün olabilmektedir (Bozkurt, 2004).

Sperm hücrelerinin dondurularak saklanmasında standart bir işlem haline gelen kriyoprezervasyon, sperm hücrelerinin yaşayabilmesi için gerekli olan ideal koşulların sağlanmasını gerektirmektedir (Bozkurt ve Seçer, 2005a). Bu bağlamda kriyoprezervasyon yönteminin ilk aşaması, dondurma işleminden önce kriyoprotektan adı verilen koruyucu maddelerin hücre içerisine penetre olmalarını sağlayabilecek sulandırıcılar ile sulandırılmasıdır. Başarılı bir kriyoprezervasyon işleminde, sulandırıcının bileşimi ve kullanılan kriyoprotektanlar önemli rol oynamaktadır (Munkittrick ve Moccia, 1984).

Kriyoprotektanlar dondurma ve çözme uygulamaları sırasında hücrelerde oluşabilecek zararları önlemek amacıyla kullanılan kimyasal maddeler olarak tanımlanmaktadır. Spermanın dondurulmasında kullanılacak sulandırıcıda kriyoprotektif özellikli maddelerin bulunması gereklidir. Kriyoprotektanlar (soğuk şokuna karşı koruyucu maddeler) hücrenin soğutulması, dondurulması ve çözdürülmesi esnasında gelişen fiziksel, kimyasal ve oksidatif stresi ve bunlardan doğan ısı şoku, ozmotik değişim, intraselüler kristal oluşumu ve oluşan serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu hasarları azaltmak amacıyla kullanılmakta, direk olarak çözüm sonu spermatolojik parametreleri ve döllemeyi etkilemektedir.

Bu bağlamda, son yıllarda çiftlik hayvanlarında sperm kriyoprezervasyonu çalışmalarında değerlendirilen koruyucu maddelerden biriside çeşitli kanatlı hayvan türlerine ait yumurta sarılarıdır. Bu amaçla yumurta sarısı geniş çapta kullanılmakta olup ve spermatozoon motilitesi, canlılığı ve fertilizasyon kapasitesi üzerinde olumlu etkilere sahiptir. Yumurta sarısında bulunan protein, lipit ve kolesterol dondurma sürecinde çeşitli aşamalar boyunca spermayı aktif olarak korumak için mevcuttur. Ayrıca, yumurta sarısında bulunan düşük yoğunluğa sahip fosfolipitler spermatozoa yüzeyine bağlanmakta ve hücresel adenilat siklazı aktive ederek kriyoprotektif etki göstermektedirler (Bathgate ve diğ., 2006; Bergeron ve Manjunath, 2006).

Memeli türleri ile yapılan çalışmalarda daha iyi çözüm sonu sperma kalitesi elde etmek amacıyla farklı kanatlı türlerinin yumurta sarılarının geleneksel olarak kullanılan tavuk yumurta sarısı yerine kullanımı denenmiş ve hayvan türlerine göre farklı olmakla birlikte olumlu sonuçlar alınmıştır.

Diğer taraftan, balık spermasının dondurulmasında geleneksel olarak koruyucu madde olarak tavuk yumurta sarısı kullanılsada, diğer kanatlı hayvanların yumurta sarılarının koruyucu etkileri tam olarak pek bilinmemektedir. Bu noktadan hareketle yürütülen bu tez çalışmasında farklı kanatlı türlerine (ördek, kaz ve tavuk) ait yumurta sarılarının, sazan (*Cyprinus carpio*) spermasının dondurulmasında kullanımı, çözüm sonu motilite, viabilite ve fertilizasyon oranlarına etkileri araştırılmıştır.



## 2. LİTERATÜR ÖZETLERİ

### 2.1. Sazan Balığı (*Cyprinus carpio*) Hakkında Genel Bilgiler

Sazan (*Cyprinus carpio*) Orta Asya'dan Anadolu'ya ve Avrupa'ya kadar çok geniş doğal yayılış alanına sahip bir balık türüdür (Barus ve diğ., 2002). Türkiye'de ilk defa sazan yetiştiriciliği çalışmalarına, 1960'ların başında başlanmıştır (İnnal and Erk'akan, 2006). *Cyprinus carpio*'nun kültür balıkçılığında kullanılan, pullu sazan, aynalı sazan, çizgili sazan ve deri sazanı olarak adlandırılan dört kültür formu bulunmaktadır (Muus ve Dahlström, 1981).

Sazan, ekonomik değeri olan ve ılıman iklim bölgelerinde yaşayabilen bir balık türü olup düşük ve yüksek su sıcaklıklarına kolayca adapte olabilmektedir. Dipten beslenen bir balık türü olan sazan balıklarının besinlerini; bentik su hayvanları, planktonlar, bitki parçaları ve atıkları oluşturmaktadır. Sazan, ülkemizde tatlı su kaynaklarında en çok bulunan balık türüdür. Ülkemizde özellikle Eğirdir, Beyşehir, Uluabat, Manyas, Akşehir, İznik ve Gölarmara göllerinde doğal popülasyonlarının yoğun bir şekilde bulunduğu bildirilirken aynı zamanda yapay göl ve göletlerin balıklandırılması amacıyla yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Yılmaz, 2004).

Sazan balığının sistematığı şu şekilde belirtilmektedir (Soylu, 1998).

Regnum: Animalia

Subregnum: Metazoa

Phylum: Chordata

Subphylum: Vertebrata

Superclasis: Pisces

Clasis: Teleostei

Superordo: Ostariophysi

Ordo: Cypriniformes

Familia: Cyprinidae

Genus: Cyprinus

Species: *Cyprinus carpio*

## 2.2. Sazan Balıklarında Üreme

Diğer canlılar gibi, balıklar da hayatlarını sürdürüebilmek ve geliştirebilmek için kendilerini buldukları ortama (tatlı su veya deniz suyu) adapte etmek zorundadırlar. Doğada varolabilmek için verilen bu mücadelede, en önemli nokta üremedir (Çelikkale, 1991). Sazan balıklarında üreme aktivitesi genellikle sonbahar ve ilkbahar ayları arasında gerçekleşmektedir. Sazan balıklarında üreme etkinliğinin başlaması; yumurtadan çıktıktan sonra belli bir vücut gelişimine ulaşması, uygun sıcaklık derecesinin varlığı, ışık ve hormonal mekanizma ile doğrudan ilişkilidir. Sazan balıklarında cinsi olgunluk yaşı 2-3 yıl arasında değişiklik göstermekte olup, genellikle erkekler dişilerden daha erken yaşta cinsel olgunluğa ulaşmaktadır (Bozkurt, 2004).

## 2.3. Dişi Sazanlarda Üreme Fizyolojisi

Cinsi olgunluğa erişmiş bir dişi sazan balığının başlıca morfolojik özelliği; şişkin ve yumuşak bir abdomen ile kırmızı renkte genital papilaya sahip olmasıdır. Sazan balıkları; doğal yayılım alanları olan göller ve yavaş akan nehirlerde Mayıs ve Temmuz ayları arasında su sıcaklığının 18-22°C olduğu dönemde yumurtalarını sığ ve bol bitkili su kesimlerine bırakmaktadır. Sazan yumurtaları şeffaf ve yapışkan olup 1 mm çapındadır. Yumurta sayısı ve çapında görülen farklılığın; balığın yaşı, büyüklüğü ve beslenme rejimine bağlı olarak şekillendiği düşünülmektedir. Yumurtlama bir hafta kadar sürmekte olup 1 kg'lık bir sazan balığı yaklaşık 200-300 bin adet yumurta bırakmaktadır. Bitkilere yapışan sazan yumurtalaından 3-4 gün (60-70°C) içinde lavra çıkışı gerçekleşmektedir. Sazan balıkları pelajik tipte yumurtaya sahip olup örtü vazifesi gören chorion, miktarı değişebilen sayıda yumurta sarısı ve bir adet mikropile sahiptir (Bozkurt, 2004).

## 2.4. Erkek Sazanlarda Üreme Fizyolojisi

Reproduktif etkinliğin başlaması için yumurtadan çıktıktan sonra erkek balığın belirli bir vücut ağırlığına ulaşması, uygun değerinde 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). Bu bağlamda erkek sazan balıkları buldukları suyun sıcaklığı ve besin madde içeriğine bağlı olarak erkekler 2-3 yaşında cinsel olgunluğa erişmektedir (Bozkurt, 2004).

## 2.5. Testisler ve Kanal Sistemi

Testisler, çevreleri ince bir bağdokusu ile sarılmış olan sayıca fazla spermatogenetik birimleri içermektedir. Bu birimler, birbirleri ile bir kanal ağı ile bağlantılıdır. Spermatogenetik birimler germinal ve interstisyel olarak iki bölüme ayrılır. İnterstisyel bölge testise kan sağlayan kılcal damarlar, kas hücreleri, fibroblast ve androjen salgılayan tek yada küçük gruplar halinde lobüller arasında bulunan Leydig hücrelerini (Testiste seminifer-seminiferus, sperma yapıcı- tüpçükleri arasında bulunan, testosteron hormonu salgılayan hücreler) içerir. Germinal bölüm germ hücreleri ve somatik Sertoli hücrelerini (Testislerde bulunan, sperm hücrelerini koruma ve besleme görevi olan, piramit şeklindeki büyük hücreler) içerir. Germ hücreleri spermatogenik hücrelerin tüm farklılaşma aşamalarındaki hücreleri (spermatogonia, spermatosit, spermatid ve sperm) içerir. Sperm hücreleri bu birimler içerisindeki ana hücrelerden yani spermatogonyumlardan spermatogenesis sonucu oluşurlar (Timur, 2006).

## 2.6. Spermanın Yapısı

Sperma, spermatozoa ve seminal plazmadan oluşan, genellikle beyaz-krem renğinde yarı visköz hücresel bir sıvıdır (Bozkurt, 2004). 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 spermatozoalarının baş kısmı küresel bir yapıdadır. 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 temas geçtiğinde hareket kabiliyeti kazanmaktadır (Gorda, 1995).

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).

Seminal plazmanın esas rolü çoğu zaman uzun süre in vivo olarak muhafaza edilmesi gereken spermatozoa için uygun çevresel şartları oluşturarak saklanmasını sağlamaktır. Bu çevresel şartlar, uygun seviyede ozmotik basınç, iyon konsantrasyonu, pH ve spermatozoayı koruyan proteinlerden oluşmaktadır. Spermatozoanın dölleyebilme yeteneği, motilitesi ve canlılığı bu muhafaza süresince korunmak zorundadır. Seminal plazmanın spermatozoayı korumak kadar spermatozoayı hareketsiz (immotil) olarak tutma özelliğide vardır.

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, döllemeyi doğrudan etkilemekte, steril nitelikteki erkek damızlıkların işletmeden çıkarılması ile de önemli bir ekonomik kazanç elde edilmektedir (Bozkurt ve Seçer, 2006).

Sperm hücrelerinin 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).

## **2.7. Balıklarda Sperm Hücrelerinin Kriyobiyolojik Muhafazası**

Balık spermasının muhafaza edilmesi balık yetiştiriciliğinde uygulanan seleksiyon programlarında büyük önem taşımaktadır. Çünkü aynı tür balıkların generasyonlar boyunca aynı ortam ve koşullarda yetiştirilmesi mevcut popülasyonda az bulunan genlerin kaybolmasına ve heterozigotluğun azalmasına neden olmaktadır. Genetik varyasyondaki bu azalma, mevcut balık stoğunun ileri dönemlerdeki seleksiyon programlarında kullanılma potansiyelini sınırlamakta olup bu durum düşük yaşama oranı, düşük büyüme oranı, yem dönüşüm etkinliğinde azalma, hastalıklara yakalanma riskinde artış ve yavru balıklarda ölüm oranının artması şeklinde kendini göstermektedir.

Bu nedenle arzu edilen gen havuzlarının oluşturulmasını sağlamak amacıyla gametlerin muhafaza edilmesi giderek büyük ilgi görmektedir. Günümüzde gametlerin muhafaza edilmesinde yaygın olarak kullanılan metot dondurarak (kriyoprezervasyon) muhafazadır. Nitekim balık spermalarının dondurulmalarıyla oluşturulan sperm bankaları sayesinde arzu

edilen özelliklere sahip damızlık balıklardan elde edilen genler yetiştiricilikte seleksiyon programlarında sperma formunda kullanılmaktadır.

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 diğ., 2007). Rana ve Gilmour (1996) son yıllarda, 200'den fazla balık türünün spermasının başarıyla dondurulduğunu kaydetmektedir.

Balıkların türe özgü farklı özelliklerinden dolayı, spermanın kriyopreservasyonu için güvenilir protokoller geliştirmek gerekmektedir (Kopeika ve diğ., 2007). Ancak, türe özgü ideal kriyoprezervasyon protokolünün belirlenmesi kolay değildir. Ayrıca, dondurmanın başarısını etkileyen sperma kalitesi, sulandırıcı - kriyoprotektan etkileşimi, alıştırma süresi (ekilibrasyon), sulandırma oranı, soğutma oranı, çözündürme sıcaklığı ve süresi, çözündürme sonrası aktive edilene kadar geçen süre gibi faktörler bulunmaktadır (Rideout ve diğ., 2004).

