



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**ÇİPURA BALIĞI (*Sparus aurata* L. 1758) SPERMASININ  
BAŞLICA SPERMATOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN  
SAPTANMASI, DONDURULMASI VE DÖLVERİMİ**

**Erkut Derviş ÖZGÖRAY**

**DÖLERME VE SUN'İ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN  
Doç. Dr. Ergun AKÇAY**

**2009- ANKARA**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇİPURA BALIĞI (*Sparus aurata* L. 1758) SPERMASININ  
BAŞLICA SPERMATOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN  
SAPTANMASI, DONDURULMASI VE DÖLVERİMİ**

**Erkut Derviş ÖZGÖRAY**

**DÖLERME VE SUN'İ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI**

**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Ergun AKÇAY**

**2009- ANKARA**

Türkiye Cumhuriyeti  
Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Dölerme ve Sun'i Tohumlama Doktora Programı  
Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından  
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Doktora Tezi Savunma Tarihi: 09/06/2009



Prof.Dr.Neomettin TEKİN  
Ankara Üniversitesi  
Jüri Başkanı



Doç.Dr.Ergün AKÇAY  
Ankara Üniversitesi



Prof.Dr. Ali DAŞKIN  
Ankara Üniversitesi



Prof.Dr. Mustafa KAYMAZ  
Ankara Üniversitesi



Doç.Dr.Serhat ALKAN  
İstanbul Üniversitesi

## İÇİNDEKİLER

|                                             |             |
|---------------------------------------------|-------------|
| <b>Kabul ve Onay</b>                        | <b>ii</b>   |
| <b>İçindekiler</b>                          | <b>iii</b>  |
| <b>Önsöz</b>                                | <b>vi</b>   |
| <b>Simgeler ve Kısaltmalar</b>              | <b>vii</b>  |
| <b>Şekiller</b>                             | <b>viii</b> |
| <b>Çizelgeler</b>                           | <b>ix</b>   |
| <br>                                        |             |
| <b>1.GİRİŞ</b>                              | <b>1</b>    |
| 1.1. Genel Bilgiler                         | 1           |
| 1.2. Çipuranın Sistematikteki Yeri          | 3           |
| 1.3. Çipuranın Dünyadaki Yayılımı           | 3           |
| 1.4. Çipura Balığı Üretim Miktarları        | 4           |
| 1.5. Çipuranın Morfolojisi                  | 5           |
| 1.6. Çipuranın Genel Biyolojisi             | 6           |
| 1.7. Çipurada Reprodüksiyon                 | 7           |
| 1.7.1. Erkeklerde Reprodüktif Fizyoloji     | 10          |
| 1.7.1.1. Pubertas                           | 10          |
| 1.7.1.2. Spermatogenezis ve Endokrin Düzeni | 11          |
| 1.7.1.3. Spermatozoon ve Sperma             | 12          |
| 1.7.1.4. Spermanın Eldesi                   | 14          |
| 1.7.1.5. Spermatolojik Özellikler           | 16          |
| 1.7.1.5.1. Sperma Rengi                     | 16          |
| 1.7.1.5.2. Sperma Miktarı                   | 16          |
| 1.7.1.5.3. Sperma Motilitesi                | 17          |
| 1.7.1.5.4. Spermatozoanın Canlılık Süresi   | 19          |
| 1.7.1.5.5. Spermatozoa Yoğunluğu            | 19          |
| 1.7.1.5.6. Spermanın pH'sı                  | 20          |
| 1.7.1.6. Spermanın Dondurulması             | 21          |

|                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------|----|
| 1.7.1.6.1. Spermanın Sulandırılması                             | 24 |
| 1.7.1.6.2. Kriyoprotektanlar                                    | 26 |
| 1.7.1.6.3. Dondurma Yöntemleri ve Dondurma Sıcaklıkları         | 27 |
| 1.7.1.6.4. Spermanın Çözdürülmesi                               | 29 |
| 1.7.2. Dişilerde Reprodiktif Fizyoloji                          | 29 |
| 1.7.2.1. Pubertas                                               | 29 |
| 1.7.2.2. Oogenesis ve Yumurtlama                                | 30 |
| 1.7.2.3. Yumurta ve Yumurta Özellikleri                         | 31 |
| 1.7.2.4. Yumurtlamada Hormon Kullanımı                          | 32 |
| 1.7.3. Fertilizasyon ve Fertilizasyon Teknikleri                | 34 |
| 1.7.3.1. Kuru Yöntem                                            | 35 |
| 1.7.3.2. Islak veya Yaş Yöntem                                  | 35 |
| 1.7.4. Yumurta ve Sperma Alımında Anestezi                      | 36 |
| 1.7.5. Kuluçka ve Prelarva                                      | 36 |
| <b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>                                       | 39 |
| 2.1. Araştırmanın Yapıldığı Yer                                 | 39 |
| 2.2. Çalışma Materyali Seçimi                                   | 39 |
| 2.3. Çipura Damızlık Tanklarının Özellikleri ve Çevre Koşulları | 39 |
| 2.4. Damızlıkların Beslenmesi                                   | 40 |
| 2.5. Spermanın ve Yumurta Alınması                              | 41 |
| 2.6. Spermatolojik Muayeneler                                   | 42 |
| 2.6.1. Makroskobik Muayene                                      | 43 |
| 2.6.1.1. Sperma Renk ve Kıvamı                                  | 44 |
| 2.6.1.2. Sperma Miktarı                                         | 44 |
| 2.6.2. Spermanın Mikroskopik Muayenesi                          | 44 |
| 2.6.2.1. Spermatozoa Motilitesi                                 | 44 |
| 2.6.2.2. Spermatozoa Yoğunluğu                                  | 45 |
| 2.6.3. Spermanın Kimyasal Muayenesi                             | 46 |

|                                             |    |
|---------------------------------------------|----|
| 2.6.3.1. Spermanın pH Değeri                | 46 |
| 2.7. Spermanın Dondurulması                 | 46 |
| 2.7.1. Deney 1 (Sulandırıcı Seçimi)         | 47 |
| 2.7.2. Deney 2 (Kriyoprotektan Seçimi)      | 48 |
| 2.7.3. Deney 3 (Spermanın Çözdürülmesi)     | 49 |
| 2.8. Suni Tohumlama ve Dölverimi            | 49 |
| 2.9. İstatistiki Değerlendirme              | 52 |
| <b>3. BULGULAR</b>                          | 53 |
| 3.1. Spermatolojik Muayene Bulguları        | 53 |
| 3.1.1. Spermanın Rengi                      | 53 |
| 3.1.2. Spermanın Miktarı                    | 53 |
| 3.1.3. Spermatozoa Motilitesi               | 53 |
| 3.1.4. Spermatozoa Yoğunluğu                | 54 |
| 3.1.5. Spermanın pH'sı                      | 54 |
| 3.2. Deney 1 (Sulandırıcı Seçimi)           | 55 |
| 3.3. Deney 2 (Kriyoprotektan Seçimi)        | 57 |
| 3.4. Deney 3 (Spermanın Çözdürülmesi)       | 58 |
| 3.5. Suni Tohumlama ve Dölverimi            | 58 |
| <b>4. TARTIŞMA</b>                          | 62 |
| 4.1. Spermatolojik Muayeneler               | 62 |
| 4.2. Spermanın Dondurulması ve Çözdürülmesi | 67 |
| 4.3. Suni Tohumlama ve Dölverimi            | 73 |
| <b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>                 | 80 |
| <b>ÖZET</b>                                 | 83 |
| <b>SUMMURY</b>                              | 84 |
| <b>KAYNAKLAR</b>                            | 85 |
| <b>ÖZGEÇMİŞ</b>                             | 92 |

## ÖNSÖZ

Artan dünya nüfusu ve besin ihtiyacının karşılanması için hayvansal orijinli gıdalar büyük öneme sahiptir. Su ürünleri olarak nitelenen balıklar (*Pisces*), kafadan bacaklılar (*Cephalopoda*), yengeç-istakoz (*Decopada*) gibi canlılar insanlar için önemli esansiyel amino asitleri ve proteinleri içermektedir. Bu nedenle deniz ürünlerinin gelişmekte olan ülkelerde avcılık yoluyla elde edilmesinin kolay olmasından dolayı temel gıda olarak tüketilmektedirler.

Günümüzde su ürünleri yetiştiriciliği dünyada en hızlı gelişen sektörler arasında yer almaktadır. Gıda sektöründe, son 30 yılda en büyük gelişme gösteren sektör ise su ürünleri yetiştiriciliği (*Aquaculture*) olmuştur. Akdeniz ülkeleri için büyük öneme sahip olan çipura ve levrek balıkları bu ülkelerdeki su ürünleri üretimin yaklaşık % 65'i oluşturmaktadır. FAO verilerine göre, Türkiye çipura üretim miktarı açısından 2. sırada yer almaktadır fakat ülkemizde bu konuda bilimsel çalışmaların oldukça yetersiz olduğu ve desteklenmesi gerektiği bilinmektedir. Çipuralar 2. yaşla birlikte % 80 oranında dişi olmaları nedeni ile hızlı gelişim gösteren, yüksek genetik kapasiteye sahip erkeklerin 2 yaşından önce spermalarının dondurulması gereklidir.

Doktora eğitimi ve çalışmam süresince, benden yardım ve desteklerini esirgemeyen başta Danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Ergun AKÇAY'a, Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Necmettin TEKİN ile Anabilim dalımızın tüm akademik ve teknik personeline, çalışmamın istatistiki değerlendirmesinde katkıda bulunan Orçun YÜCEL'e, müstakbel eşim Meltem ATAKARA'ya, Kılıç Deniz Ürünleri İşletmesinden Sayın Oğuz UÇAL ve Sayın Hakan KÜÇÜKSARI'ya ve işletmenin tüm personeline, ayrıca hayatımın her aşmasında olduğu gibi bu dönemde de bana her zaman destek olan AİLEME şükranlarımı sunarım.