Diğer taraftan, kriyoprezervasyon işlemi sonrasında dondurulmuş spermada hem canlılık oranı azalmakta hem de sperm hücrelerinin fonksiyonları azalmaktadır. Bunun nedenleri arasında soğuk şokuna uğramaları, osmotik strese maruz kalmaları ve hücre içi buz kristalizasyonu gösterilmektedir (Fabbrocini ve diğ., 2000). Bu etkileri en aza indirmek amacıyla sperma sulandırıcılarına, soğuk şokuna karşı koruyucu özellik gösteren kriyoprotektan adı verilen maddelerin hazırlanacak olan sulandırıcılara ilave edilmesi gerekmektedir.

## **2.8. Sperma Sulandırıcıları ve Özellikleri**

Sperma sulandırıcılarını; spermanın ihtiyaçlarını karşılayan, dış etkenlere karşı spermatozoanın bütünlüğünü ve fertilitate yeteneğini koruyan, spermanın hacmini istenilen düzeye çıkarabilen spermatozoa için geliştirilmiş sıvı besi ortamları olarak tanımlamak mümkündür. Başarılı bir kriyoprezervasyon işleminde osmolarite, pH ve iyonik yapının devamlılığının ve enerji kaynağının sağlanması ile donma sırasında oluşacak soğuk şoku hasarların azaltılması amacıyla sulandırıcılar kullanılmaktadır (England, 1993).

Balıklarda spermatozoa'nın muhafazası ve fertilizasyonu sırasında maksimum verimliliğini koruma amacı taşıyan farklı tipte sulandırıcılar geliştirilmiştir. Bu amaçla sulandırıcı kompozisyonunun geliştirilmesinde başlıca iki yaklaşım bulunmaktadır. İlk yaklaşım balığın seminal plazma kompozisyonuna benzer sulandırıcıların kullanılmasıdır. İkinci yaklaşım ise hazırlaması kolay olan sulandırıcıların kullanılmasıdır.

Bu bağlamda, tuz ve glukoz bazlı sulandırıcılar balık spermasının dondurulması için en yaygın şekilde kullanılan maddeleridir. Kriyoprezervasyon için sperma sulandırıcılarına çeşitli tipte katkı maddelerinin dahil edilmesiyle, çözüm sonrası motilite oranı, motilite süresi, canlılık oranındaki artış dikkate alınarak sperm kalitesinin arttığı ve DNA hasarının azaldığı bildirilmektedir.

## 2.9. Kriyoprotektanlar ve Özellikleri

Kriyoprotektanlar dondurma ve çözündürme uygulamaları sırasında hücrelerde oluşabilecek zararları önlemek amacıyla kullanılan kimyasal maddeler olarak tanımlanmaktadır. Kriyoprotektanlar genel olarak koruyucu etkilerini ortamdaki donmamış fraksiyonu artırarak ve ortamdaki iyon miktarını azaltarak gösterirler. Hücreler dondurulmadan önce kriyoprotektanlarla inkübasyona tabi tutularak, intrasellüler bakımdan dengeye gelmesi sağlanmaktadır. Kriyoprotektanların en önemli özellikleri, düşük moleküler ağırlığa sahip olmaları ve toksik etkilerinin ancak belirli oranlarda katıldıklarında oluşmasıdır (Palasz and Mapletopt, 1996).

Kriyoprotektanlar işlevsel olarak permeabl (internal) ve permeabl olmayan (eksternal) kriyoprotektanlar iki gruba ayrılmaktadır. Permeabl (internal) kriyoprotektanlar; hücre zarından içeriye girerek ve 'colligative' olarak etkilerini göstermektedir. Koruyucu etkileri donma esnasında ortamdaki elektrolit yoğunluğunu azaltmaları, dehidrasyonu düzenleyip protein yapılarını korumaları ve düşük sıcaklıkların yarattığı ozmotik büzüşmeyi azaltmaları ile oluşmaktadır (Holt, 2000). Permeabl özelliğe sahip kriyoprotektan olarak gliserol, etilen glikol, formamide, Dimetilsülfoksit (DMSO) örnek olarak sayılabilir. Permeabl olmayan (eksternal) kriyoprotektanlar ise, membranların sıvı ve katyonlara karşı permeabilitesinde artış yaparak, ozmotik strese karşı hücre membranları esnek hale getirmektedir. Ayrıca, hücrede donma/çözünme esnasında gelişen lipid peroksidasyonunu azaltmaya çalışırlar. Sulandırıcıya ilavelerinde düşük oranda permeabl kriyoprotektan kullanılmakta, bu işlem internal kriyoprotektanların olası toksik etkilerini azaltmaktadır (Cabrita ve diğ., 2001). Eksternal kriyoprotektanlar, makromoleküller ve sakkaritler olarak ikiye ayrılır.

Makromolekül olarak en çok kullanılanları; polietilen glikol, ficoll 70, BSA, dekstran, mannitol, polivilnilprolidon ve yumurta sarısıdır (Cabrita ve diğ., 2001). Sakkarit olarak en çok kullanılanları ise; glukoz, sükroz, trehaloz ve rafinoz sayılabilir. Sakkaritler, lethal etkili intrasellüler kristalleşmeyi engellemek için hücrede dehidrasyon oluştururlar. (An ve diğ., 2000). Şekerler donma ve çözüm esnasında oluşan membran zararına karşı, membrandaki fosfolipitlerle etkileşime girip yüzey artışı sağlayarak koruma sağlamakta ve çözüm işlemi sırasında da hücrelerin ozmotik şoka girmesini önlemektedir (McWilliams ve diğ., 1995).

## **2.10. Yumurta Sarısı ve Fonksiyonu**

Besleyici bir gıda olan yumurta, yüksek kaliteli protein, vitamin ve mineral içermektedir. Bunun yanında yumurta, antibakteriyel, anti-kanser, antiinflamatuvar, anjiyotensin enzim dönüştürücü, immünomodülatör ve farmakolojik özelliklere sahiptir (Zhang ve diğ., 2021). Çiftlik hayvan spermalarının kriyoprezervasyonunda, yumurta sarısı yaygın olarak kullanılan kriyoprotektanlardan biridir. Diğer taraftan, yumurta sarısının kriyoprotektan özelliği tam olarak bilinmemekle birlikte, spermatozoonun soğutulması esnasında sperm hücresinin membranına yapışarak membran bütünlüğünün bozulmasını engelleyici etki gösterdiği düşünülmektedir (Akçay, 2000). Medeiros ve diğ., (2002), sulandırıcılara katılan yumurta sarısının fosfolipit yapısında olduğundan spermatozoayı soğuk şokundan koruduğu ve sulandırıcılara katılması gerektiğini bildirmiştir. Ayrıca yumurta sarısının yapısında bulunan düşük yoğunluklu lipitlerin (LDL) yumurta sarısının jelatinleşmesini sağladığı ve sperm hücresinin membranını sararak dondurma-çözdürme sırasında sperm hücresinin zarar görmesini engellediği bildirilmektedir (Purdy, 2006). Yumurta sarısı sulandırıcı içerisinde türlere göre farklı olmakla birlikte genellikle % 3-25 oranlarında kullanılmaktadır.

## **2.11. Balık Spermasının Kriyoprezervasyonu Konusunda Yapılan Çalışmalar**

Spermayı dondurarak uzun süreli saklama, spermaların taşınmasını kolaylaştırmakta, spermanın kontrol altına alınmasına izin vermekte ve damızlık hayvanın ölümünden sonra bile üstün özellikli genetik materyalin uzun süre kullanılmasını sağlamaktadır. Sperma dondurma işlemi, verim özellikleri açısından önemli hayvan türleri özellikle boğa için dünya çapında bir endüstri kolu haline gelmiştir. Soyu tükenmekte olan türlerin veya değerli transgenik soyların biyolojik çeşitliliğini korumak için genom kaynak bankacılığı da spermanın dondurulması işleminden çok büyük fayda sağlamaktadır (Bailey, 2000).

Spermasının saklanması spermanın dondurulması veya soğuk şartlarda bekletilmesi işlemlerinde, spermatozoonları soğuk şokuna karşı korumak ve bu işlemler sırasında geri dönüşümsüz hasarın veya fonksiyonel zayıflıkların önlenmesi açısından önemlidir.

Çeşitli türlerin spermalarında kullanılan sulandırıcıların, içerisinde bulunan koruyucu maddelerin bileşimi benzerlik gösterse de türe özgü sperma özellikleri, araştırmacıları bu sperma sulandırıcılarını ve protokolleri optimize etmeye zorlamıştır (Moce ve Vicente, 2009).

Dondurma işlemi; hücre ve dokulardan oluşan biyolojik materyalin uzun süre saklanmasına olanak sağlayan bir yöntemdir. Spermatozoonların dondurma işleminden zarar görmelerinin en önemli nedenleri arasında kullanılan sulandırıcıların oluşturduğu buz kristalleri sayılabilir. (Aisen ve diğ., 2005). Gliserol, DMSO, etilen glikol ve propilen glikol hücre ve dokuların dondurulması amacıyla kriyoprotektan olarak çok yaygın biçimde kullanılmaktadır (Bhattacharya ve Prajapati, 2016). Bu ajanlar hücre stoplazmasına geçmek suretiyle buz kristali oluşumunu engelleyerek koruyucu etki yaparlar. Ancak, bu ajanların tamamı hemen hemen tüm hücre tipleri için yüksek düzeyde toksiktir (Bhattacharya ve Prajapati, 2016). Bu olumsuz etkiler çözüm sonu yaşama oranlarını ve spermatozoonların fertilitite yeteneklerini azaltmaktadır.

Doku ve hücrelerin kriyoprezervasyonu 1700'lü yıllardan itibaren uygulanmakta olan bir tekniktir. Bilimsel ve modern anlamda canlı hücre dondurma çalışmaları, 1949 yılında Polge ve arkadaşlarının gliserolün kriyoprotektan (soğuk şokuna karşı koruma sağlayıcı) özelliğini bulmasından sonra başlamış olup ilk dondurulan hücre spermatozoa olmuştur. Bu anlamda kriyobiyojoloji hücre, doku, organ ve organizmaların dondurulmasını inceleyen bilim dalı olarak önemini artırmış ve dondurulan çözdürülen hücrelerin fonksiyonel özelliklerinin daha iyi anlaşılması, kriyobiyojolojinin gelişmesine neden olmuştur (Leibo ve Brandley, 1999).

Balık spermasının ilk kez başarılı bir şekilde dondurulması, Blaxter tarafından 1953 yılında ringa balıkları ile yapılan çalışmada sağlanmıştır. O tarihten bu yana balık spermasının dondurulması akuakültür alanında giderek yaygın bir hale gelmiştir. Rana ve Gilmour (1996) günümüzde 200'den fazla balık türünün spermasının başarıyla dondurulduğunu bildirmiştir. Yapılan çalışmalar genelde benzerlik göstermekte olup, başlıca izlenen yol spermatozoon aktivasyonundan kaçınarak spermanın uygun bir sulandırıcı ve internal özellikteki bir kriyoprotektan ile kuru buz üzerinde ( $-79^{\circ}\text{C}$ ) veya sıvı azot buharında ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) dondurulması şeklindedir. Ancak çözüm sonrası motilite ve fertilizasyon oranlarında oldukça farklı ve çelişkili sonuçlar alınmaktadır. Bu duruma, balık spermatozoonlarının motil kalma sürelerinin çok kısa olması ve ozmotik şoka uğramaları neden olmaktadır.



Balık spermasının dondurulması üzerine yapılan ilk araştırmalarda basit sulandırıcıların iyi sonuçlar verdiği ancak daha sonra yapılan araştırmalarda ise kullanılan kompleks sulandırıcıların daha başarılı olduğu bildirilmektedir (Lahnsteiner, 2002). Balık spermasının dondurulmasında en önemli katkı maddeleri kriyoprotektanlardır. Bunlardan en çok kullanılanları DMSO (Dimethyl sulfoxide), DMA (Dimethyl acetamid), gliserol, propilen glikol ve etilen glikol'dür. Sulandırıcılara kriyoprotektanlardan başka yumurta sarısı, BSA (Bovine serum albumine), albumin, lecithin, promine- D ve promine-F gibi katkı maddeleri katılmaktadır (Cabrita ve diğ., 1998).

Kullanılan kriyoprotektanlar arasında ise en uygun olanlarının DMSO, DMA ve gliserol olduğu belirtilmektedir. Birçok araştırmada farklı kriyoprotektan ve oranları denenmiş olup, genellikle %10 oranında DMSO'nun başarılı sonuçlar verdiği bildirilmektedir (Akçay ve diğ., 2002). Conget ve diğ., (1996), kriyoprotektan olarak gliserol, DMSO ve DMSO+sukroz'u karşılaştırdıkları çalışmalarında en yüksek motilite (%63) ve fertilizasyon oranını (%58) DMSO+sukroz ile elde etmişlerdir. Baynes ve Scott (1987) ise, %10 oranında DMSO kullandığı 0,6 M sukroz solüsyonu ile çözüm sonrası fertilizasyon oranını %80 olarak bildirmiştir.