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|                       |                                   |
|-----------------------|-----------------------------------|
| <b>%</b>              | Yüzdelik                          |
| <b>‰</b>              | Bindelik                          |
| <b>μ</b>              | Mikron                            |
| <b>μl</b>             | Mikrolitre                        |
| <b>μm</b>             | Mikrometre                        |
| <b>ATP</b>            | Adenozin Trifosfat                |
| <b>Cl</b>             | Klor                              |
| <b>cm</b>             | Santimetre                        |
| <b>DHA</b>            | Docosaheenoic Asit                |
| <b>dk</b>             | Dakika                            |
| <b>E.Ü</b>            | Ege Üniversitesi                  |
| <b>FAO</b>            | Food and Agriculture Organization |
| <b>FSH</b>            | Folikül Stimulan Hormon           |
| <b>GnRH</b>           | Gonadotropin Salgılatıcı Hormon   |
| <b>gr</b>             | Gram                              |
| <b>K</b>              | Potasyum                          |
| <b>kg</b>             | Kilogram                          |
| <b>km</b>             | Kilometre                         |
| <b>km<sup>2</sup></b> | Kilometre kare                    |
| <b>l</b>              | Litre                             |
| <b>LH</b>             | Luteinleştirici Hormon            |
| <b>mg</b>             | Miligram                          |
| <b>ml</b>             | Mililitre                         |
| <b>mM</b>             | Milimolar                         |
| <b>mOsm</b>           | Miliosmol                         |
| <b>MS 222</b>         | Tricaine Methane Sulphonate       |
| <b>NaCl</b>           | Sodyum klorür                     |
| <b>sn</b>             | Saniye                            |
| <b>spz</b>            | Spermatozoon                      |

## ŞEKİLLER

**Şekil 1.1.** Çipura balığı doğal yayılım alanı.

**Şekil 1.2.** Ülkelere göre çipura üretim miktarları

**Şekil 1.3.** Çipura (*Sparus aurata*)

**Şekil 1.4.** Çipura spermatozoonu.

**Şekil 1.5.** Çipurada hormonal enjeksiyon.

**Şekil 1.6.** Kapalı kuluçka sistemi.

**Şekil 2.1.** Damızlık tankları.

**Şekil 2.2.** Damızlıkların beslenmesinde kullanılan dondurulmuş mürekkep balığı.

**Şekil 2.3.** Küçük tanklarda tam anesteziye alınan damızlık çipuralar.

**Şekil 2.4.** Spermanın abdominal masajla alınması.

**Şekil 2.5.** Spermatolojik muayenelerin yapıldığı yer.

**Şekil 2.6.** Çipura Sperması.

**Şekil 2.7.** Sıvı azot buharında dondurulan payetler.

**Şekil 2.8.** Spermanın sulandırılması ve payetlere çekilmesi

**Şekil 2.9.** Suni tohumlama ve spermatozoonların aktivasyonu

**Şekil 2.10.** Alınan yumurtaların birleştirilmesi ve inkübatörler. 4 farklı dışıdan alınan yumurtaların birleştirilmesi ve elektronik terazi (a), 500 µ göz açıklığına sahip inkübatörler (b)

**Şekil 3.1.** Sulandırıcılar arasındaki motilite farkları

**Şekil 3.2.** Kriyoprotektanların arasındaki motilite farkları

**Şekil 3.3.** Suni tohumlamada açılım yüzdeleri

**Şekil 3.4.** Tohumladan 3 saat sonra alınan yumurtalar a- döllenmiş yumurta (blastomer safhası), b-döllenmemiş, atrezik yumurta c- aynı anda döllenmiş yumurtalardaki farklı blastomer safhası

**Şekil 3.5.** Soldaki resim; Alınan yumurtaların çapı büyük oranda farklılık göstermiştir. Sağdaki resim; a- Döllenmiş yumurta (embriyo safhası) b- 48.saatte alınan döllenmemiş yumurtalar

**Şekil 3.6.** Çalışmada üçüncü günde (70. saat) açılan prelarvalar

## ÇİZELGELER

**Çizelge 1.1.** Türkiye’de kültür balıkları üretim miktarları

**Çizelge 1.2.** Bazı balık türlerinde çözdürme sıcaklıkları

**Çizelge 1.3.** Çipura yumurtalarının embriyolojik gelişimi

**Çizelge 3.1.** Çipura spermasının spermatolojik özellikleri

**Çizelge 3.2.** Sulandırıcılar arasındaki motilite farkları

**Çizelge 3.3.** Kriyoprotektanların arasındaki motilite farkları

**Çizelge 3.4.** Çözüm sıcaklıkları arasındaki motilite farkı

**Çizelge 3.5.** Suni tohumlamada açılım yüzdeleri

## 1.GİRİŞ

### 1.1. Genel Bilgiler

Pek çok dünya ülkesinde su ürünleri, gıda zincirinde çok önemli bir yere sahiptir. Bazı bölgelerde temel gıda durumundadır. Dünyada en fazla su ürünleri tüketen ülke yıllık kişi başı 153 kg ile Maldive adalarıdır. Bu ülkeyi takiben İzlanda 91 kg, Kiribati adası 78 kg ve japonya 70,6 kg su ürünleri tüketmektedirler. Ülkemizde ise ortalama 8 kg dolayında tüketim vardır. FAO kayılarına göre ülkemiz çok az veya hiç balık tüketmeyen ülkeler arasında sayılmaktadır. Bu yüzden ülkemizde balık tüketiminin artırılması ve bu konuda çaba harcanması sağlıklı nesiller yetiştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır (Alpbaz, 2005).

Su ürünleri yetiştiriciliğinin gelişimine rakamsal olarak bakılacak olursa son 25 yıl içerisinde yetiştiricilik yolu ile sağlanan üretimin yaklaşık 8 katına çıktığını görüyoruz. Şöyle ki, 1976 yılında yetiştiricilik yoluyla sağlanan üretim 6 milyon ton iken bu üretim 2001 yılı için 48 milyon tona çıkmıştır. Bu rakamsal sonuçlar göstermektedir ki, su ürünleri yetiştiriciliği dünyada gıda üretimine yönelik sektörler içerisinde en hızlı gelişen durumundadır (Alpbaz, 2005).

Ülkemiz, 8333 km.lik kıyı şeridine ve 80791 km<sup>2</sup>'lik hüküm ve tasarrufu altında bulundurduğu deniz alanına, 10.000 km<sup>2</sup>'lik doğal göller, 70.000 hektarlık lagün gölleri, her geçen gün artan 342.377 hektarlık baraj gölleri ve 15.000 hektarlık gölet ile 177.714 km uzunluğundaki akarsu sistemine sahiptir. Ülkemiz tüm bu potansiyeli ve su ürünleri oluşturan çeşitli canlıların gelişimi ve yetiştirilmesine kolaylık sağlayan coğrafik konumu ve uygun ekolojik özellikleriyle balıkçılık açısından şanslı konumdadır (Benli ve ark., 1997).

Balıklar (*pisces*), birincil olarak suda yaşamaya uyarlanmış, solungaçlarıyla solunum yapan yüzgeç biçimde extremiteeleri olan, derileri çoğunlukla pullarla örtülü, soğukkanlı ve en ilkel omurgalılar olarak tanımlanabilir (Çelikkale, 1988).

Çipura (*Sparus aurata*) ülkemiz denizlerinde var olan yüksek kalitede ete sahip balık türüdür. Çipura akdeniz bölgesi için büyük öneme sahip kültür balığıdır (Alpbaz, 2005).

Günümüzde yoğun üretimi yapılan türlerden olan levrek, ilk kez Fabre-Domerque (1905) tarafından yapay yolla üretilebileceği bildirilmiş olup, Barnabé (1971) levreklerin hormon müdahalesi ile kontrol altına alınabileceğini rapor etmiştir. Barnabé (1972), levrekleri juvenil (genç) hale kadar getirmeyi başarmış ve bugün Avrupa ülkelerinde yumurtadan pazar boyuna kadar geniş bir endüstri kolu haline gelmesine öncülük etmiştir. Çipura özellikle Ege Bölgesi'nde çok aranan, çok sevilen bir balık türüdür. Bu nedenle yetiştiriciliğine karşı devamlı bir ilgi duyulmuştur. 1980'lerden sonra başlayan çalışmalar sonucu ülkemizde oldukça başarılı yetiştiricilik uygulamalarına ulaşılmıştır. Tüm akdeniz ülkelerinde sevilerek tüketilse de özellikle Yunanistan, İtalya ve Fransa'da çok değerli bir balıktır. Bu nedenle bu ülkelerde yetiştiricilik çalışmaları önemli gelişmeler göstermiştir (Alpbaz, 2005).

Ülkemizde 80'li yıllarda öncelikle çipura yavrularının doğadan toplanarak besiyeye alınmasıyla başlayan çalışmalar, daha sonra levrek larva yetiştiriciliğine geçilmesiyle devam etmiştir. Levrek larva yetiştiricilik çalışmaları 1984 yılında özel bir işletme ve E.Ü. Su Ürünleri Fakültesi'nde başlamıştır. 1980'li yılların sonunda üretimlerini binli rakamlar ile ifade eden balıkçılık tesisleri günümüzde yıllık larva üretimlerini milyonlar ile ifade edilmektedir. Levrek larva üretiminde sağlanan bu gelişim, çipura ile birlikte yeni türlerin aquakültürüne de öncülük etmektedir (Fırat ve Saka, 2006; Kamacı, 1998).