Balık spermasının muhafazası üzerine yapılan çalışmalarda dondurulmuş spermanın fertilizasyon kapasitesinin taze spermadan daha düşük olduğu bildirilmektedir (Holtz, 1993). Balık spermasının dondurulması üzerine yapılan araştırmalarda spermanın sulandırılmasında spermatozoa aktivasyonundan kaçınılması gerektiği ve seminal plazmanın yapısına uygun sulandırıcıların seçilmesinin fertilizasyon başarısını artıracadığı bildirilmektedir. Sulandırma oranının ise seçilen yöntemeye göre 1:1'den 1:20'ye kadar değişim gösterdiği dikkati çekmektedir. Munkittrick ve Moccia (1984)'ya göre en yaygın sulandırma oranı 1:3 olmakla birlikte, sulandırma oranı 1:1 ile 1:19 oranlarında değişim göstermektedir (Steyn ve diğ., 1989).

Baynes ve Scot (1987), balık spermasının kriyoprezervasyonunda başarılı sonuçlar elde edilebilmesi için dikkat edilmesi gereken en önemli noktanın spermanın alınması, dondurulması ve çözdürülmesi arasında geçen sürelerin minimum düzeyde tutulması gerektiğini bildirmiştir. Stoss ve Holtz (1983), spermanın alınması ve dondurulması arasındaki süre artışıının fertilizasyon oranını düşürdüğünü belirlemiştir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Deneme Yeri

Araştırma, Şanlıurfa ili Bozova ilçesinde Tarım ve Orman Bakanlığına ait sazan üretim tesisinde yürütülmüştür (Şekil 3.1).

##### 3.1.2. Damızlık balıkların temini ve bakımı

Üretim tesisinde yetiştirilen cinsel olgunluğa erişmiş, sağlıklı olan 2 yaş ve üzerindeki erkek ve dişi damızlık pullu sazan (*Cyprinus carpio*) balıkları çalışma materyalini oluşturdu. Araştırmada; sağlıklı, 2 yaş ve üzerindeki 13 adet erkek, 10 adet dişi damızlık kullanılmıştır.



Resim 3.1. Şanlıurfa / Bozova Tarım ve Orman Bakanlığı'na bağlı balık üretim tesisinde damızlık sazan balıkların barındırıldığı toprak havuzlar.

### 3.1.3. Damızlık Balıklardan Sperm ve Yumurta Alınması

Damızlık balıklardan sperma ve yumurta alımında hipofiz enjeksiyonu uygulanmıştır. Bu bağlamda, 0,1 g/L oranında MS-222 ile anestezi işlemi uygulanan damızlık balıklara enjekte edilecek hipofiz miktarı dişi damızlıklar için 3,5 mg/kg, erkek damızlıklar için ise 2 mg/kg esas alınmıştır (Akçay ve diğ., 2002). Dişi damızlık balıklara ilk doz olarak sağımdan 12 saat önce toplam dozun %10'u olan 0,35 mg/kg, son doz olarak ise 3,15 mg/kg oranında hipofiz uygulanmıştır. Hipofiz enjeksiyonundan yaklaşık 12 saat sonra 0,1 g/L oranında hazırlanan olan MS 222 solüsyonu ile uyuşturulan damızlık balıklardan sperma ve yumurta abdominal masaj yöntemi ile sağım yoluyla alınmıştır. Sperm ve yumurtaya sağım sırasında sindirim artıklarının bulaşmasını önlemek amacıyla sağımdan 48 saat öncesinden sağım zamanına kadar anaç balıklara yem verilmemiştir. ozkurt



Resim 3.2. Damızlık balıkların anestezi madde ile uyuşturulması.



Resim 3.3. Dişi damızlık pullu sazan balıklarından abdominal yöntemle yumurta sağımı.



Resim 3.4. Erkek damızlık pullu sazan balıklarından abdominal masaj yöntemi ile tüplere sağılan sperm örnekleri.

### 3.1.4. Fiziksel Spermatojik Parametrelerin Belirlenmesi

Her tüpte yeralan spermanın fiziksel özelliklerinin belirlenmesi kapsamında, sperma miktarı, spermatozoa motilitesi ve canlılık süresi, spermatozoa yoğunluğu ve spermanın pH'ı belirlenmiştir. Bu kapsamda sperma miktarı, dereceli cam mezürler ile ml olarak, spermatozoa motilitesi (%) x200 büyütmede trinoküler faz kontrast mikroskopunda, spermatozoa canlılık süresi (s) hassas kronometre yardımıyla, spermatozoa yoğunluğu( $10^9/ml$ ) hemositometrik yöntemle, sperma pH'sı dijital pH metre ile, spermanın ozmolalitesi (mOsm) ise dijital ozmometre ile belirlenmiştir (Bozkurt ve diğ., 2005).



Resim 3.5. Spermatojik özelliklerin mikroskopta incelenmesi.

### 3.1.5. Sperma Sulandırıcılarının Hazırlanması

Sperm hücrelerinin dondurulmasında sukroz tabanlı sulandırıcı (3,4314 g sukroz, 0,3427 g NaCl, 21  $\mu$ l NaOH, %10 DMSO, 100 ml distile H<sub>2</sub>O, 0.5 ml antibiyotik, pH 7,7; Irawan et. al. 2010) kullanılmıştır. Hazırlanan sulandırıcıya ayrı ayrı olmak üzere %10, 15 ve 20 oranlarında ayrı ayrı olmak üzere kaz, ördek ve tavuk yumurta sarıları ilave edilmiş olup ayrıca yumurta sarısı içermeyen sulandırıcı grupları ile kontrol grubu (taze sperma) kullanılarak araştırma 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür.



Resim 3.6. Sperma sulandırıcısının hazırlanması.



Resim 3.7. %10, %15, %20 oranlarında kaz yumurta sarısı içeren sperma sulandırıcıları.



Resim 3.8. %10, %15, %20 oranlarında ördek yumurta sarısı içeren sperma sulandırıcıları.

### 3.1.6. Kanatlı Türlerine Ait Yumurta Sarılarının Analizi

Kaz, ördek ve tavuk yumurtalarının besin ve kuru madde kompozisyonu (protein yağ, kolestreol, kül) değerleri Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Teknoloji ve Araştırma Merkezi laboratuvarlarında analiz edilmiştir.

### 3.1.7. Sperm Hücrelerinin Dondurulması

Motilitesi %80 ve üzerinde olan sperma örnekleri 1:10 oranında belirtilen sulandırıcılar ile dilüe edildikten sonra spermalar 0,25 ml'lik payetlere çekilerek sıvı azot buharında (-120°C) 10 dk. süre ile dondurma işlemi uygulanmıştır. Bu işlemin ardından dondurulmuş sperma içeren payetler sıvı azot içerisinde (-196°C) muhafaza edilmiştir (Tekin ve diğ., 2007).

### 3.1.8. Dondurulan Sperm Hücrelerinin Çözdürülmesi

Dondurulan spermanın çözme işlemi, 0,25 ml'lik payette bulunan sperma için 30°C'deki su banyosunda 10 saniyede gerçekleştirilmiş olup çözme işleminin hemen ardından *in vitro* spermatolojik değerlendirmeler yapılmıştır.



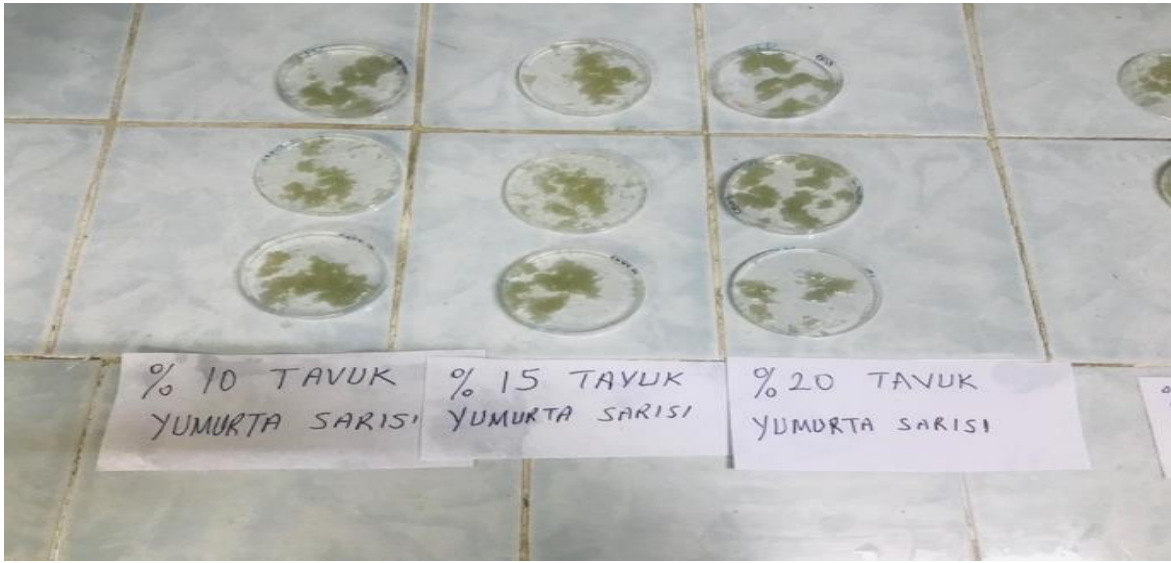
Resim 3.9. Payetlerde dondurulan sperm hücrelerinin su banyosunda çözündürülmesi.

### 3.1.9. Yumurtaların Fertilizasyonu ve İnkübasyonu

Taze ve çözündürülmüş sperm hücrelerinin fertilizasyon yeteneği, kuru fertilizasyon yöntemiyle belirlenmiştir. Spermanın çözürme işleminden hemen sonra, belirtilen konsantrasyondaki sperm hücreleri ( $3 \times 10^6$ ) kullanılarak, her bir deneme grubundaki 500 adet yumurtanın fertilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca taze sperma ile de aynı konsantrasyonda sperm hücreleri ve aynı sayıda yumurta kullanılmasıyla fertilizasyon işlemi yapılarak kontrol grubu oluşturulmuştur (Tekin ve diğ., 2003a).

Fertilizasyon işlemi tamamlanan yumurtalar, her grubunki ayrı olmak üzere petri kutularına yerleştirilip yumurtaların inkübasyonu sağlanmıştır. Fertilizasyon denemeleri 3 tekrarlı olarak dizayn edilmiştir. Fertilizasyonun değerlendirilmesinde; her bir petri kutusundan alınan 100'er adet yumurtanın mikroskop altında yapılan incelemelerinde, hücre bölünmeleri görülen yumurtaların döllendiği kabul edilerek fertilizasyon oranı hesaplanmıştır. Fertilizasyon oranının hesaplanmasında aşağıda belirtilen formül kullanılmıştır (Omitogun ve diğ., 2010).

Fertilizasyon Oranı (%) =  $(\text{Döllenen yumurta sayısı} / \text{Kullanılan toplam yumurta sayısı}) \times 100$



Şekil 3.10. Tavuk yumurta sarısı içeren sulandırıcı gruplarında döllenmiş yumurta görüntüleri.

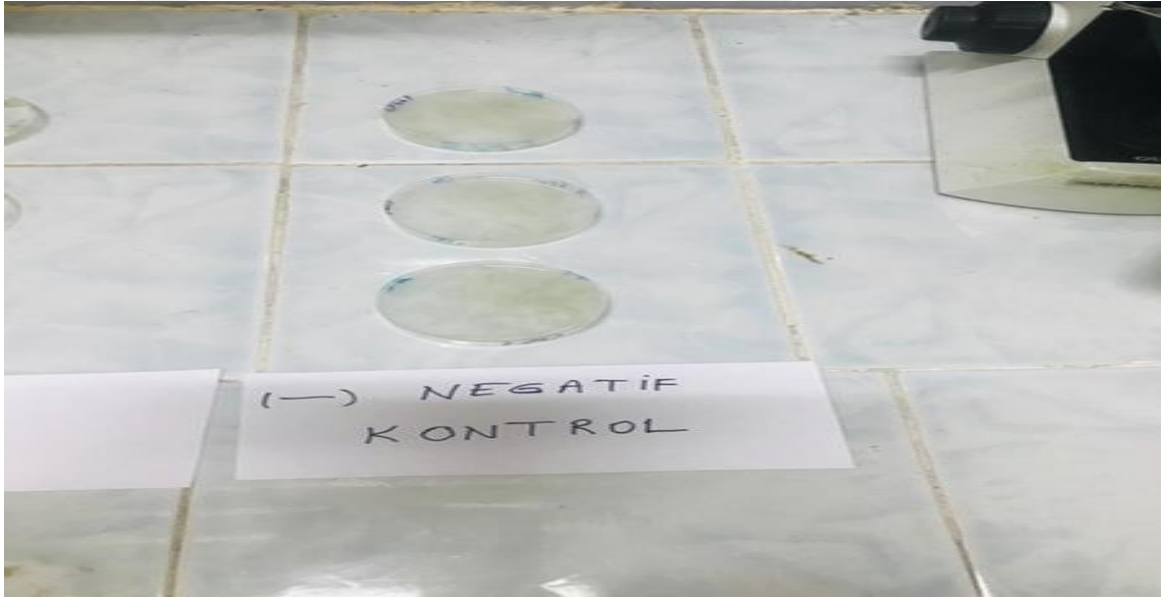


Resim 3.11. Ördek yumurta sarısı içeren sulandırıcı gruplarında döllenmiş yumurta görüntüleri.





Resim 3.12. Kaz yumurta sarısı içeren sulandırıcı gruplarında döllenmiş yumurta görüntüleri.



Resim 3.13. Kontrol grubunda döllenmiş yumurta görüntüleri.

### 3.1.10. Verilerin Değerlendirilmesi

Araştırmada elde edilecek verilerin istatistiksel olarak analizinde; verilerin ortalama değerleri ve standart hataları hesaplanarak çok yönlü varyans analizi uygulanmış olup, deney grupları arasındaki farklılıklar değerlendirilmiştir ( $p < 0.05$ ). Farklılığı önemli olan gruplar Duncan testi ile belirlenerek, istatistiksel veriler arasındaki korelasyonların tesbitinde Korelasyon Katsayısı Analizi testinden faydalanılmıştır.

## 4. SONUÇLAR

### 4.1. Damızlık Erkek Sazan Balıklarının Canlı Ağırlık ve Boy Değerleri

Çalışmada kullanılan 13 adet damızlık erkek pullu sazan (*Cyprinus carpio*) balığına ait canlı ağırlık ve boy ölçüm değerleri Çizelge 4.1’de görülmektedir. Erkek damızlık balıklarda canlı ağırlıklar en düşük 650 g, en yüksek 2900 g, ortalama  $1563,07 \pm 698,22$  g olarak, boyları ise en düşük 35 cm, en yüksek 56 cm, ortalama  $45,69 \pm 6,26$  cm olarak tespit edildi.

Çizelge 4.1. Damızlık sazan balıklarının ağırlık ve boy ölçüm değerleri.

Balık No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Ortalama
Ağırlık (g)	1300	2600	1290	1900	1900	1300	1100	2250	2900	1400	980	750	650	$1563,07 \pm 698,22$
Boy (cm)	45,5	56,0	42,0	48,5	49,5	44,0	41,5	51,0	55,0	45,0	40,0	37,0	35,0	$45,69 \pm 6,26$

### 4.2. Damızlık Sazan Balığının Bazı Spermatolojik Özellikleri

Yapılan çalışmada, 13 adet erkek pullu sazan (*Cyprinus carpio*) balığından sağılan spermada başlıca spermatozolojik özelliklerden sperma miktarı (ml), spermatozoa motilitesi (%), spermatozoa yoğunluğu ( $\times 10^9/\text{ml}$ ), total spermatozoa sayısı ( $\times 10^9$ ), sperma pH’sı ve sperma rengi belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Erkek damızlık pullu sazan (*Cyprinus carpio*) balığının ortalama spermatolojik özellikleri (n=13).

Miktar (ml)	Motility (%)	Motility Süresi (s)	Yoğunluk ( $\times 10^9/\text{mL}$ )	Total Yoğunluk ( $\times 10^9$ )	pH	Renk
$15,46 \pm 0,24$	$92,50 \pm 5,40$	$84,28 \pm 2,46$	$15,27 \pm 3,60$	$198,51 \pm 5,48$	$7,25 \pm 0,15$	Süt Beyazı

Pullu sazan balıklarından sağılan taze spermada sperma miktarı 4,2–25,7 ml aralığında ortalama  $15,46 \pm 0,24$  ml, spermatozoa motilitesi %70-95 aralığında ortalama  $92,5 \pm 5,40$ , motilite süresi 75-105 s aralığında ortalama  $84,28 \pm 2,46$  s, spermatozoa yoğunluğu  $12,3 \times 10^9$ –

22,5x10<sup>9</sup>/ml aralığında ortalama 15,27±3,60x10<sup>9</sup>/ml, total spermatozoa yoğunluğu 159,9x10<sup>9</sup>–292,5x10<sup>9</sup> aralığında ortalama 198,51±5,48x10<sup>9</sup>, sperma pH'sı ortalama 7,25±0,15 sperma rengi ise süt beyazı olarak belirlenmiştir.

#### 4.3. Kanatlı Yumurta Sarılarının Kimyasal Kompozisyonu

Kimyasal analizi yapılan ördek, kaz ve tavuk yumurta sarılarının protein, total yağ, kuru madde ve ham kül kompozisyonları Çizelge 4.3.'te belirtilmiştir. Yapılan analize göre, ördek yumurta sarısının daha fazla protein içerdiği (P<0.05), kaz yumurta sarısının ise daha fazla total yağ, kuru madde ve ham kül içerdiği belirlenmiştir (P<0.05).

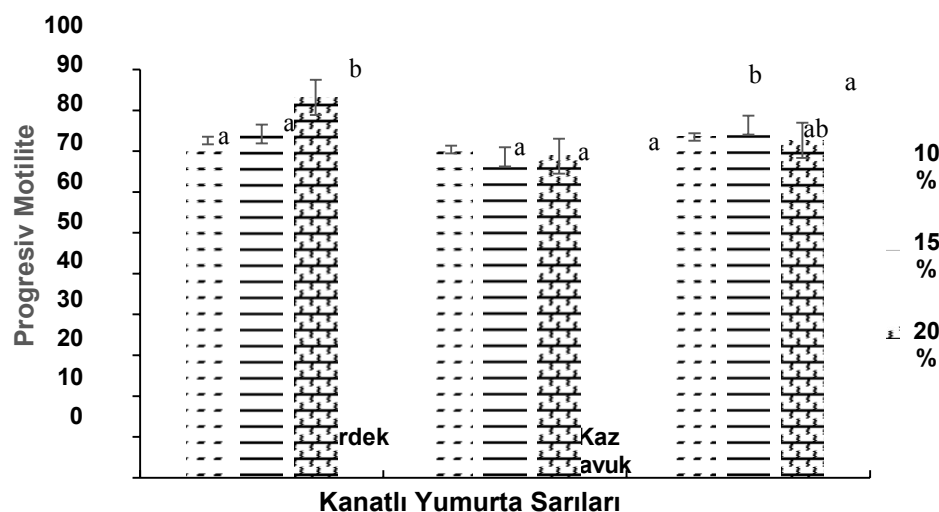
Çizelge 4.3. Çalışmada kullanılan kanatlı türlerine ait yumurtaların bazı kimyasal içerikleri

Yumurta Orjini	Protein	Total Yağ	Kuru Madde	Ham Kül
Ördek	18,4 <sup>b</sup>	27,0 <sup>a</sup>	53,8 <sup>ab</sup>	2,1 <sup>ab</sup>
Kaz	15,6 <sup>a</sup>	34,7 <sup>b</sup>	56,4 <sup>b</sup>	2,4 <sup>b</sup>
Tavuk	16,8 <sup>ab</sup>	29,6 <sup>a</sup>	51,0 <sup>a</sup>	1,6 <sup>a</sup>

\*Farklı harf taşıyan grup ortalamaları arasındaki farklılık önemlidir (P<0,05).

#### 4.4. Farklı Oranlarda Sulandırıcıya İlave Edilen Kanatlı Yumurta Sarılarının Ekilibrasyon Sonrası Motilite Üzerine Etkileri

Çalışmada, temel sulandırıcıya ilave edilen farklı kanatlı yumurta sarılarının ekilibrasyon sonrası elde edilen ortalama progresiv motilite değerleri Şekil 4.1'de verilmiştir.

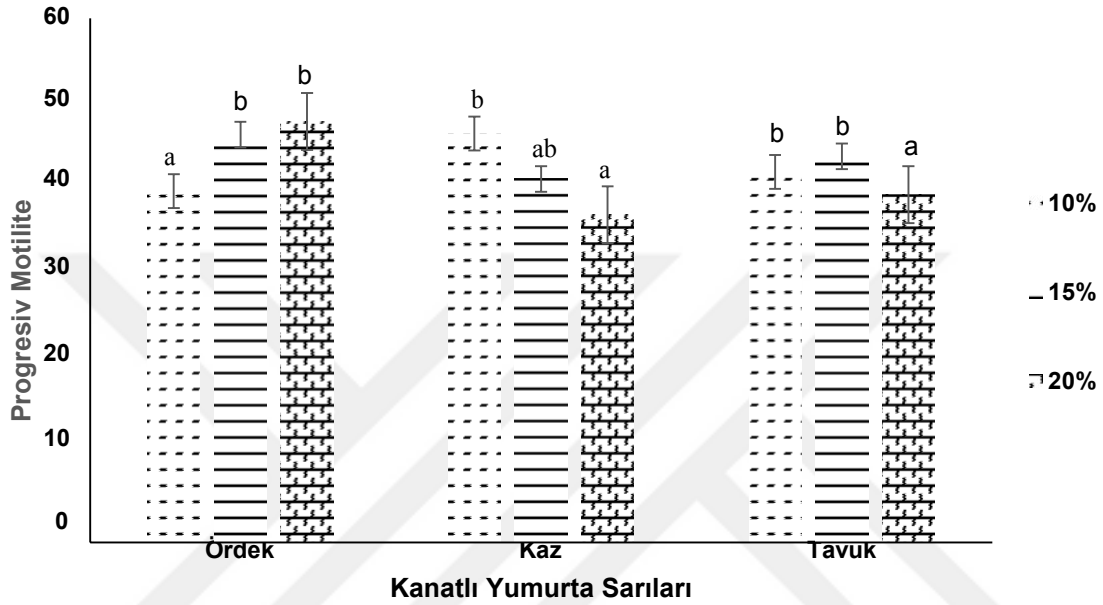


Şekil 4.1. Farklı kanatlı yumurta sarılarının pullu sazan (*Cyprinus carpio*) spermasının ekilibrasyon sonrası progresiv motilite üzerine etkisi.

\*Farklı harf taşıyan grup ortalamaları arasındaki farklılık önemlidir ( $P<0,05$ ).

#### 4.5. Farklı Oranlarda Sulandırıcıya İlave Edilen Kanatlı Yumurta Sarılarının Ekilibrasyon Sonrası Motilite Süresi Üzerine Etkileri

Çalışmada, temel sulandırıcıya ilave edilen farklı kanatlı yumurta sarılarının ekilibrasyon sonrası elde edilen ortalama progresiv motilite süresi değerleri Şekil 4.2’de verilmiştir.



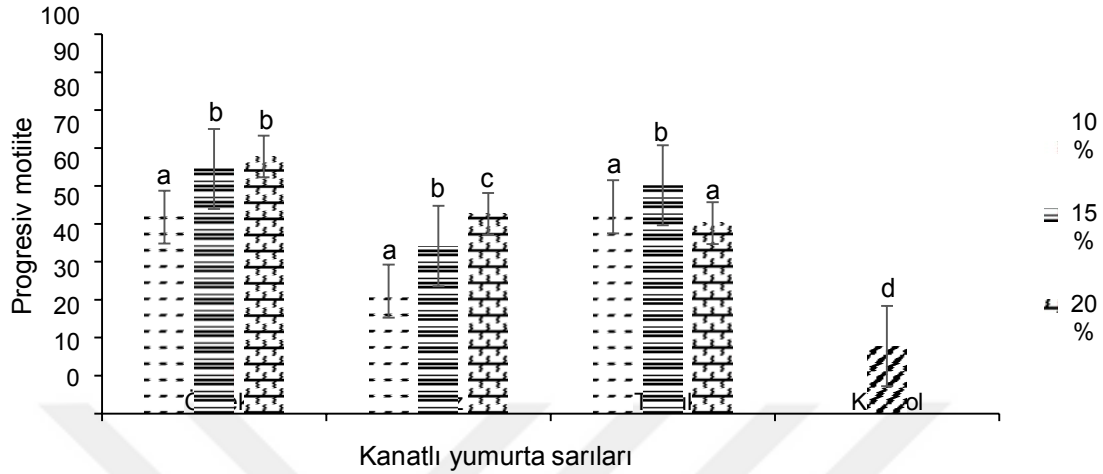
Şekil 4.2. Farklı kanatlı yumurta sarılarının pullu sazan (*Cyprinus carpio*) spermasının ekilibrasyon sonrası progresiv motilite süreleri üzerine etkisi.

\*Farklı harf taşıyan grup ortalamaları arasındaki farklılık önemlidir ( $P<0,05$ ).