## 1.2. Çipuranın Sistematikteki Yeri

*Chrysophrys aurata* sinonimi ile de adlandırılan çipura,

|                                  |                         |
|----------------------------------|-------------------------|
| Hayvanlar alemi (Regnum):        | Animale                 |
| Hayvanlar alt alemi (Subregnum): | Metazoa                 |
| Kol (Phylum):                    | Vertabrata              |
| Alt Kol (Subphylum):             | Pisces                  |
| Sınıf (Clasis):                  | Osteichthyes            |
| Takım (Ordo):                    | Perciformes             |
| Alt Takım (Subordo):             | Percoidei               |
| Familya (Familia):               | Sparidae                |
| Cins (Genus):                    | Sparus                  |
| Tür (Species):                   | aurata (Linneaus, 1758) |

şekli ile sistematikteki yerini almıştır. Herhangi bir alt türü veya ırkı bildirilmemiştir.

## 1.3. Çipuranın Dünyadaki Yayılımı

Klimatik yapıdan çipura balığına tüm Akdeniz’de rastlanmakla birlikte doğu ve güney doğu Akdeniz ülkelerinde, Kanarya Adaları’nda, İngiltere kıyılarında, Verde Burnu’nda ve nadir olarak Karadeniz kıyılarında rastlanır. Genellikle tropikal, subtropikal ve ılıman kuşaklarda yayılım gösteren çipura deniz fenogramlarının bulunduğu kumlu-çamurlu ve çamurlu ortamlarda yaşamını sürdürür. Bunun yanı sıra nehir ağızlarına ve lagüner bölgelere de girer, ülkemizde daha çok Ege bölgesi ve Akdeniz kıyılarında bulunmaktadır (Alpbaz, 2005).



Şekil 1.1. Çipura balığı doğal yayılım alanı (Fishbase, 2009)

#### 1.4. Çipura Balığı Üretim Miktarları

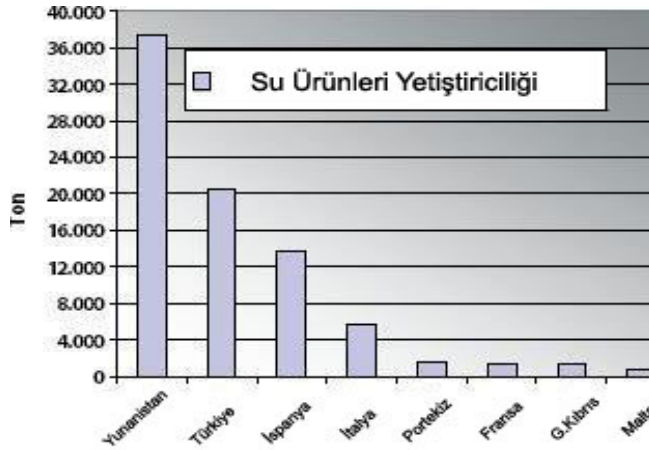
##### Kültür balıkları üretimi

|               | Ton          |              |              |              |              |               |               |               |
|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|
| Balık türü    | 2000         | 2001         | 2002         | 2003         | 2004         | 2005          | 2006          | 2007          |
| <b>Toplam</b> | <b>79031</b> | <b>67244</b> | <b>61165</b> | <b>79943</b> | <b>94010</b> | <b>118277</b> | <b>128943</b> | <b>139873</b> |
| <b>İçsu</b>   |              |              |              |              |              |               |               |               |
| Alabalık      | 42572        | 36827        | 33707        | 39674        | 43432        | 48033         | 56026         | 58433         |
| Aynalı sazan  | 813          | 687          | 590          | 543          | 683          | 571           | 668           | 600           |
| <b>Deniz</b>  |              |              |              |              |              |               |               |               |
| Alabalık      | 1 961        | 1 240        | 846          | 1194         | 1650         | 1249          | 1633          | 2740          |
| <u>Çipura</u> | <u>15460</u> | <u>12939</u> | <u>11681</u> | <u>16735</u> | <u>20435</u> | <u>27634</u>  | <u>28463</u>  | <u>33500</u>  |
| Levrek        | 17877        | 15546        | 14339        | 20982        | 26297        | 37290         | 38408         | 41900         |
| Midye         | 321          | 5            | 2            | 815          | 1513         | 1500          | 1545          | 1100          |
| Karides       | 27           | -            | -            | -            | -            | -             | -             | -             |
| Diğer         | -            | -            | -            | -            | -            | 2000          | 2200          | 1600          |

Çizelge 1.1. Türkiye’de kültür balıkları üretim miktarları (TÜİK, 2007)

Türkiye İstatistik Kurumu verilerine göre 2007 yılında, yaklaşık 632 bin tonu avcılıkla, 140 bin tonu yetiştiricilikle olmak üzere toplam yaklaşık 772 bin ton su ürünleri üretilmiştir. Toplam su ürünleri üretiminin yaklaşık % 67.1'i deniz balıklarından, % 9.2'i diğer deniz ürünlerinden, % 5.6'ı içsu ürünlerinden ve % 18.1'i yetiştiricilik yoluyla elde edilmiştir. En çok yetiştirilen türler içsularda % 41.8 ile alabalık, denizlerde % 30 ile levrek, % 24 ile çipura.

FAO (2004) verilerine göre Türkiye çipura üretiminde avrupada Yunanistan'ın ardından 2. sırada yer almaktadır. Türkiye'nin ardından sırasıyla İspanya, İtalya, Portekiz, Fransa ve Güney Kıbrıs Rum Kesimi yer almaktadır.



Şekil 1.2. Ülkelere göre çipura üretim miktarları (Ton) (FAO, 2004).

### 1.5. Çipuranın Morfolojisi

Anatomik yapı bakımından, sırt yüksekliği fazla olup lateralde yassılaştırmış simetrik bir yapıya sahiptir. Baş iri, burun küt ve ağız terminal konumlu olup düzdür. Üst dudak, alt dudağa oranla daha kalın olup gözün başladığı noktanın paralelinde biter. Gözler orta derecede gelişmiştir. Göz çukuru önündeki mesafe, göz çapından en az iki kat daha uzundur. Gözler arasında V şeklinde yıldızsı bir bant vardır. Yanal çizgi hafif eğimli olarak operkulumdan kaudal yüzgece kadar kesintisiz olarak devam eder. Dorsal yüzgeç anal yüzgeçten daha uzundur. Pektoral yüzgeç anüse kadar uzanır. Kaudal yüzgeç homoserk yapıdadır. Renk dorsalde gri-esmer, ventralde

gümüşüdür. Pektoral yüzgecin dorsalinde ve operkulum üzerinde kırmızı-menekşe renkli bir leke karakteristiktir, bazı bireylerde bu leke kaybolabilmektedir (Alpbaz, 2005).



Şekil 1.3. Çipura (*Sparus aurata*) (Fishbase, 2009).

#### 1.6. Çipuranın Genel Biyolojisi

Çipuraların üreme periyodu ülkemizde Ekim-Aralık ayları arasında olup en iyi gelişim 22 - 25 °C aralığında gözlenmektedir. Yaşayabilecekleri sıcaklık aralığı 3 - 34 °C, tuzluluk değeri ise ‰ 5 - 40 olarak belirtilmiştir. Binde 1 tuzluluğa kadar yaşayabildikleri Chervinski ve Chanin (1985) tarafından bildirilmiştir. 7 - 8 mg/lit çözülmüş O<sub>2</sub> düzeyinde yaşamayı tercih ederler (Alpbaz, 2005).

Genellikle 5 - 25 m arası derinliklerde yayılım gösterirler. Yaşları ilerledikçe derinlerde yaşamayı tercih ederler. Bunun için dalyan alanlarında ergin bireylere rastlanmaz. Yaz aylarında 0,5 - 9 m derinliğe kadar olan sığ sulara giriş yapan çipuralar, kış aylarında 35 - 40 m derinliğe kadar inerler. Maximum boyları 70 cm'ye ulaşan çipuraların ortalama uzunlukları 25 - 40 cm arasındadır (Alpbaz, 2005; Saka ve Fırat, 2006).

Çipura balığının 30-50 gr arası olanlarına ince lidaki, 100 gr dolayındakilere lidaki, 100-180 gr olanlarına kaba lidaki, 200 gr ve daha fazla olanlarına çipura adı

verilir. Yetiştircilikte balıklar ikinci yazın ortalarından itibaren 250 - 350 gr'a ulaştırılıp pazarlanmaya başlanır. Yumurtalama en çok 14 - 19 °C'de gerçekleşmektedir. Bu nedenler kuzeye çıkıldıkça İngiltere dolaylarında yumurtlama yaz aylarında görülmektedir.

Üç yaşa kadar olan çipuraların mide içerikleri incelendiğinde bu türün karnivor bir form olduğu ve özellikle ergin bireylerin *Crustacea* ve *Mollusca* familyasına ait türlerle beslendiği ortaya çıkmıştır (Alpbaz, 2005).

### 1.7. ipurada Reprodüksiyon

Balıklarda reme, i mekanizmaları harekete geçiren çevresel olaylar yardımıyla başlamaktadır. Balıklarda üremeyi uyaran eksternal faktörler türlere göre farklılık göstermesine rağmen, internal mekanizmalar birbirine benzemektedir. Balıklarda üremenin kontrolu için hormon kullanımı yaklaşık 60 yıldır uygulanmaktadır (Rottmann ve ark., 1991).