Elde edilen bulgulara göre, ördek yumurta sarısı diğer kanatlı yumurta sarılarına göre ekilibrasyon sonrası motilite (%68,8) ve motilite süresi (32,6 s) bakımından en iyi koruyucu etkiyi göstermiştir ( $P<0,05$ ; Şekil 4.1 ve 4.2). Kaz yumurta sarısı içeren sulandırıcılar, ekilibrasyon sonrası sperm motilitesi ve motilite süresi bakımından ördek ve tavuk yumurta sarılarına göre düşük korumayı sağlamıştır ( $P<0,05$ ).

#### 4.6. Farklı Oranlarda Sulandırıcıya İlave Edilen Kanatlı Yumurta Sarılarının Çözdürme Sonrası Motilite Üzerine Etkileri

Çalışmada, temel sulandırıcıya ilave edilen farklı kanatlı yumurta sarılarının dondurma-çözdürme sonrası elde edilen ortalama progresiv motilite değerleri Şekil 4.3’de verilmiştir.

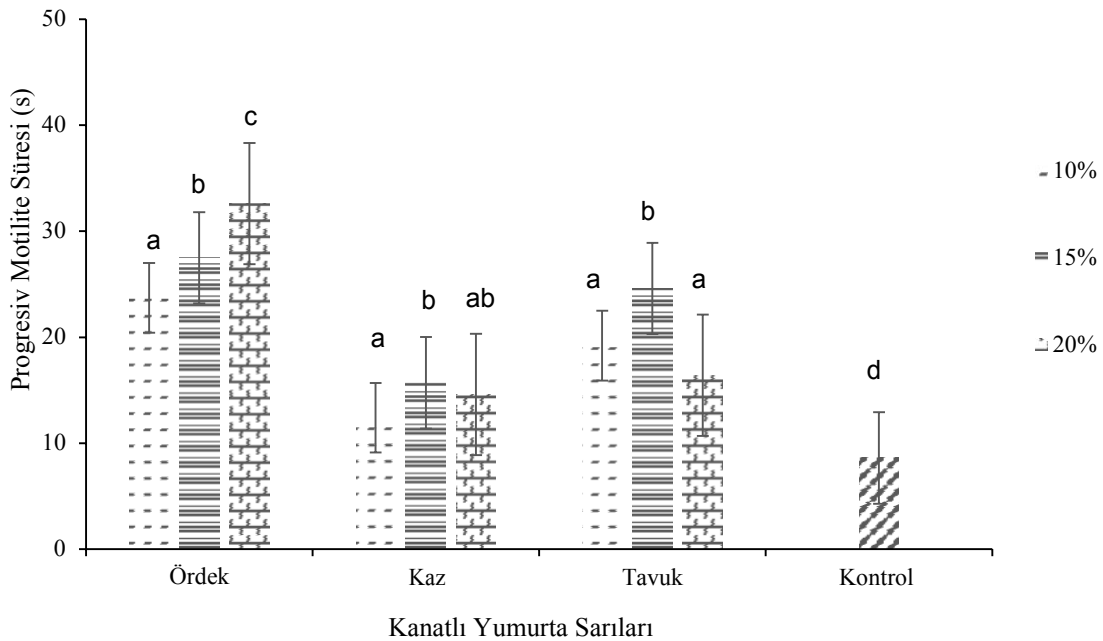


Şekil 4.3. Farklı kanatlı yumurta sarılarının pullu sazan (*Cyprinus carpio*) spermasının çözüm sonu progresiv motiliteleri üzerine etkisi.

\*Farklı harf taşıyan grup ortalamaları arasındaki farklılık önemlidir ( $P < 0,05$ ).

#### 4.7. Farklı Oranlarda Sulandırıcıya İlave Edilen Kanatlı Yumurta Sarılarının Çözdürme Sonrası Motilite Süresi Üzerine Etkileri

Çalışmada, temel sulandırıcıya ilave edilen farklı kanatlı yumurta sarılarının dondurma-çözdürme sonrası elde edilen ortalama motilite süresi değerleri Şekil 4.4’de verilmiştir.

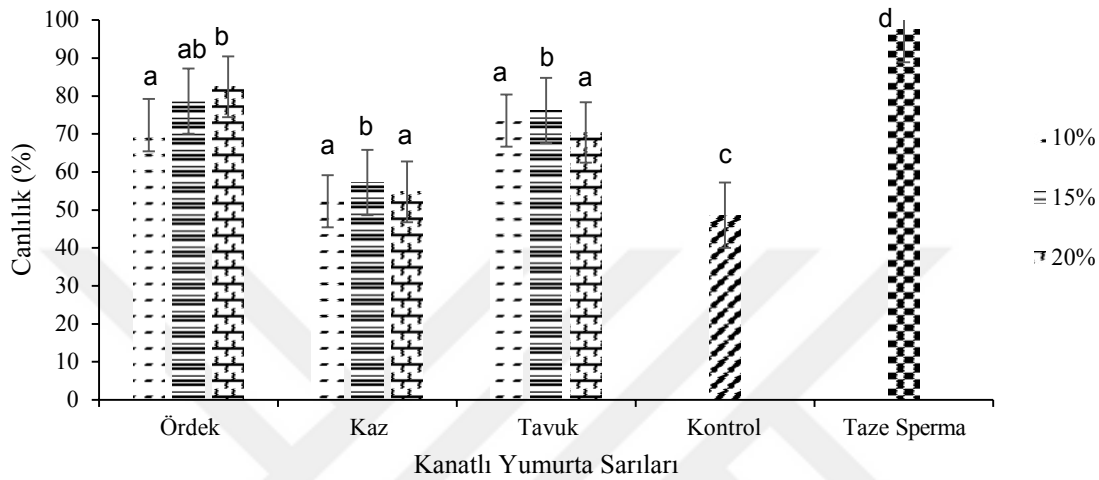


Şekil 4.4. Farklı kanatlı yumurta sarılarının pullu sazan (*Cyprinus carpio*) spermasının çözüm sonu progresiv motilite süreleri üzerine etkisi.

\*Farklı harf taşıyan grup ortalamaları arasındaki farklılık önemlidir ( $P<0,05$ ).

#### 4.8. Farklı Oranlarda Sulandırıcıya İlave Edilen Kanatlı Yumurta Sarılarının Çözdürme Sonrası Canlılık Üzerine Etkileri

Çalışmada, temel sulandırıcıya ilave edilen farklı kanatlı yumurta sarılarının dondurma-çözdürme sonrası elde edilen ortalama canlılık değerleri Şekil 4.5’de verilmiştir.



Şekil 4.5. Farklı kanatlı yumurta sarılarının pullu sazan (*Cyprinus carpio*) spermasının çözüm sonu canlılık oranları üzerine etkisi.

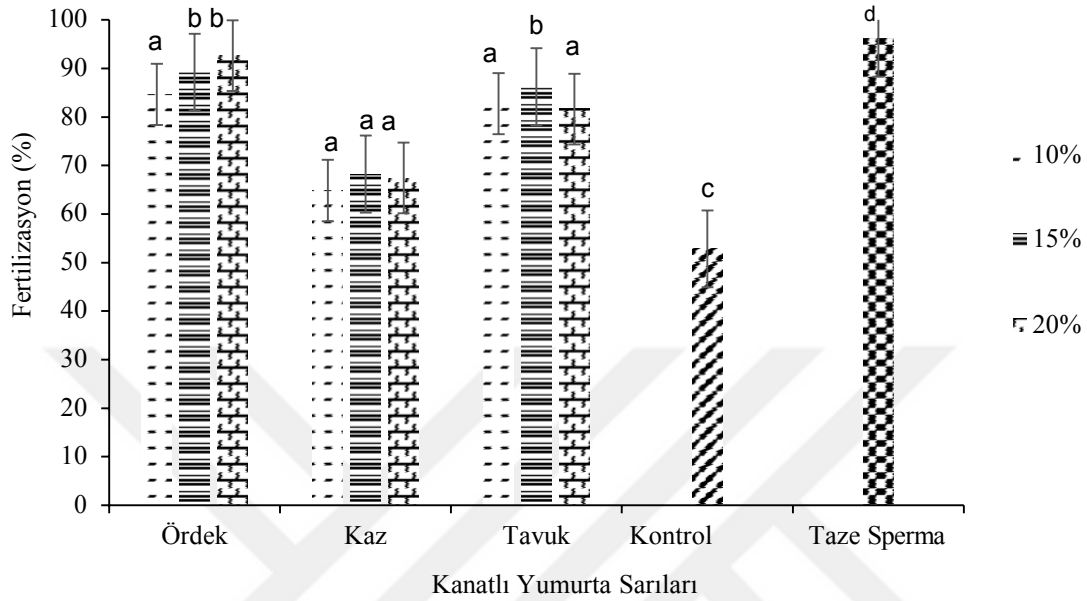
\*Farklı harf taşıyan grup ortalamaları arasındaki farklılık önemlidir ( $P<0,05$ ).

Elde edilen bulgulara göre, ördek yumurta sarısı diğer kanatlı yumurta sarılarına göre progresiv motilite (%68,8) ve motilite süresi (32,6 s) bakımından en iyi koruyucu etkiyi göstermiştir ( $P<0,05$ ; Şekil 4.3 ve 4.4). Ayrıca, ördek yumurta sarısı içeren sulandırıcılar, kaz ve tavuk yumurta sarısı içeren sulandırıcılara göre en yüksek canlılık oranını (%82,4) sağlamıştır ( $P<0,05$ ; Şekil 4.5). Kaz yumurta sarısı içeren sulandırıcılar, progresiv sperm motilitesi, motilite süresi ve canlılık oranları bakımından dondurulan sperm hücrelerine en düşük korumayı sağlamıştır ( $P<0,05$ ). Üç tür yumurta sarısı ile takviye edilen sperma sulandırıcıları, yumurta sarısı içermeyen kontrol grubuna göre tüm çözüm sonu sperm kalite parametreleri bakımından bir artış sağlamıştır ( $P<0,05$ ).

#### 4.9. Farklı Oranlarda Sulandırıcıya İlave Edilen Kanatlı Yumurta Sarılarının Çözdürme Sonrası Fertilizasyon Üzerine Etkileri

Sukroz tabanlı sulandırıcıya farklı kanatlı yumurta sarılarının ilave edilen gruplarda, yumurta sarısı ilave edilmeyen kontrol grubuna göre çözüm sonu fertilizasyon oranlarında belirgin bir

artış belirlendi ( $P<0,05$ ). Yumurta sarısı ilave edilen tüm gruplarda fertilizasyon oranları %50'nin üzerinde belirlendi. En yüksek çözüm sonu fertilizasyon sonucu %20 oranında ördek yumurta sarısı ilave edilen grupta %94 olarak belirlendi ( $P<0,05$ ). En düşük fertilizasyon oranları, kaz yumurta sarısı ilave edilen gruplarda belirlendi ( $P>0,05$ ; Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Farklı kanatlı yumurta sarılarının pullu sazan (*Cyprinus carpio*) spermasının çözüm sonu fertilizasyon oranları üzerine etkisi.

\*Farklı harf taşıyan grup ortalamaları arasındaki farklılık önemlidir ( $P<0,05$ ).

## 5. TARTIŞMA

Kriyobiyolojik çalışmalar, Polge ve diğ. (1949) gliserolün kriyoprotektiv (soğuk şokuna karşı koruma sağlayıcı) özelliğini keşfetmesinden sonra başlamış olup ilk dondurulan hücre ise sperm hücresi olmuştur. Akuakültürde sperm kriyoprezervasyon çalışmaları kapsamında, balık spermasının dondurulması ile ilgili ilk başarılı çalışma Holtz (1993) tarafından ringa balıkları ile yapılmıştır.

Sperm kriyoprezervasyon biyoteknolojisi, sperm hücresinin metabolizmasının yavaşlatılıp hareket enerjisinin azaltılması ve fertil ömrünün uzatılması esasına dayanmaktadır. Bu biyoteknoloji sayesinde; damızlık erkek balıklardan abdominal masaj yoluyla alınan spermada gerekli spermatolojik muayenelerin yapılması, tekniğine uygun olarak sulandırılması ve paketlenmesinin ardından düşük sıcaklık değerlerinde (-79°C veya -196°C) dondurularak korunması ve fertilizasyon amacıyla kullanılması mümkün olmaktadır.

Diğer taraftan kriyoprezervasyon işlemi süresince oluşan fiziksel ve biyokimyasal değişimler, türe özgü olarak uygulanan protokollerin optimizasyonunu zorunlu hale getirmektedir. Bu bağlamda, kültüre alınan türlerin ıslahı ve genetik özelliklerin aktarılmasında önemli bir yeri olan sperm kriyoprezervasyonunda; sperma kalitesi, kullanılan sulandırıcı ve kriyoprotektan türlerinin yanında ekilibrasyon süresi ile dondurma ve çözündürme aşamaları başarıyı ve optimizasyonu etkileyen önemli faktörler arasında yer almaktadır (Stanescu ve Birtoiu, 2012). Bu bağlamda, sperm kriyoprezervasyonuna yönelik çalışmaların başlangıç noktasını sperma kalitesinin belirlenmesi oluşturmaktadır. Dolayısıyla bu çalışmada ilk olarak damızlık sazan balıklarında miktar, motilite, canlılık süresi, yoğunluk, total spermatozoa sayısı, pH ve renk gibi sperma kalitesini teşkil eden temel spermatolojik parametreler incelenmiştir.