Diğer canlılar gibi, balıklarda da hayatlarını sürdürebilmek ve geliştirebilmek için kendilerini bulundukları ortama (tatlı su veya deniz suyu) adepte etmek zorundadırlar. Doğada varolabilmek için verilen bu mücadelede, en önemli nokta üremedir. Bu nedenle yumurtaların bırakılacağı bölge, evre şartları ve zamanda büyük önem taşımaktadır (elikkale, 1991).

Balıklarda reme birçok eksternal (dış) faktörün etkisi altındadır. Bu faktörlerden en önemlileri; fotoperiyot, su sıcaklığı, su kalitesi (znmş oksijen, ph, sertlik, tuzluluk, alkalilik), su taşkınları, sel, su akıntısı, gelgit ve ayın safhaları, hava şartları (atmosfer basıncı, yağmur) yumurta bırakılacak yer (su bitkileri, odun parçaları, koğuklar), beslenme, hastalıklar, parazitler ve diğer balıkların varlığıdır. Bu faktörler birbirlerinden bağımsız olmayıp, birbirleriyle bağlantılıdır (Rottman ve

ark., 1991). Deniz balıklarının hemen hepsi ovipar olup, external fertilizasyon (dış dölleme) görülür (Saka, 1995).

Belirtilen bu etkenler balık türü için uygun olan çevre koşulları sağlanıncaya kadar gonadlar hareketsiz ve dinlenme durumundadır. Yaklaşan üreme mevsimi ile uygun çevre koşulları endokrin sistemi harekete geçirir ve gonadal gelişimi hızlanır. Ancak, çevre koşullarında meydana gelecek ani değişimler gonadal gelişimi durdurabilmektedir. Bu durumda gonadlar tekrar çevre şartları düzelene kadar dinlenme fazında bekler. Olumsuz şartların uzun süre devam ederse gametler vücut tarafından rezorbe (emilme) edilir (Billiard 1992).

Balıklar genellikle yumurta ile üreyen canlılardır. Balıkların % 95 'den fazlasında dış dölleme gerçekleşmektedir. Dişi balık tarafında bırakılan yumurta su içerisinde erkek balık tarafından döllendir ve türlere göre değişen süre sonunda yavru (larva) çıkar (çipurada ortalama 60 – 72 saat, alabalıkta 20 – 24 gün).

Çipura balıkları son 15 - 20 yılda ilgi çeken ve yetiştirilmeye alınan bir tür olduğundan türün her an cinsiyet değiştirebildiği zaman zaman gözlenmektedir. Doğadan yakalanan yaşlı balıkların önemli bölümünün dişi olması ve iki yaşlı balıklarda erkek bireylerin yüksek oranda olması, bu türde balıkların 2. yaştan sonra çoğunlukla dişi olduklarını göstermektedir (Alpbaz, 2005; Saka ve Fırat, 2006).

Üreme yönünden, protandurus (ilkin erkek olma hali) hermafrodit, asenkronize ovaryum gelişimi ve çoklu günlük yumurtlama görülür (Francescon ve ark., 1994; Zohar ve ark., 1995). Yapılan çalışmada,  $21 \pm 3$  °C de 4 aylık çipuraların gonadlarında sitolojik ve topoğrafik olarak hiçbir farklılaşma olmadığını, 5. ayda topoğrafik farklılaşma başladığı bildirilmiştir. Konjektif (bağ doku) gonadın dorsalinde ovaryum, ventralinde testiküllerin oluşumu başlar. Gonadın ventralinde 5 aylık balığa göre daha fazla spermatogonium vardır. 8. ayda gonadın dorsal kısmı genç bir ovaryum görünümündedir. Ovaryumlarda yumurtanın oluştuğu lameller

(ovogaröz lameller), dorsal kısımda büyük bir bölümü işgal ederler. 9. ayda ovagaröz lamelerin içleri, oogonia dejenerasyonu sonucu boşalmıştır.

10 - 11. aylarda, gonadın ventral kısmında spermatogenezis başlamıştır. Testiküler tüplerdeki spermatozoitler yola çıkarak germinal hücrelerin bulunduğu bölüme yerleşir. Testiküler kısım gonadın dorsal kısmını çevirmeye başlar ve büyür. Spermatozoit kanalı ovaryum ile testiküllerin arasındadır. 1 - 2 dişi germinal hücre yatağı merkezin kenarında sıkışıp kalır. Bunlar ovogoniumlardır ve oositleri mayoz bölünmesi ile primer vitellogenesis (sarı kese oluşumu) olayının oluşmasını sağlayacaklardır. 12. ay üremenin ilk sezonudur. Populasyonun tüm bireyleri erkek özelliği gösterir. Gonadın ventral kısmında olgun bir testikül vardır. Spermatozoitlerin doldurduğu tüplerde spermiyasyon olayı meydana gelir (Francescon ve ark., 1994; Zohar ve ark., 1995).

Cinsiyet dönüşümü 13 - 16. aylar arasında başlar. Bu dönemde gonadın testiküler bölümü boşalmaya başlar ve dinlenme durumuna geçer. Ovaryum kısmında ovogoniumlar hızlı bir şekilde çoğalmaya başlar. Primer oositler hızlı bir şekilde previtellogenesis dönemine girer. 16. ayda ovaryum gonadın % 80'lik bölümünü kaplar. 17. ayda bazı bireylerde gametogenezin yönü değişir. Bireylerin yaklaşık % 80'i dişileşme yönünde cinsiyet değişimini sürdürür. Bu balıklar gonadlarının dorsal kısmında oositlerin previtellogenetik gelişimleri biter ve hızla vitellogenesis safhasına (350 - 800  $\mu$ ) girerler. Bu sırada gonadın ventral kısmı, tedrici olarak dejenere olur ve spermagonialarda atrezi görülür. 23 - 24. aylarda ikinci üreme sezonuna girerler. Populasyonun % 20'lik kısmında cinsel değişim durur ve gonadın dorsal kısmında previtellogenesis safhasındaki oositler hızla atreziye uğrar. İkinci yaştan sonra takip eden yıllarda dişiler fonksiyonel olarak görev yapmaya devam eder (Francescon ve ark., 1994; Zohar ve ark., 1995).

Doğal koşullarda iki yaşında dişi özelliği gösteren anaçlar üç yaşında intersex özelliği taşıyabilmektedir. Bu bireylere hormon müdahalesi yapılırsa erkek olarak görev yaparlar. Aksi halde 4 yaşında dişi özelliği gösterirler. Bu cinsiyet dönüşümleri

bulundukları popülasyonun dişi erkek oranına göre değişim gösterebilir. Çipura balıklarının erkek bireylerinde spermatogenesis tamamlandığında dişilerin çoğunda oosit hücrelerinin olgunlaşması ve yumurtaların atılması için gereken hazırlık devam etmektedir. Çipura erkeklerinden Ekim ve Mart ayları arasında sperma almak mümkündür (Saka ve Fırat, 2006).

Yumurtlama olgunluğuna gelmiş damızlıklarda, morfolojik olarak dişilerin karın kısmında belirgin bir şişlik, karında sarı-yeşil bir bant görülür. Bu bant yumurtlama yaklaştıkça koyulaşır. Erkek balıklarda bu bant sarıdır ve karın sıvazlandığında süt gelir (Alpbaz ve ark., 2005). 2 ve 3 yaşındaki balıklar denizdeki kafeslerinde kendiliğinden üreyebilmektedir. Yıl boyunca vücut ağırlığının 0,5 - 2,0 katı arasında yumurta bırakabilirler. 3 - 4 aylık yumurtlama periyodunda ortalama yumurta veriminin 20 - 30 bin yumurta/kg anaç/gün olabileceği yani bir üreme sezonunda 2 - 3 milyon yumurta/kg canlı ağırlığa ulaşabileceği belirtilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada protandrous hermaphrodit Sparidae ailesine ait türlerin triploid bireyleri, erkek olarak kalmakta ve histolojik incelemelerde oosit ve ovaryum yapılarına sahip olmadığı bildirilmektedir (Haffray ve ark, 2005; Zohar ve ark., 1989).

### **1.7.1. Erkeklerde Reprodüktif Fizyoloji**

#### **1.7.1.1. Pubertas**

Erkek Balıklarda reprodüktif etkinliğin başlaması, belirli bir vücut gelişimine ulaşması, uygun sıcaklık derecesinin varlığı, ışık ve hormonal mekanizma ile doğrudan ilişkilidir. Genellikle balıklarda erkekler, dişilerden daha erken cinsel olgunluğa ulaşırlar. Çipurada ise ilk yıl popülasyonun tüm bireyleri erkek özelliği gösterir. Pubertaya ulaşma yaşı açısından balık türleri arasında Tilapia'a 4 - 6 ay ile ilk sırayı almaktır. Pubertas yaşı alabalıkta 2 - 3 yıl arası, mersin balığında 15 yıl, levrek erkeklerinde 2. yıl, dişilerinde 3. yıl ve çipurada 1 yıldır (Billiard, 1992; Alpbaz, 2005).

### 1.7.1.2. Spermatogenesis ve Endokrin Düzeni

Spermatozoon, testislerde spermatogenesis olarak adlandırılan bir dizi sitolojik aşamaların sonucunda spermatozoon'un ana hücreleri olan spermatogonia'lerden oluşmaktadır.

Üreme mevsiminde endokrin sistemin harekete geçmesiyle testislerdeki spermatogenetik birimlerin germativ epitelden köken almakta olan spermatogoniumlar, mitoz yoluyla çoğalıp diferensiye olarak *spermatogonia* A ve B gonositlerini meydana getirmektedirler (Billard, 1992).

*Spermatogonia* B mitoz yoluyla bölünerek primer spermatositleri oluşturur. Primer spermatositlerde kromozom sayısı  $2n$  (çipurada 48), yani diploid'dir. Primer spermatositlerin I. redüksiyon bölünmesiyle sekunder spermatositler oluşur. Sekunder spermatositlerin II. mayotik bölünmeden sonra spermatidler oluşur. Spermatid'ler metaformoza uğrayarak spermatozoonları oluştururlar. Oluşan spermatozoa lumene (testis kanal boşluğu) verilir ve kanal sisteminin (gonaduct) özel salgısıyla birleşerek spermayı (süt, milt, balık sütü) oluşturur. Sperma üreme mevisiminde uygun şartlar oluşana kadar dinlenme durumunda kalır (Billard ve Cosson, 1992; Fishbase, 2009; Loir, 1990).

Spermatogenesis, hipotalamustan salgılanan gonadotropin salgılatıcı hormonun (GnRH) etkisi ile hipofizden salgılanan gonadotropinlerin kontrolü altındadır. Seksüel olgunluğa ulaşan yada üreme mevsiminde bulunan erkeğin endokrin sistemi özellikle sıcaklık ve ışık başta olmak üzere, tuzluluk ve pH gibi çevre koşullarına bağlı olarak gelişim göstermektedir (Von Schalburg ve ark., 1999).

Hipofizden salgılanan gonadotropinler (GtH I ve GtH II), spermatogenezis ve testiküler steroitlerin üretimini düzenlemektedir. Bu düzenlemeyi GtH I (LH) için Leydig hücrelerinde, GtH II (FSH) için ise Sertoli hücrelerinde bulunan reseptörler vasıtasıyla yapmaktadır. GtH I'in biyolojik etkisi testislerdeki intersitisyel

bağdokuda bulunan Leydig hücrelerinden erkek balıklarda cinsiyet steroidi olan 11-ketotestosteron salgılanmasını düzenlemektir. GtH II ise etki mekanizmasının balıklarda tam belli olmamakla birlikte spermatogenezisi düzenlemektedir (Koldras ve ark., 1990; Schulz ve ark., 2001).

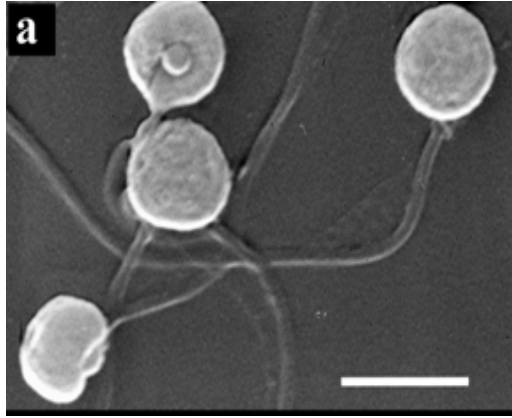
Erkeklerin, dişilerin yumurta bırakma zamanından 2 ay önce, Gonadosomatik indekslerinin (GSI) yükselmesiyle beraber spermiyasyonun başladığını bildirmiştir. Erkeklerde spermiyasyon, dişilerin GSI'nin düştüğü yumurtlama periyodundan 1 ay sonraya kadar sürebilir. Erkekler, sperma vermeye başlamasıyla beraber plazma 11-Ketotestosteron (11 - KT) artmaya başlar ve sonra hemen düşer. 11 - KT'nin levrek erkeklerinde spermiyasyonun başlamasıyla ilgili olduğu düşünülmektedir (Fauvel ve ark., 1999).

#### **1.7.1.3. Spermatozoon ve Sperma**

Balık spermatozoonu üzerinde yapılan çalışmalar türler arasında çok çeşitli şekil ve ultrastrüktürel yapı varlığını ortaya koymaktadır. Balık türlerinde aflagella (kuyruksuz)'dan biflagella (çift kuyruklu)'ya kadar değişen, çok çeşitli şekil büyüklük ve yapıda spermatozoonlar olduğu bilinmektedir. Spermatozoonun yapısal farkları türler arasındaki filogenetik yakınlığı ortaya koymakta yardımcı olmaktadır (Jameison, 1991; Maricchiolo ve ark., 2007).

1970 yılında Mattei tarafında tanımlanan Sparidae spermatozoonu, çipura spermatozoonu (Mattei, 1991) ile aynı yapıya sahiptir. Küre şeklinde, akrozomsuz bir başa sahiptir. Kısa ve biçimsiz orta kısım, silindirik ve uzun bir kuyruğu vardır. Ailenin türleri arasındaki farklar yan kanat sayısı, mitokondri sayısı ve hücre organelerin organizasyonudur. Spermatozoonun mikroskopik yapısının bilinmesi dondurma sonrası oluşacak hasarları araştırmak için de önemlidir (Maricchiolo ve ark., 2007).

Maricchiolo ve ark. (2007)'ın yaptığı çalışmada olgunlaşmış spermatozoon başı  $1.87 \pm 0.19 \mu\text{m}$  ( $n=50$ ) olup yoğun granüler kromatain içermektedir. Orta kısım kısa ve düzensiz bir şekile sahiptir. Bir mitokondri orta kısımda görülebilmektedir. Mitokondride yoğun elektronlu matrix ve düzensiz yapıdaki yerleşen tubuler krista görülmektedir. Orta kısım seviyesinde aksonema, plasma membranından ince bir sitoplazmik kanal sayesinde ayrılmaktadır. Aksonema tipik ökaryotik organizasyon gösteren, 9 çift dış mikrotübül ve bir çift merkezi mikrotübüle sahiptir. Silindirik yapıya sahip kuyruk kısmı  $53.27 \pm 5.57 \mu\text{m}$  ( $n=50$ ) uzunluğunda ve nükleusa dik yer almaktadır.



Şekil 1.4. Çipura spermatozoonu (Maricchiolo ve ark., 2007)

Çipura spermatozoonu Jameieson'un (1991) tarif ettiği akrozomsuz, tek kuyruklu, tipik dış döllenme yapan spermatozoon ile aynı yapıya sahiptir. Bu yapı spermatozoon küresel yada ovoid yapıda nükleus (çekirdek), kısa bir orta kısım ve bu kısımda küresel yapıda birkaç mitokondri ve tek flagellar kuyruğunda  $9 + 2$  mikrotubuler yapıya sahiptir.

Çipura spermatozoonu Sparidae ailesindeki pek çok tür gibi (*Diplodus sargus*, *Diplodus puntazzo*, *Pagrus major*) orta kısımda tek mitokondriye sahiptir. Ailenin bazı diğer türlerinde yine türe bağlı 3 veya 4 mitokondri olduğu belirtilmiştir. Spermanın motilitesi spermatozoonun orta kısmının büyüklüğü, içerisindeki mitokondrilerin sayısı ve mitokondrinin büyüklüğü ile ilgilidir. Mitokondriyal respirasyon ile üretilen ATP spermatozoonun ana enerji kaynağıdır (Lahnsteiner ve Patzner, 1995; Maricchiolo ve ark., 2007).

#### 1.7.1.4. Spermanın Elde Edilmesi

Balıklarda sperma genellikle abdominal masaj yöntemiyle sağım yapılarak alınır. Baş tarafı yukarı gelecek şekilde tutulan balığın karın bölgesine sıvazlama şeklinde yapılan masaj ile sperma bir kabın içine alınır.

Balıklardan gamet toplamak için öncelikle anesteziye alınması önerilmektedir. Bu işlem için MS 222 (Tricaine Methane Sulphonate), Phenoxyethanol (Fenoksietanol), Chinalgine, Clorbutanol ve karanfil yağı banyoları kullanılabilir (Akçay ve ark., 1995).

Vakum yöntemiyle erkeklerden sperma alımı için bir şişenin ağzına geçirilen mantara, biri ince diğeri kalınca iki lastik boru takılır. İnce boru şişenin dibine kadar iner, kalın lastik boru mantarın hemen altında son bulur. İnce borunun diğeri ucu erkek balığın cinsiyet deliğine geçilir, kalın borunun ucuyla ağızdan emilir. Böylece sperma şişenin içerisine dolar. Bir diğeri yöntem ise hava basıncı yöntemidir. (Çelikkale, 1994).

Sperma üretilmesinde ve elde edilmesinde, dişilerin olumlu etki yarattığı, bunun nedeni olarak dişilerin feromonlarının etkili olduğu düşünülmektedir (Büyükhatipoğlu ve Holtz 1984).

Çipurada ise genellikle karına uygulana hafif basınçla sağım yöntemi veya genital kanaldan uçsuz enjektör ile aspirasyon yöntemi kullanılarak alınmaktadır. İki yöntemde de karın bölgesine hafif bir basınç uygulanmaktadır (Cabrita ve ark., 2005a,b; Fabbrocini ve ark., 2000)

Cabrita ve ark. (2005a) çipurada gamet toplamak için 2 yaşlı ortalama 1,2 kg olan erkekler ve 3 yaşlı ortalama 3,5 kg olan dişiler seçilmişlerdir. Araştırma, çipuranın üreme sezonun ortasında (Güney İspanya'da üreme sezonu Aralık-Mart)

yapılmıştır. Araştırmada yapay koşullar altında 7 saat ışık 17 saat karanlık uygulanan dişi ve erkeklerin bir arada bulundurulduğu 20 tonluk tanklarda su sıcaklığı  $19 \pm 1$  °C olarak ayarlanmıştır (Cabrita ve ark., 2005a).

Cabrita ve ark. (2005a) ise sperma almadan önce balıkları 125 mg/l MS-222 (Sigma) ile anesteziye alınmışlardır. Abdominal masaj yöntemi ile 1 ml sperma enjektöre çekilmiştir. Sperma alınmadan önce idrar yollarına hafif baskı yapılarak olası idrar karışmasının önüne geçilmilmeye çalışılmıştır. Ardından genital bölge temizlenip, spermaya idrar ve dışkı karışması engellenmiştir. Alınan spermalar hemen 15 ml'lik plastik kaplarda birleştirilmiştir.