Tekin ve diğ. (2003b)'ne göre, akuakültürde erkek cinsiyetteki balığın damızlık olarak kullanılabilmesi için spermatolojik özelliklerinin çok iyi bilinmesi gerekmektedir. Çünkü sperma kalitesi, yumurtaların dölllenme oranı ve üretilen yavru balık miktarını doğrudan etkilediğinden damızlık yönetimi açısından oldukça önemli bir kriterdir.

Sazan balıkları mevsime bağlı olarak üreme aktivitesi göstermekte olup damızlık balıkların spermatolojik özellikleri mevsimsel değişikliklere bağlı olarak değişim gösterebilmektedir. Bu konuda yapılan çalışmalar incelendiğinde, Bozkurt ve Seçer (2005b) üreme mevsiminin



başında düşük olan sperma miktarının üreme mevsiminin ortasında artış gösterdiğini ve üreme mevsiminin sonunda ise tekrar azaldığını bildirmektedir. Nitekim bu konuda yapılan çalışmalar sperm miktarının *Cyprinidae* familyasına mensup sazın türlerinde de farklılık gösterdiği görülmektedir. Bu noktadan hareketle, Horvath ve Lukowicz (1982) üreme mevsimi boyunca sperm miktarının sazın balıklarında 10-20 ml, ot sazında 10-20 ml, gümüş sazında 5-15 ml ve büyükbaş sazında ise 10-12 ml olarak değiştiğini bildirmiştir.

Akçay ve diğ. (2002) aynalı sazın'larda yaptıkları bir çalışmada sperm miktarının 1 ile 40 ml arasında değişim gösterdiğini ve ortalama  $13,26 \pm 2.51$  ml olarak belirlemişlerdir. Faramarzi (2012), gümüş sazınlarında sperm miktarını  $13,17 \pm 5.39$  ml olarak bildirmiştir. Bozkurt ve diğ. (2011) ot sazınları ile yaptıkları bir çalışmada ortalama sperm miktarı  $7,2 \pm 0,4$  ml olarak bildirmiştir. Yapılan bu çalışmada ise sperm miktarı en yüksek 28 ml, en düşük 0,9 ml ve ortalama  $8,95 \pm 3,14$  ml olarak belirlenmiştir. Sperm miktarı bakımından oluşan bu farklılıkların balığın yaşı, beslenmesi, sağım aralığı ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişim gösterdiği düşünülmektedir.

Akuakültürde yavru üretimini artırmanın yolu yumurtaların döllenme kapasitelerinin artırılmasından geçmektedir. Bu bağlamda, sperm hücrelerinden sadece motil özellik gösterenlerin yumurtayı döllenebilme potansiyeli olduğu düşünüldüğünde sperm hücrelerinin motilitelerinin belirlenmesi oldukça önemlidir. Testislerde ve sağıldığında inaktif durumda olan sperm hücrelerinin "motil" özelliklerinin belirlenebilmesi için aktif hale getirilmeleri gerekmektedir. Bu amaçla, yürütülen bu çalışmada %03'lük NaCl'den faydalanılmış olup ortalama spermatozoa motilitesi  $87,30 \pm 7,80$  olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada belirlenen spermatozoa motilite sonuçları birçok araştırmacının (Linhart ve diğ., 2000; Akçay ve diğ., 2002, Warnecke ve Pluta, 2003; Bozkurt, 2004, Tabakoğlu, 2005; Bozkurt, 2006a, Yavaş ve Bozkurt, 2011; Bozkurt ve diğ., 2011) belirlediği motilite sonuçlarına yakın değerlerde olduğu görülmüştür. Diğer taraftan Faramarzi (2012), gümüş sazınları ile yaptığı çalışmada spermatozoa motilitesini ortalama %63,18 olarak bildirmiştir. Belirlenen bu farklılığın kullanılan aktivasyon solüsyonu, sulandırma oranı, damızlık balığın yaşına ve çalışmanın yapıldığı üreme mevsiminin zamanından ileri geldiği düşünülmektedir.

Çalışmada sperm hücrelerinin ortalama motilite süresi  $75,07 \pm 14,25$  s olarak belirlenmiştir. Bu konuda yapılan çalışmalarda çoğunlukla sperm hücrelerinin canlılık süreleri üzerinde durulmuştur. Bu bağlamda, konu ile ilgili olarak aynalı sazın üzerinde yapılan çalışmalarda

sperm hücrelerinin ortalama canlılık sürelerini Bozkurt (2006b) 552 s, Akçay ve diğ. (2002)  $517 \pm 0,90$  s ve Bozkurt (2004)  $360,16 \pm 177,00$  s olarak bildirmektedirler. Belirlenen farklılıkların kullanılan aktivasyon solüsyonu, sulandırma oranı, yaş ve çevresel faktörlerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bu çalışmada ortalama spermatozoa yoğunluğu  $11,5 \pm 3 \times 10^9$ /ml olarak tespit edilmiştir. Konu ile ilgili olarak Akçay ve diğ. (2002), aynalı sazanda spermatozoa yoğunluğunu ortalama  $17,33 \pm 1,22 \times 10^9$ /ml olarak belirlerken, Emri ve diğ. (1998), üreme mevsimi boyunca sazanalarda spermatozoa yoğunluğunun  $7 \pm 1 \times 10^9$  ile  $14 \pm 2 \times 10^9$ /ml arasında değiştiğini, Lubzens ve diğ. (1997) ise spermatozoa yoğunluğunun  $5,6 \times 10^9$  ile  $32,5 \times 10^9$ /ml arasında değiştiğini ve ortalama  $14,97 \pm 5,35 \times 10^9$ /ml olduğunu belirtmektedirler. Diğer taraftan, Faramarzi (2012), gümüş sazanlarında spermatozoa yoğunluğunu  $29,67 \times 10^9$ /ml olarak belirlemiştir. Yavaş ve Bozkurt (2011) ot sazanlarında spermatozoa yoğunluğunu  $16,8 \times 10^9$ /ml olarak belirlerken, aynı tür üzerine yaptıkları bir başka çalışmalarında ise  $12,4 \times 10^9$ /ml olarak belirlemişlerdir (Bozkurt ve diğ., 2011). Yapılan çalışmalarda belirlenen sonuçlar arasındaki farklılıkların sulandırma oranı, yaş, üreme mevsimi ile değerlendirme yönteminin farklı olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Yapılan bu çalışmada sperma pH'sı ortalama  $7,65 \pm 0,46$  olarak belirlenmiştir. Sperm pH'sının ölçümünde, pH indikatör kağıtları kullanılmıştır (Kruger ve diğ., 1984). Zhukinskij ve Bilko (1984), pH ölçümünü standart pH elektrodu ile yapmışlar ve değerler sazanlar için 7,85 ile 8,37 arasında olduğunu belirtmiştir. Akçay ve diğ. (2002), aynalı sazanda yaptığı çalışmada sperma pH'sını ortalama  $8,06 \pm 0,08$ , Faramarzi (2012), gümüş sazanları üzerinde yaptığı çalışmada sperma pH'sını ortalama  $7,59 \pm 0,74$ , 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 diğ., 2011), sperma pH'sı ortalama 7.3 olarak tespit edildiği kaydedilmektedir. Çalışmada elde edilen sperma pH değerleri araştırmacıların bulgularıyla benzerlik göstermektedir.

Çalışmada pullu sazan spermasının renginin tüm balıklarda süt beyazı renge olduğu tespit edildi. Süt beyazı rengi; Bozkurt (2004), Faramarzi (2012), Tabakoğlu (2005) ile Bozkurt ve diğ. (2009)'nin yaptıkları çalışmalarda tespit ettikleri renk ile benzerlik göstermektedir. Sperma renginin sazanlarda büyük çoğunlukla süt beyazdan krem renge kadar değişebildiği

ve bu renk değişiminin özellikle beslenme, çevre şartları ve hastalık etkileri ile meydana gelebileceği bildirilmektedir (Seçer, 1998).

Sperm hücrelerinin dondurularak muhafaza edilmesinde standart bir işlem haline gelen kriyoprezervasyon, spermatozoanın yaşayabilmesi için gerekli olan ideal koşulların sağlanmasını gerektirmektedir (Bozkurt ve Seçer, 2005b). Bu bağlamda, türün seminal plazma kompozisyonuna benzer iyonik temelli sulandırıcı formülasyonları kullanılabileceği gibi karbohidrat bazlı sulandırıcılarda kullanılabilmektedir (Bozkurt, 2011). Yapılan bu çalışmada sukroz içeren karbohidrat tabanlı sulandırıcı kullanılmıştır. Çeşitli araştırmacılar, karbohidrat tabanlı sulandırıcıların birçok balık türünde başarılı bir şekilde kullanılabildiğini belirtmişlerdir (Akçay ve diğ., 2004; Bozkurt ve diğ., 2005; Bozkurt ve diğ., 2016). Karbohidrat tabanlı sulandırıcıların başarısı içerdikleri enerji sağlayıcı bileşenlerden ileri geldiği düşünülmektedir.

Sperm hücrelerinin plazma membranları; dondurma ve çözdüme sırasında oluşan hücre hasarlarından ve özellikle buz kristallerinin oluşmasından dolayı zarar görmektedir. Bu etkiyi en aza indirmek için kriyoprotektanlar kullanılmaktadır. Bu amaçla glikol, gliserol, DMSO, DMA ve metanol gibi farklı kriyoprotektanların etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda genellikle DMSO'nun çözdüme sonrası motilite üzerine en iyi sonucu verdiği belirlenmiştir (Suquet ve diğ., 2000). Yapılan bu araştırmalara benzer şekilde bu çalışmada da %10 oranında DMSO kullanılmıştır. DMSO'nun diğerlerine göre daha etkili olmasının, hızlı penetrasyon özelliği ve spermanın fosfolipit tabakasıyla etkileşime girmesinden kaynaklandığı belirtilmektedir (Suquet ve diğ., 2000).

Spermanın dondurulmasından önce göz ardı edilmesi gereken önemli bir noktada spermanın sulandırma oranıdır. Spermanın sulandırılma oranı, araştırmacılara ve uygulanan balık türüne göre 1:1 ile 1:20 oranları arasında değişim göstermektedir. Bu bağlamda bu çalışmada 1:10 oranında sulandırma oranı kullanılmıştır. Bu konuda yapılan çalışmalarda, sulandırma oranı artırıldığında çözdüme sonrası motilite oranı ve süresinin azaldığı bildirilmektedir. Chambeyron ve Zohar (1990), çipuralarda 1:50 oranında sulandırılan spermanın, daha düşük oranda sulandırılanlara göre çözdüme sonrası motilitesinin daha düşük olduğunu belirlemiştir. Billard (1983), gökkuşuğı alabalığı spermatozoalarının fertilizasyon yeteneği üzerine farklı sulandırıcıların ve farklı sulandırma oranlarının etkisini incelediği çalışmada, 1:10'luk sulandırma oranında spermatozoanın fertilizasyon yeteneğini koruduğunu, ancak yüksek sulandırma oranlarında ise belirgin bir düşüş olduğunu bildirmiştir. Araştırmacı bu

durumu spermatozoaların düşük sulandırma oranlarında motilitelerini daha uzun süre koruyabilmelerine bağlamıştır.

Spermayı çözdürme işlemi, dondurulmuş sperma içeren payet veya peletlerin 5-40°C sıcaklık aralığındaki su banyosuna farklı sürelerde daldırılması suretiyle uygulanan bir işlemdir. Kriyoprezervasyon işleminden sonra spermatozoaların büyük çoğunluğu hasarlı membran ve mitokondriye sahiptir. Bu nedenle, çözdürülmüş spermanın hemen kullanılması fertilizasyon oranını artırmaktadır. Çözdürme aşamasının hızlı geçilmesi kristalizasyonu önlemek için gereklidir (Suquet ve diğ., 2000). Dondurulmuş spermada hem canlılık oranı düşmekte hem de spermatozoaların fonksiyonları azalmaktadır. Bunun nedenleri arasında sperm hücrelerinin soğuk şokuna uğramaları, ozmotik strese maruz kalmaları ve hücre içi buz kristalizasyonunun meydana gelmesi gösterilmektedir (Cabrita ve diğ., 2005). Yapılan bu çalışmada 0,25 ml hacimdeki payetlerde dondurulan sperma 30°C'deki su banyosunda 10 s'de çözdürülmüştür. Kriyoprezervasyon işleminin en önemli kontrol testi hiç şüphesiz fertilizasyon uygulamalarıdır. Fertilizasyon sonuçlarını etkileyen faktörlerden birisi de spermanın paketlenme şeklidir. Spermanın paketlenmesi, dondurma yöntemi ile doğrudan ilişkili olup payet yöntemine göre dondurulan sperma 0,25, 0,50, 1,2 ve 4,5 ml'lik hacimlerdeki payetlerde paketlenmekte ve dondurulmaktadır. Pelet yönteminde ise sperma 0,1 ile 1,0 ml arasında değişen hacimlerde kuru buz üzerinde pelletler halinde dondurulmaktadır. Bu konuda yapılan çalışmalar incelendiğinde bazı araştırmalarda pellet yöntemi ile kriyoprezervasyonda yüksek fertilizasyon oranları (%70-%90 arasında) elde edilmiştir (Holtz, 1993). Buna karşın bazı araştırmacılar ise büyük payetlerde (1,2-4,5 ml) spermanın dondurulmasının pratik olarak daha kolay ve kullanışlı olduğunu bildirmiştir (Wheeler ve Thorgard, 1991). Bu çalışmada sperma 0,25 ml'lik payetlerde dondurulmuştur.