Kalkan balığında yapılan bir çalışmada sağımla elde edilen spermanın motilitesinin, intratestiküler (testis içi) spermanın motiltesine göre daha yüksek olduğu ortaya konulmuştur. Genital kanal ile üriner kanalın yakınlığından dolayı sperma sıklıkla idrar ile kontamine olmaktadır. Kalkan balığında (*Scophthalmus maximus*) yapılan bir çalışmada kontaminasyonun % 15,3 olduğu gözlenmiştir (Suquet ve ark., 2000).

Spermaya idrar karışması spermatozoonun motilitesini, hızını, dölleme kapasitesini ve donma kabiliyetini olumsuz etkilemektedir. Spermanın idrar veya mukusla karışması osmolaritenin ve pH'nın düşmesine neden olur. Levrek ve çipura gibi yüksek spermatozoon yoğunluğuna sahip balıklarda idrar kontaminasyonu renk değişikliğinden ve viskoziteden dolayı çok kolay tespit edilebilmektedir. Kontaminasyonu önlemek için kateter uygulaması yapılabilir. Spermanın dışkı ve idrarlı kontamine olmasını önlemek için genital bölge kuru bir bez veya kağıt havlu ile kurulmalıdır (Cabrita ve ark., 2005a,b; Fauvel ve ark., 1999; Suquet ve ark., 2000).

### 1.7.1.5. Spermatolojik Özellikler

#### 1.7.1.5.1. Sperma Rengi

Spermanın rengi bir çok balık türünde olduğu gibi çoğunlukla beyaz-krem renge sahiptir. Zaten bu beyaz renginden dolayı balık spermasına “balık sütü – ersuyu” veya milt denilmektedir (Seçer, 1998).

Spermanın renginin bazı durumlarda beyazın yanında soluk kırmızı ve soluk sarı renkte de olabileceği belirtilmiştir. Bu renk farklılıkları özellikle bakım besleme şartları, bireysel özelliklere, çevresel faktörler ve hastalık etkenlerinden kaynaklanmaktadır (Aas ve ark., 1991).

#### 1.7.1.5.2. Sperma Miktarı

Barbato ve ark. (1998) yaptıkları çalışmada çipuradan 0 – 3,1 ml sperma elde etmişlerdir. Cabrita ve ark. (2005a) çipurada abdominal masaj yöntemi ile 1 ml spermayı enjektöre çekmişlerdir fakat alınabilecek miktar belirtilmemiştir. Fauvel ve ark., (1999) ise levrekte yaptığı çalışmada, her bireyden 2 ml olacak şekilde enjektöre çekilmiştir. Turbot (*Psetta maxima*), sarı kuyruk (*Seriola dumerilli*) ve dil balığı (*Pleuronectes ferrugineus*) gibi türlerde ise 1 ml’den daha az sperma alınabilmektedir (Clearwater ve Crim, 1998; Suquet ve ark., 1992).

Salmonidea familyasında sperma miktarı türlere göre değişim göstermektedir. Bunun yanında aynı türün bireyleri arasında da farklılıklar olabilmektedir. Yine reproduktif sezonun başı, ortası ve sonunda diğer spermatolojik faktörlerde olduğu gibi değişiklikler gözlenmektedir (Büyükhatipoğlu ve Holtz, 1984).

Gökkuşığı alasında sperma miktarı ortalama 6 - 12 ml olarak bildirilmesine karşın bu miktar pek çok faktöre göre değişebilmektedir. Bunların başında suyun sıcaklığı, spermanın sağım aralığı, yaş, ortamındaki dişi varlığı ve özellikle bakım besleme şartları sperma miktarı üzerine oldukça etkili faktörler olarak bildirilmektedir (Büyükhatipoğlu ve Holtz, 1984; DeGraaf ve ark., 2004).

Tekin ve ark. (2003) gökkuşığı alasında yaptığı çalışmaya göre sperma miktarı ile vücut ağırlığı ve vücut uzunluğu arasında pozitif bir ilişki bulunmaktadır. Barbato ve ark. (1998) 'a göre ise çipuralarda böyle bir korelasyon olmadığı belirtilmiştir.

#### 1.7.1.5.3. Sperma Motilitesi

Bir yönde ve güçlü hareket eden spermatozoon'ların hareketsiz ve diğer hareket biçimi gösterenlere oranıdır. Yalnız motil spermatozoonların dölleme güçleri olduğu kabul edildiğinden, yapılacak muayenelerde motilite saptanması önemli yer tutar. Motilite oranını belirlenmesiyle, hem erkek hayvanların döllenme güçleri büyük ölçüde belirlenir hemde ejakülatın değişik amaçlarla kullanılması ve değerlendirilmesine olanak sağlar (Tekin, 1994).

Alınan spermanın kullanılmadan önce motilitesine bakılması gerekmektedir. Balık sperması testislerden çıktığında motil olmamasından dolayı türlere uygun (tatlı su türü yada deniz balığı türü) şekilde aktive edilmesi gerekmektedir (Suquet ve ark., 2000). Spermanın aktivasyonu için bir çok hücre dışı etken bildirilmiştir. Deniz balıklarında flageller aktivasyonu hiperosmotik osmotik (500 - 1100 mOsm), tatlı su balıklarında ise hipoosmotik ortam (0 – 100 mOsm) sağlamaktadır. Salmonid'lerde ve mersin balığında motilite aktivasyonun en önemli tetikcisi  $K^+$  konstarasyonudur (Billiard, 1983; Zilli ve ark., 2008). Deniz balıkları ile ilgili literatürlerde böyle bir bulguya rastlanmamıştır. Zilli ve ark., (2008) çipurada  $K^+$  ve  $Ca^{2+}$  'ın sperma aktivasyonda hiç etkisi olmadığı ve spermasını aktive etmek için optimum osmolarite 1100 mOsm/Kg olarak belirtilmiştir.

Billard ve Cosson (1992)' na göre spermatozoonları aktive etmek için yüksek oranda sulandırma yapılması gerekmektedir. Ancak bu durumda tüm spermatozoa'ların eşzamanlı ve aynı oranda hareket kabiliyeti kazandıkları belirtilmiştir. Düşük oranlı sulandırıldığında spermatozoonların sadece bir kısmı motil duruma geçmektedir.

Zilli ve ark, (2008) nativ çipura spermasının motilitesini % 90 - 100 olarak vermişlerdir. Rideout ve ark., (2004) kod (*Gadus morhua*) ve *Melanogrammus aeglefinus* balıklarında sperma alma zamanının motilite açısından büyük önem arz ettiği belirtilmektedir. İki türde de üreme sezonun başlarında ( 1. ve 2. haftada) alınan spermanın sonlarında (bitime 1 veya 2 hafta kala) alınan spermadan dondurma sonrası en az % 40 motilite farkı yarattığı gözlenmektedir. Aynı şekilde Chao ve ark. (1986) çipura gibi Sparidae ailesine ait *Acanthopagrus schlegelii*'in spermasının üreme sezonun başlarında alınmasının dondurma başarısında büyük öneme sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Kalkan balığı (*Scophthalmus maximus*) spermasına katılan sulandırıcın içerisinde dimetil sülfoksit (DMSO, Me<sub>2</sub>SO) gibi kriyoprotektanların katılması osmolariteyi 1100 mOsmol/kg'a getirmekte ve spermatozoonların 1 dk'a yakın süre hareketlenmelerine neden olmaktadır. Buda spermatazoon için büyük öneme sahip olan ATP'nin azalmasına neden olmaktadır fakat, kalkan balığı spermasının bu hareket sırasında enerji sentezlediği için hareket kabiliyetini etkilemediği düşünülmektedir (Dreanno ve ark., 1997).

Genel olarak balıklarda yaşca ileri ve tecrübeli erkeklerin daha genç olanlara oranla; miktar, kalite, yoğunluk ve fertilizasyon kabiliyeti yönünden daha iyi sperma verdikleri bildirilmiştir (DeGraaf ve ark., 2004).

#### 1.7.1.5.4. Spermatozoanın Canlılık Süresi

Rainis ve ark. (2003), yaptıkları bir çalışmada canlılık süresini *Salmo trutta* için 90 saniye, alabalık için ise 60 saniye olarak, çipura için ise bu süre 50 dakika gibi çok uzun bir süre olarak belirtilmiştir. Zilli ve ark. (2008) ise bu süreyi çipura ve aynı aileye ait bir tür (*Lythognathus mormyrus*) için de 7 - 10 dk olarak belirtmişlerdir. Fabrocini ve ark. (2000) ise iki araştırmacıdan da farklı olarak çipuranın motilite süresini 23 – 24 dk olarak vermişlerdir.

Çipura spermasının canlılık süresindeki bu farklılıkların, levrek spermasında da söz konusu olduğu fakat değerlerin birbirlerine daha yakın olduğu görülmektedir. Dört farklı araştırmacı levrek spermasını motilitesini süresini 40 sn, 0,9 - 1,2 dk, 2 dk ve 3 dk olarak vermişlerdir (Billard, 1978; Fauvel ve ark., 1999; Rainis ve ark., 2003; Sorbera ve ark., 1996).

Motilite süresinde aynı türün bireyleri arasında dahi farklar olabilmektedir. Bu sürenin uzunluğu ortamın sıcaklığından, ATP seviyesinden, sulandırıcıdaki  $Ca^{++}$  yoğunluğundan ve pH'dan etkilenmektedir (Billiard ve Cosson, 1992; Tekin ve ark., 2003).

Balık spermasının motilite süresinin kısa olmasını, motilite tayininde çok seri olmayı gerektirmektedir. Fauvel ve ark. (1999) levrekte yaptığı çalışmada aktivasyondan 10 sn sonra spermanın en yüksek motiliteyi gösterdiği ve hızla motilitesinin azaldığını, 40 sn sonra motilitenin sıfırlandığını rapor etmişlerdir.

#### 1.7.1.5.5. Spermatozoa Yoğunluğu

Birim hacim spermada bulunan spermatozoa sayısı olarak tanımlanabilir. Spermanın  $1\text{ mm}^3$  veya  $\text{cm}^3$ 'de bulunan toplam spermatozoa sayısının bilinmesiyle ancak, motil

spermatozoon oranı veya diğer spermatolojik özellikler sayısal olarak ifade edilebilir (Tekin, 1994).

Balık spermasının yoğunluğun saptanması için hemositometrik, spermatokrit ve spektrofotometrik yöntemler olmasına karşın genelde spektrofotometrik yöntem (260 nm dalga boyu) kullanılmıştır. Yoğunluk tayininden önce sperma distile su ile sulandırılmıştır (Fauvel ve ark., 1998, 1999; Suquet ve ark., 2000).

Cabrita ve ark. (2005a) çipura spermanın yoğunluğunu  $5,5 - 17,5 \times 10^9$  spermatozoa/ml olarak vermişlerdir. Barbato ve ark. (1998) ise yoğunluğun  $11,6 - 26,7 \times 10^9$  olarak değiştiği, ortalamanın ise ml'de  $17,95 \times 10^9$  olduğunu bildirmişlerdir.

Levrekte yapılan çalışmada Fauvel ve ark. (1999) spermatozoon yoğunluğunun  $60 \times 10^9$  olabileceğini belirtmişlerdir ve bir balık için tespit edilmiş en yüksek yoğunluğa ( $60 \times 10^9$ ) üreme sezonunun ortasında rastlandığı bildirilmişlerdir. Sivriburun karagöz (*Diplodus puntazzo*, Sparidae) spermasının yoğunluğu ise üreme sezonun ortalarında  $27,1 \times 10^9$  sonlarına doğru  $12 \times 10^9$  olarak bildirilmiştir (Papadaki ve ark., 2008).

#### 1.7.1.5.6. Spermanın pH'sı

Balıklarda da diğer türlerde olduğu gibi spermanın pH'sının bilinmesi spermaya uygulanacak işlemler açısından oldukça önemlidir. Balık sperması pH'sı genel olarak 5,5 – 9,5 arasında değişim göstermektedir (Suquet ve ark., 1993; Akçay ve ark., 1995). Cabrita ve ark. (2005a), çipura spermasının pH'sını 8,3 olarak belirlemişlerdir.

#### 1.7.1.6. Spermanın Dondurulması

Kontrollü balık üretimi, hayvansal protein ihtiyacının karşılabilmesi için günümüzde oldukça büyük boyutlara ulaşmıştır. Balıkların genetik potansiyeli, türlerin ve soyların çaprazlanması ve gamet manipulasyonları yoluyla ıslah edilebilmektedir. Bu uygulamaların bazıları spermanın saklanması (preservasyon) gerektirir (Akçay ve ark., 1995).

Spermanın saklanması balık yetiştiriciliğinde uygulanan seleksiyon programlarında büyük önem taşımaktadır. Aynı tür balıkların jenerasyonlar boyunca aynı ortam ve koşullarda yetiştirilmesi mevcut populasyonunda az bulunan genlerin kaybolmasına ve heterozigotluğun azalmasına neden olmaktadır. Genetik varyasyondaki bu azalma; mevcut balık stokunun ileri dönemlerde seleksiyon programlarında kullanılma potansiyelini sınırlamaktadır (Bozkurt, 2004).

Balıklarda dondurulmuş sperma henüz geniş kullanım alanı bulamamıştır. Deniz balıklarının spermalarının dondurmaya karşı daha dayanıklı olduğu, bunun da nedenin spermatozoon membranındaki kolesterol/fosfolipit oranının yüksek olması ve başlangıçtaki ATP içeriğinin olduğu düşünülmektedir. Yine soğuğa karşı dirençte deniz balıklarının spermatozoon membranında bulunan fosfatil kolinin etkili olabileceği vurgulanmıştır (Drokin 1993; Suquet ve ark., 2000).

Balık spermatozoonlarının küçük yapısından dolayı sulandırma sonrasında penetrasyon hızlıca meydana geldiğinden ekuibrasyon (alışım) safhasına gerek yoktur. Alışım aşamasının uygulanmaması kriyoprotektanların toksik etkilerinin de minimize etmektedir. Çipuralarda yapılan çalışmada, DMSO katılan spermaların 2 dakikadan fazla alışıma bırakıldığında dölleme oranlarının daha düşük olduğu gözlenmiştir (Billard 1978; Jamieson 1991).

Bundan farklı olarak Ogier de Baulny (1997)'nin bildirdiğine göre, gökkuşağı alasında DMSO'nun spermatozoonlara penetrasyonu için 10 dakika süreye ihtiyacı olduğu fakat alışımın uygulanıp uygulanmamasının fertilitiyi etkilemediği bildirilmektedir.

Gliserolün kriyoprotektan olarak başarı ile kullanıldığı türlerde ise alışım aşamasının uygulanması gerektiği bildirilmektedir, Doi ve ark. (1982), mavi yüzgeçli tuna balığında yaptıkları çalışmada gliserolün penetrasyonunun yavaş gerçekleşmesinden dolayı 30 dakikalık bir alışım uygulamışlardır.

Bir türün spermasını dondurmak için ideal prosedürü belirlemek kolay değildir. Dondurmanın başarısı etkileyen bir çok faktör vardır. Bu faktörler sulandırma, kriyoprotektan, alışım süresi (ekulibrasyon), sulandırma oranı, soğutma oranı, çözündürme sıcaklığı ve süresi, çözündürme sonrası aktive edilene kadar geçen süre ve bazı diğer faktörler olarak belirtilmektedir. Bir diğer önemli faktör ise spermanın alındığı zaman (üreme sezonun başı, ortası, sonu) olarak belirtilmektedir (Rideout ve ark., 2004; Suquet ve ark., 2000).

Balıklarda spermanın dondurularak saklanması yararları;

- 1- Melezleme çalışmalarının, üreme mevsimi farklı türler arasında yapılmasını sağlamaktadır.
- 2- Mevcut spermanın tümünün dondurulmasını sağlar. Özellikle spermanın eldesi zor olan türler ve tutsak olarak yaşadığı için sperma eldesi düşük olan türler için (ör. japon yılan balığı (*Anguilla japonica*)) önem taşımaktadır.
- 3- Üreme mevsimi dışında yavru elde etmek için işletme giderlerini artıran sıcaklık ve fotoperiyot gibi senkronizasyon çalışmalarının sadece dişilere uygulanarak giderlerin azalmasını sağlar.
- 4- Gamet taşınmasını kolaylaştırır. Özellikle farklı yerlerden toplanan yumurta ve sperma için önem taşımaktadır. Aynı zamanda doğal hayattaki genlerin kuluçkalara aktarımını kolaylaştırır.

- 5- Sperma yaşlanmasını önler. Üreme sezonu boyunca sperma kalitesi çeşitlilik göstermektedir. Kriyopreservasyon uygulanacak spermaların en yüksek kalitede olanlardan seçilebilmesine olanak sağlar.
- 6- Deney ve araştırmalarda büyük önem taşır. Genetik çalışmalarda ve yetiştiricilik performansı karşılaştırmalarında yarar sağlamaktadır.
- 7- İstenilen karakterler elde etme, istenen karakterlerde seleksiyon yaparak bir örnekliklik oluşturmaya katkı sağlar.
- 8- Gen kaynaklarının korunmasında kullanılır. Özellikle nesli tükenmekte olan ve protogynus hermafrodit (ilkin dişi olma hali) türlerde önem taşımaktadır. 5 – 10 yaşında erkek olan türler için gen kaynaklarının korunmasında kullanır (Fabbrocini ve ark., 2000; Suquet ve ark., 2000).

Dondurulmuş spermada hem viabilite (canlılık) oranı düşmüş, hemde spermatozoonların fonksiyonları azalmıştır. Bunun nedenleri arasında soğuk şokuna uğramaları, osmotik strese maruz kalmaları ve hücre içi kristalizasyon gösterilebilir (Cabrita ve ark. 2005a; Chambeyron ve Zohar, 1990; Fabbrocini ve ark., 2000). Dondurma çözündürme sırasında oluşan hücre hasarının nedeni plazma membranının buz kristallerin oluşumundan olumsuz etkilenmesidir. Bu etkiyi en aza indirmek için kryoprotektanlar kullanılır (Fabbrocini ve ark., 2000).

Kriyoprezervasyon işleminin spermatozoa üzerine birçok olumsuz etkisi vardır. özellikle, sperma kalitesinin düşmesine, dölleme yeteneğinin azalmasına ve larval sağ kalma oranında düşmeye neden olur. Kriyoprezervasyon sırasında spermatozoon genomunda oluşan değişiklik sadece geç embriyonik safhayı etkileyebilmektedir (Suquet ve ark., 1998; Zilli ve ark., 2005). Dondurulmuş spermanın taze sperma ile benzer fertilizasyon ve yakın motilite oranına sahip olduğu tespit edilmiştir (Suquet ve ark., 1992, 2000).