Akuakültür alanındaki kriyobiyolojik çalışmalarda fertilizasyon başarısında, izlenen dondurma prosedürünün yanı sıra kullanılan sulandırıcı ve kriyoprotektanlar ile bunların birbiriyle olan etkileşimi de önemli rol oynamaktadır. Bu bağlamda yapılan çalışmalar incelendiğinde, Steyn ve diğ. (1989), alabalık spermasının kriyoprezervasyonunda %5-20 oranında yumurta sarısı bulunan karbohidrat kökenli sulandırıcılarla elde edilen fertilizasyon oranlarının, yumurta sarısı içermeyen sulandırıcılara göre oldukça yüksek olduğunu bildirmiştir (Steyn ve diğ., 1989). Babiak ve diğ. (2001), glukoz ve sukroz sulandırıcılarını kullandıkları çalışmada DMSO, DMA, etilen glukol, metanol ve propanediol gibi kriyoprotektanlarda %0 ile %65 arasında değişen fertilizasyon sonuçları bildirmiştir.

Memeli türleri üzerinde yapılan çalışmalar, kanatlı yumurta sarılarının kriyoprezervasyon işlemi sonrasında sperma kalitesi ve dölverimini geliştirdiğini göstermiştir (Aboagla ve Terada, 2004; Clulow ve diğ., 2007; Moreno ve diğ., 2008; Akhter ve diğ., 2017). Diğer taraftan, balık spermasının kriyoprezervasyonunda sulandırıcı bileşeni olarak farklı kanatlı yumurta sarılarının kullanımına ilişkin sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Bozkurt ve diğ., 2014; Abinawanto ve diğ., 2021).

Memeli türleri ile bu konuda yapılan çalışmalar, çözüm sonu sperm kalitesinde belirlenen değişimlerin yağ asiti ve kolesterol başta olmak üzere sulandırıcı bileşeni olarak kullanılan kanatlı yumurta sarılarının biyokimyasal kompozisyonu ile bağlantılı olduğunu göstermiştir (Bathgate ve diğ., 2006). Nitekim, birçok araştırmacı kanatlı yumurta sarılarının kimyasal kompozisyonlarının bu bileşenin kriyoprezervasyon işlemi sırasında hücreler üzerindeki koruyucu yeteneğini etkileyebileceğini ortaya koymuştur (Bathgate ve diğ., 2006; Moreno ve diğ., 2008; Surai ve diğ., 1999).

Yürütülen bu çalışmada, ördek yumurta sarısı içeren sulandırıcı ile dondurulan pullu sazan spermasının çözüm sonu kalitesinin ve fertilizasyon yeteneğinin diğer yumurta sarısı içeren sulandırıcılardan daha fazla olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla bu sonuç, ördek yumurta sarısının daha fazla protein ve tekli doymamamış yağ asiti içeriği ile daha düşük lipit ve kolesterol içermesine bağlanabilir. Nitekim, yumurta sarısı içeriğinde bulunan protein ve yağ asiti komponentlerinin kriyoprezervasyon boyunca spermayı koruyucu etki gösterdiği yapılan çalışmalarda belirlenmiştir (Prasard ve diğ., 1988; Maurice ve diğ., 1994). Buradan hareketle, ördek yumurta sarısında bu iki komponentin yüksek seviyede bulunması, Prasard ve diğ. (1988) ile Maurice ve diğ. (1994)'nin bulgularıyla benzerlik göstermekte olup çözdürme sonrası sperma kalitesi ve fertilité bakımından diğer kanatlı yumurta sarısı gruplarına göre daha iyi sonuçlar alınmasına sebep olduğu belirtilebilir.

Benzer şekilde, bizon (Akhter ve diğ., 2017; Waheed ve diğ., 2012), aygır (Webb ve diğ., 2011; Burris ve diğ., 2009; Clulow ve diğ., 2007), boğa (Su ve diğ., 2008), ve koç (Ali ve diğ., 2013; Gholami ve diğ., 2012)'lar ile yürütülen sperm kriyoprezervasyonu çalışmalarında da tavuk yumurtasından daha fazla oranda protein ve yağ asiti içeren diğer kanatlı yumurta sarılarının önemli seviyede çözdürme sonu sperm kalite parametrelerini olumlu yönde etkilediği belirlenmiştir.

Diğer taraftan Bozkurt ve diğ. (2014) sazan'larda yaptıkları bir çalışmada hindi ve bıldırcın yumurta sarılarının da tavuk yumurta sarısına benzer oranlarda glukoz tabanlı sulandırıcıda çözdürme sonu sperma kalitesi sağladığını belirlemişlerdir.

Yürütülen bu çalışma neticesinde, çözdürme sonu sperm kalitesi ve fertilitayı olumlu yönde geliştirmesi nedeniyle ördek yumurta sarısının, sazan spermasının kriyoprezervasyonu çalışmalarında türe özgü uygun sulandırıcılarda tavuk yumurta sarısına alternatif olarak kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.



## KAYNAKLAR

- Abinawanto, A., Vardini, N., Kristanto, A.H., Lestari, R., Bowolaksono, A. (2021). Effect of egg yolk of free-range chicken and methanol as a cryoprotective agent for the sperm preservation of cyprinid fish, *Neolissochilus soroides* (Valenciennes, 1842). *Heliyon*, 7(10), e08158.
- Aboagla, E.M. and Terada, T. (2004). Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology*, 62(6), 1160-1172.
- Aisen, E., Quintana, M., Medina, V., Morello, H. and Venturino, A. (2005). Ultramicroscopic and biochemical changes in spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology*, 50: 239-249.
- Akçay, E., Bozkurt, Y., Seçer, S. and Tekin, N. (2004). Cryopreservation of mirror carp semen. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 28(5), 837-843.
- Akçay, E., Bozkurt, Y. and Kayam, S. (2002). 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
- Akçay, E. (2000). Kangal Çoban köpeklerinde androlojik muayeneler ve spermanın dondurulması. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Akhter, S., Rakha, B., Ansari, M., Husna, A., Iqbal, S. and Khalid, M. (2017). Evaluation of quail and turkey egg yolk for cryopreservation of Nili-Ravi buffalo bull semen. *Theriogenology*, 87, 259-265. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.002>
- Ali, A.B.T., Bomboi, G., and Floris, B. (2013). Replacing chicken yolk with yolks from other sources in ram semen diluents and their effects on fertility in vitro. *Small Ruminant Research*, 113(2-3), 405-410. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.01.01>
- An, T.Z., Iwakiri, M, Edashige, K. and Takashi, M. (2000). Factors affecting the survival of frozen mouse spermatozoa. *Cryobiology*, 40: 237-249.
- Aydın, O. and Sayılı, M. (2009). Samsun ilinde alabalık işletmelerinin yapısal ve ekonomik analizi. *G.O.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 26(2), 97-107.
- Babiak, I., Glogowski, J., Goryczko, K., Dobosz, S., Kuzminski, H., Strzezek, J. and Demianowicz, W. (2001). Effect of extender composition and equilibration time on fertilization ability and enzymatic activity of rainbow trout cryopreserved spermatozoa. *Theriogenology*, 56: 177-192.
- Bailey, J.L., Bilodeau, J.F. and Cormier N. (2000). Semen cryopreservation in domestic animals a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology*, 21(1), 1-7.

- Barus, V., Penáz, M. and Kohlmann, K. (2002). *Cyprinus carpio*, in: The Freshwater Fishes of Europe, Vol.5/III, *Cyprinidae 2* (Part III *Carassius* to *Cyprinus*) and *Gasterosteidae* (Eds: P. M. Banarescu and H.J. Paepke). *Aula-Verlag GmbH Wiebelsheim*, pp: 85-182.
- Baynes, S.M. and Scott, A.P. (1987). Cryopreservation of rainbow trout spermatozoa: the influence of sperm quality, egg quality and extender composition on post-thaw fertility. *Aquaculture*, 66, 53-67.
- Bathgate, R., Maxwell, W.M.C. and Evans, G. (2006). Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality. *Reproduction in Domestic Animals*, 41, 68-73.
- Bhattacharya, S.A. and Prajapati, B.G. (2016). A review on cryoprotectant and its modern implication in cryonics. *Asian Journal of Pharmaceutics*, 10(3), 1-6.
- Bergeron, A. and Manjunath, P. (2006). New insight toward understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development*, 73, 1338-1344.
- Billard, R. and Cosson, M.P. (1990). Controls of Sperm Motility. The energetics of sperm motility. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1990, s. 153-173.
- Billard, R. (1988). Artificial Insemination and Gamete Management. *Marine Behaviour and Physiology*, 14, 1-21.
- Billard, R. (1983). Effects of coelomic and seminal fluids and various saline diluents on the fertilizing ability of spermatozoa in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 68, 77-84.
- Bozkurt, Y., Yavaş, İ. and Yıldız, C. (2016). Effect of extender supplemented with different sugar types on post-thaw motility, viability and fertilizing ability of cryopreserved common carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa. *The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgah, IJA-68.2016.1334*.
- Bozkurt, Y., Yavas, I., and Yıldız, C. (2014). Effect of different avian egg yolk types on fertilization ability of cryopreserved common carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa. *Aquaculture International*, 22, 131-139. <https://doi.org/10.1007/s10499-013-9728-4>
- Bozkurt, Y. (2011). Alabalık Spermasının Kriyobiyolojik Muhafazasının Mekanizması. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 4 (1), 19-24.
- Bozkurt, Y., Yavaş, İ., Öğretmen, F., Sivashgil, B. and Karaca, F. (2011). Effect of glycerol on fertility of cryopreserved grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) sperm. *The Israeli Journal of Aquaculture -Bamidgah, IIC:63.2011.635*.
- Bozkurt, Y., Öğretmen, F. and Seçer, F.S. (2009). 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*, 15(3), 277-284.
- Bozkurt, Y. (2006a). Relationship between body condition and spermatological properties in scaly carp (*Cyprinus carpio*) semen, *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 5, 412-414.



- Bozkurt, Y. and Seçer, S. (2006b). Aynalı sazan (*Cyprinus carpio*) balıklarında üreme mevsimi boyunca spermatolojik özelliklerin belirlenmesi. *Ege University Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 23 (1/2): 195-198.
- Bozkurt, Y. and Seçer, S. (2005a). Balık spermasının muhafazası. *Ziraat Mühendisliği Dergisi*. 345: 38-41.
- Bozkurt, Y. and Seçer, S. (2005b). Aynalı sazan (*Cyprinus Carpio*) balıklarında spermatolojik özelliklerin üreme mevsimi boyunca bireysel olarak değişimi, *Türk Sucul Yaşam Dergisi*, Yıl III, Sayı IV, 485-489.
- Bozkurt, Y., Seçer, S., Tekin, N., and Akcay, E. (2005). Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and mirror carp (*Cyprinus carpio*) sperm with glucose-based extender. *Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*. 1 (1) 21-25.
- Bozkurt, Y. (2004). 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.
- Bromage, N.R. and Roberts, R.J. (1995). Broodstock Management and Egg and Larval Quality. Blackwell Science Ltd., Oxford, England, 424 pp.
- Burris, C., Webb, G., Harmon, S., and Humes, R. (2009). Effects of egg yolk source on cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 29(5), 336-337. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2011.02.003>.
- Cabrita, E., Robles, V., Cuñado, S., Wallace, J.C. Sarasquete, C. and Herráez M.P. (2005). Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology*, 50, 144-153.
- Cabria, E., Anel, L. and Herraez, M.P. (2001). Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. *Theriogenology*, 52, 623-635.
- Cabrita, E., Alvarez, R., Anel, L., Rana, K.J. and Herraez, M.P. (1998). Sublethal damage during cryopreservation of rainbow trout sperm. *Cryobiology*, 37, 245-253.
- Chambeyron, F. and Zohar, Y. (1990). A diluent for sperm cryopreservation of gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture*, 90, 345-352.
- Conget, P., Fernandez, M., Herrera, G. and Minguell, J.J. (1996). Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa using programmable freezing. *Aquaculture*, 143, 319-329.
- Çelikkale, M.S. (1991). Orman içi Su Ürünleri, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sürmene Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Yüksekokulu, Trabzon, Genel Yayın No:157, 205s.
- Chambeyron, F. and Zohar, Y. (1990). A diluent for sperm cryopreservation of gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture*, 90: 345-352.
- Clulow, J.R., Maxwell, W.M.C., Evans, G., and Morris, L.H.A. (2007). A comparison of duck and chicken egg yolk for the cryopreservation of stallion sperm. *Australian Veterinary Journal*, 85(6), 232-235. <https://doi.org/10.1111/J.1751-0813.2007.00151.X>.

- Emri, M., Marian, T., Tron, L., Balkay, L. and Krasznai, Z. (1998). Temperature adaptation changes ion concentrations in spermatozoa and seminal plasma of common carp without affecting sperm motility. *Aquaculture*, 167, 85-94.
- England, G.C.W. (1993). Cryopreservation of dog semen. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl*, 47, 243-55.
- Fabbrocini, A., Lavadera, L., Rispoli, S. and Sansone, G. (2000). Cryopreservation of sea bream (*Sparus aurata*) spermatozoa. *Cryobiology*, 40, 46–53.
- Faramarzi, M. (2012). Assessment of reproductive parameters in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 4(3), 244-248.
- Gholami, M., Faraji, Z. and Zamiri, M. (2012). Effect of egg yolk of four avian species on the cryopreserved ram spermatozoa. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 13 (1), 23-27. <https://doi.org/10.22099/IJVR.2012.16>.
- Gorda, S. (1995). Frozen gene bank. *Fish Genetics for Hatchery Managers-Teaching Material*, University of Chanto, Faculty of Fisheries, Chanto, Vietnam, s.166-181.
- Holt, W.T. (2000): Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 62: 3-22.
- Holtz, W. (1993). Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm: practical recommendations. *Aquaculture*, 110, 97–100.
- Horvath, L. and Lukowicz, M. (1982). Tables with data of hatchery procedures and rearing process of some bred warm water fishes, *Aquacultura Hungarica*, vol. III, s. 212-219.
- Innal, D. and Erk'akan, F. (2006). Effects of exotic and translocated fish species in the inland waters of Turkey. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 16 (1), 39-50.
- Irawan, H., Vuthiphandchai, V., and Nimrat, S. (2010). The effect of extenders, cryoprotectants and cryopreservation methods on common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. *Animal Reproduction Science*, 122(3-4), 236-243. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.017>
- Kopeika, E., Kopeika, J. and Zhang, T. (2007). Cryopreservation and freeze-drying protocols. *Cryopreservation of Fish Sperm*. 2th. Ed., Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, s. 203-218.
- Kruger, J.C.W., Smit, G.L., Van Vuren, J.H.J. and Ferreira, J.T. (1984). Some chemical and physical characteristics of the semen of *Cyprinus carpio* L. and *Oreochromis mossambicus* (Peters), *Journal of Fish Biology*, 24: 263-272.
- Lahnsteiner, F. (2002). The influence of ovarian fluid on the gamete physiology in the Salmonidae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 27, 49–59.
- Leibo, S.P. and Brandley, L. (1999). Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. In: C Gagnon (Ed), *The Male Gamet*. Cache River Press, St Louis. 502-515.
- Linhart, O., Rodina, M. and Cosson, J. (2000). Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio*: sperm motility and hatching success of embryos. *Cryobiology*, 41, 241- 250.

- Lubzens, E., Daube, N., Pekarsky, I., Magnus, Y., Cohen, A., ve diğerleri (1997). Carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa cryobanks- strategies in research and application, *Aquaculture*, 155: 13-30.
- Maurice, D.V., Lightsey, S.F., Hsu, K.T., Gaylord, T.G. and Reedy, R.V. (1994). Cholesterol in eggs from different species of poultry determined by capillary GLC. *Food Chemistry*, 50 (4), 367-372. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(94\)90206-2](https://doi.org/10.1016/0308-8146(94)90206-2).
- Medeiros, C.M., Forell, F., Oliveira, A.T. and Rodrigues, J.L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, 57, 327-544.
- McWilliams, R.B., Gibbons, W.E. and Leibo, S.P. (1995). Osmotic and physiological responses zygotes and human oocytes to mono-and disaccharides. *Human Reproduction*, 10, 1163-1171.
- Moce, E. and Vicente, J.S. (2009). Rabbit sperm cryopreservation: A review. *Animal Reproduction Science*, 110 (1-2), 1-24.
- Moreno, J.S., Coloma, M.A., Diaz, A.T., Brunet, A.G., Pastor, A.P., Soria, A.Z., Carrizosa, J.A., Urritia, B. and Sebastian, A.L. (2008). A comparison of the protective action of chicken and quail egg yolk in the cryopreservation of Spanish ibex epididymal spermatozoa. *Cryobiology*, 57 (1):25-29. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.05.001>.
- Munkittrick, K.R. and Moccia, R.D. (1984). Advances in the cryopreservation of salmonid semen and suitability for a production scale artificial fertilization program. *Theriogenology*, s. 21: 645-659.
- Muus, B.J. and Dahlström, P. (1981). Guide des poissons deau douce et pech. Delachaux et Niestle S.A., Neuchâtel, Suisse, 242, pp: 134-135.
- Omitogun, O.G., Olaniyan, O.F., Oyeleye, O.O., Ojiokpota, C., Aladele, S.E. and Odofin, W.T. (2010). Potentials of short term and long term cryopreserved sperm of the African giant catfish (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822) for aquaculture. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 9(41), 6973-6982.
- Palasz, A.T. and Mapletopt, R.J. (1996). Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnology Advances*, 14, 127-149.
- Piironen, J. (1985). Variation in the properties of milt from the Finnish landlocked salmon (*Salmo salar* *Salmo salar* m. sebago Girard) during a spawning season. *Aquaculture*, 48: 337-350.
- Polge, C., Smith, A. and Parkes, A. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164, 166.
- Prasard, R.V., Sreenivas, R.M., Dhananjaya, R.B., and Rao, P.V.A. (1988). A comparative study on the quality of fresh chicken and duck eggs. *Indian Journal of Animal Science*, 8, 978- 981.
- Purdy, P.H. (2006). A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 6: 215- 225.
- Rana, K.J. and Gilmour, A. (1996). 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.

- Rideout, R.M., Trippel, E.A. and Litvak, M.K. (2004). The development of haddock and Atlantic cod sperm cryopreservation techniques and the effect of sperm age on cryopreservation success. *Journal of Fish Biology*, 65:299-311.
- Seçer, S. (1998). Su Ürünleri ve Balık Yetiştiriciliği. *Ankara Bölgesi Veteriner Hekimler Odası Üretim Dergisi*, 5-6; 26-42.
- Stanescu, M.P. and Birtoiu, A.I. (2012). Comparative studies canine sperm freezing protocols. *Romanian Biotechnological Letters*, 17, 7709-7716.
- Steyn, G., Van Vuren, J.H.J. and Grobler, E. (1989). A new sperm diluent for the artificial insemination of Rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 83: 367-374.
- Stoss, J. (1983). Fish physiology. *Fish Gamete Preservation and Spermatozoon Physiology*. Academic Press, New York, USA, s. 305-350.
- Stoss, J. and Holtz, W. (1983). Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. III. Effect of proteins in the diluent, in sperm from different males and interval between sperm collection and freezing. *Aquaculture*, 31, 275-282.
- Soylu, M. (1998). Sazan üretimi, M.Ü. yayın no: 632, Teknik Bilimler M.Y.O.yayın No:1, ISBN: 975-400-181-2.
- Su, L., Li, X., Quan, J., Yang, S., Li, Y., He, X. and Tang, X. (2008). A comparison of the protective action of added egg yolks from five avian species to the cryopreservation of bull sperm. *Animal Reproduction Science*, 104(2-4), 212-219. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.06.019>.
- Suquet, M., Dreanno, C., Fauvel, C., Cosson, J. and Billard, R. (2000). Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research*, 31, 231-243.
- Surai, P.F., Speake, B.K., Noble, R.C. and Mezes, M. (1999). Species-specific differences in the fatty acid profiles of the lipids of the yolk and of the liver of the chick. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(5), 733-736. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0010\(199904\)79:5<733::aid-jfsa244>3.0.co;2-m](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0010(199904)79:5<733::aid-jfsa244>3.0.co;2-m)
- Tabakoğlu, Ş.S. (2005). 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.
- Tekin, N., S. Seçer, E. Akçay, Y. Bozkurt ve S. Kayam (2007). Effects of glycerol additions on post-thaw fertility of frozen rainbow trout sperm, with an emphasis on interaction between extender and cryoprotectant. *Journal of Applied Ichthyology*, 23 (1), 60-63.
- Tekin, N., Secer, S., Akçay, E. and Bozkurt, Y. (2003a). Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen. *Israeli J. Aquaculture-Bamidgeh*, 55, 208-212.
- Tekin, N., S. Seçer, E. Akçay, Y. Bozkurt ve S. Kayam (2003b). The effect of age on spermatological properties in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W. 1792). *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 27(1), 37-44.
- Timur, M. (2006). Balık Fizyolojisi. Nobel Yayın No: 957, 192 s. ISBN: 9755919430.
- TÜİK, (2022). TÜİK Haber Bülteni. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Su-Urunleri-2022-49678>. Erişim Tarihi: 15.01.2023.

- Waheed, S., Ahmad, N., Jamil-ur-Rahman, H., Younis, M. and Iqbal, S. (2012). Evaluation of duck egg yolk for the cryopreservation of Nili-Ravi buffalo bull semen. *Animal Reproduction Science*, 131 (1-2), 95-99. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.02.011>
- Warnecke, D., Pluta, H.J. (2003). Motility and fertilizing capacity of frozen / thawed carp (*Cyprinus carpio*) sperm using dimethyl-acetamide as the main cryoprotectant. *Aquaculture*, 215, 167-185.
- Webb, G.W., Burris, C.L., Harmon, S.E., and Baker, R.H. (2011). Effects of egg yolk source on the cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 31 (4), 166-173. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2011.02.003>.
- Wheeler, P.A. and Thorgaard, G.H. (1991). Cryopreservation of rainbow trout semen in large straws. *Aquaculture*, 93, 95-100.
- Yavaş, I. and Bozkurt, Y. (2011). Effect of different thawing rates on motility and fertilizing capacity of cryopreserved grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) sperm. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 25, 2254-2257.
- Yılmaz, E. (2004). Sazan yetiştiriciliği. T.C. Başbakanlık Güneydoğu Anadolu Projesi Bölge Kalkınma İdaresi Başkanlığı, 2004.
- Zhang, X., Chelliappan, B., Rajeswari, S., and Antonysamy, M. (2021). Recent advances in applications of bioactive egg compounds in nonfood sectors. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9.
- Zhukinskij, V.N. and Bilko, V.P. (1984). Effect of semen pH on embryo viability in some cyprinid fishes. *Journal of Ichthyology*, 24(3), 64-76.

## DİZİN

**A**

azaot · 4

**C**

cam · 16

**D**Döllenen · 19  
Duncan · 21**E**

enerji · 9, 31

**F**

fiziksel · 3, 16, 28

**G**

glukoz · 7, 9, 10, 32, 33

**K**kanatlı · 4, ix, x, xi, 3, 23, 24, 25, 26, 27,  
32, 33  
Kaz · ix, xii, 18, 21, 24, 26**M**memeli · 4  
mikroskop · 19

motilite · 4, ix, 3, 9, 12, 13, 22, 23, 24, 25, 26, 28, 29, 31

**Ö**

ördek · 4, ix, 3, 17, 18, 23, 24, 26, 27, 33

**P**progresif · 4  
pullu · 4, ix, x, 5, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 30, 33**S**sarımsı · 4, ix, 3, 6, 11, 13, 17, 18, 20, 21, 24, 26, 32, 33  
sazan · 4, ix, x, xi, 1, 2, 3, 5, 6, 14, 15, 16, 22, 23, 24,  
25,  
26, 27, 28, 29, 30, 33, 36, 39, 41  
sperm · 4, 5, ix, 2, 3, 7, 8, 9, 11, 16, 19, 24, 26, 28, 29,  
31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43  
Sperma · 4, vii, viii, ix, 7, 9, 11, 17, 29, 30, 42  
spermasının · 4, ix, x, 3, 8, 9, 12, 13, 23, 24, 25, 26, 27,  
28, 30, 32, 33, 35, 38, 39  
su · 4, ix, 1, 2, 5, 6, 7, 18, 19, 31, 34, 36, 37  
Sukroz · 4, 26**T**

tavuk · 4, 3, 17, 18, 23, 24, 26, 33

**U**

Uzay · ix

**Y**Yumurta · 4, vii, viii, xii, 3, 6, 11, 14, 18, 23, 24, 25, 26,  
27, 43



**TEKNOVERSITE**



teknoversite **AYRICALIĞINDASINIZ**

**İSTE**