Dondurulmuş spermanın motilite süresinin daha kısa, metabolizmasının ise daha farklı olduğu ve ek olarak suni tohumlamada kullanımında döllenmiş yumurtaların kuluçkadan çıkış oranlarının düşük olduğu saptanmıştır (Fauvel ve ark., 1998; Zilli

ve ark., 2005). Spermanın aktive edilmesinden 10 saniye sonra taze sperma ile dondurulmuş spermanın motilitelerinin birbirine yakın olduğu, buna rağmen motilite süresinin taze spermada 50 saniye iken, dondurulmuş spermada 40 saniye olduğu belirtilmektedir. Yine taze ve dondurulmuş spermanın aynı yoğunluklarının dölleme oranlarının farklı olduğu, taze spermanın daha fazla yumurtayı dölediği bildirilmiştir (Fauvel ve ark., 1998).

Özellikle *Serranidae* ailesine bağlı bir çok türde görülen protogynus hermafroditlik, yani dişi olarak pubertaya ulaşp 3 - 5 yaşına kadar dişi kalmaları, spermanın dondurulmasını daha önemli kılmaktadır (DeGraaf ve ark., 2004).

#### 1.7.1.6.1. Spermanın Sulandırılması

Sperma, sulandırılmadan dondurmaya uygun değildir. Deniz balıkları spermasının dondurulması için kullanılan sulandırıcılar çoğunlukla tuzlu (% 1-10 konsantrasyon) veya şekerli (% 1-10) solusyanlardır. Sulandırıcıların spermanın motilitesini aktive etmemesi gerekmektedir (Suquet ve ark., 2000).

Mounib sulandırıcısı (Mounib 1978) bir çok tatlı su ve deniz balıklarında başarıyla uygulanmaktadır. Sulandırma oranı 1 : 1 ve 1 : 20 arası değişmektedir. Sulandırma oranı arttırılan çalışmalarda, motilite oranı ve süresi düşmüştür. Sulandırma oranı arttığı zaman oluşan hasarın nedeni, seminal plazma proteinlerinin yüksek sulandırma oranında koruyuculuğunun azalması olarak gösterilmektedir. Seminal plazma proteinlerinin bu özelliği sadece tatlı su balıklarında ve kalkan (turbot) balığında bildirilmektedir (Billiard, 1983; Chauvaud ve ark., 1995; Fauvel ve ark., 1998).

Çipura spermanın sulandırmasında bir çok araştırmacı % 1 NaCl kullanmıştır. (Barbato ve ark. 1996, 1998; Fabrocinni ve ark., 2000; Cabrita ve ark., 2005a,b). Cabrita ve ark. (2005a,b) kriyopreservasyon için Fabbrocini ve ark. (2000)'nın

kullandığı sulandırıcılara (% 1 NaCl, 300 mOsm/kg ve %5 Me<sub>2</sub>SO) ek olarak plazma membranını koruması ve spermatazoonların bir araya toplanmalarını önlemek için 10 mg/ml BSA ilave edilmesi gerektiğini bildirmişlerdir.

DeGraaf ve ark., (2004) yaptıkları çalışmada sulandırıcılarının glutatyon ve sukroz içermesi osmotik basıncı artıracaklarını, sperma osmolaritesine göre yüksek olması durumunda ise çözüm sonu motiliteyi olumsuz etkileyeceği bildirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada, osmatik basıncı 427 ve 766 mOsm olan Mounib ve modifiye Herring solusyonlarının, 324 mOsm olan modiye Mounib solusyona göre (taze sperma ~ 334 mOsm) daha düşük motilite verdiğini bildirmişlerdir. Sulandırıcılara sukroz katılması dondurma sırasında libozomal membranları kararlı hale getirdiği ve DMSO ile birlikte hücre dehidrasyonunu önlediği belirtilmektedir. Sulandırıcılardaki glutatyon seviyesinin düşürülmesi, hücre membranlarını lipid peroksidasyonu ve serbest radikallere karşı koruduğu belirtilmektedir.

Rideout ve ark., (2004) *Gadus morhua* (Kod balığı) ve *Melanogrammus aeglefinus* sperması tuz veya sukroz ağırlıklı sulandırırken, kriyoprotektan olarak DMSO, propilen glikol (PG) ve gliserol kriyoprotektan olarak kullanıldıklarını rapor etmişlerdir. Sonuçta iki türde tuz ağırlıklı sulandırma ve sukroz ağırlıklı sulandırma arasında istatistiksel bir fark bulunamamıştır.

Çipura ile aynı aileye ait mercan (*Pargus major*) sperması üzerine yapılan bir çalışmada (Liu ve ark., 2006) bir çok sulandırıcı; Cortland, Ringer, Hanks dengeli tuz solusyonu (HBSS), modifiye Mounib mediyumu (MMM), Mounib mediyumu (MO) ve tuzlu Mounib mediyumu (MNM) denenmiş olup çözüm sonu en iyi motilite Cortland ve HBSS mediumlarına % 15 DMSO katılarak alınmıştır. Taze sperma ile DMSO katılan dondurulup-çözdürülen sperma arasında motilite, dölleme oranı, kuluçka çıkış oranlarını açısından önemli fark bulunamamıştır.

Miyaki ve ark. (2005), *Serranidae* ailesine ait *Epinephulus moara* türünde yaptığı çalışmada sulandırıcı olarak kriyoprotektif ve antioksidan özelliği olan

trehalose solusyonun tek başına kullanılmasının basit, kolay uygulanabilir ve güvenilir bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir.

#### 1.7.1.6.2. Kriyoprotektanlar

Kriyoprotektanlar hücre içi (internal) ve hücre dışı (external) olmak üzere iki gruba ayrılır. Hücre içi kriyoprotektan olan etilen glikol (EG), PG, gliserol, dimetil asetat (DMA), DMSO ve metanol arasında genellikle DMSO yaygın olarak kullanılmaktadır. DMSO'nun diğerlerine göre daha etkili olmasının nedeni olarak hızlı penetrasyon yapması ve spermanın fosfolipit tabakasıyla etkileşime girmesinden kaynaklandığı belirtilmektedir (Suquet ve ark., 2000).

Methanol, deniz balıkları spermasının dondurulması açısından çok düşük bir etkinliğe sahiptir. EG ve PG ise birkaç türde tatmin edici sonuçlar verdiği bildirilmektedir (Suquet ve ark., 2000; Zilli ve ark., 2005). Deniz balıkları ile ilgili değişik kriyoprotektanların etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda genellikle DMSO'nun en iyi sonucu verdiği bildirilmiştir (Suquet ve ark., 2000).

*Acanthopagrus latus*'da Glyserol'ün, DMSO'dan daha iyi sonuçlar verdiği rapor edilmiş, fakat levrek ile aynı aileden (*Serranidea*) olan *Mycteroperca bonaci* 'de hiç, kalkan balığında ise çok az bir koruyucu özellik gösterdiği bildirilmiştir (Dreanno ve ark., 1997; Zilli ve ark., 2005). Bu bilgiler ışığında, her tür için farklı dondurma metodunun benimsenmesi gerektiği ortaya çıkmaktadır.

Fabbrocini ve ark. (2000) çipurada, kriyoprotektanların etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada, EG, PG, gliserol ve DMSO gibi kriyoprotektanlar arasında en az toksik etkiyi % 5 DMSO'de gözlediklerini bildirmişlerdir. Barbato ve ark. (1998) ise yine çipura spermasının dondurulmasında DMSO oranını % 15 olarak kullandıklarını bildirmişlerdir. Sulandırma sonrası düşük konsantrasyondaki DMSO motiliteyi olumsuz etkilese de, çözündürme sonrası diğer kriyoprotekthanlara göre daha az toksik

ve daha uzun süreli motilite sağladığını belirtmektedirler. Sulandırma sonrası motilite oranında en az düşüşün gözlemlendiği kriyoprotektan ise EG olarak belirtilmektedir. (Fabbrocini ve ark., 2000). DMSO'nun toksik etkisinin balık türlerine bağlı olarak değiştiği belirtilmektedir. Yapılan bir çalışmada, *Centropristis striata* türü için en uygun oranın % 10 DMSO olduğu belirtilmiştir (DeGraaf ve ark., 2004).

Liu ve ark (2006), çipura ile aynı aileye ait mercan balığı spermasının dondurulmasına kullanılan kriyoprotektanların optimum düzeylerini saptamak amacıyla araştırma yapmışlar ve her bir kriyoprotektan için 5 farklı oran (%6, %9, %12, %15) kullanılacak şekilde dondurulmuştur. Sonuçta en iyi çözüm sonu motilite % 88,6 ile %15 DMSO kullanılan denemede görülmüştür. DMSO'yu sırasıyla % 84,8 motilite ile %12'lik PG , % 84,5 motilite ile % 9'luk EG, % 69,1 ile DMA ve son olarak % 64,4 motilite ile % 12 gliserol izlemiştir.

Kriyoprotektanların etkinliğinin araştırılmasında, dondurmadan sonra oluşan plasma membranı üzerindeki hasarın değerlendirmek için, hypoosmotik ve hiperosmotik solusyonlar kullanılmaktadır. Spermatozoonları viabilitesini akım sitometrisi kullanılarak ve floresan mikroskopta ikili boyama yöntemi ile belirlenmektedir (Cabrita ve ark., 2005a,b).

#### **1.7.1.6.3. Dondurma Yöntemleri ve Dondurma Sıcaklıkları**

Spermanın dondurulması sırasında genellikle iki yöntem kullanılmaktadır. 1 - Spermanın sıvı nitrojen buharı (LN<sub>2</sub>) ile dondurulması 2 – kuru buz (CO<sub>2</sub>) ile dondurulması. Azot buharı ile dondurmada soğutma oranı azotun bulunduğu kaba bağlı olarak sıvı seviyesine olan uzaklığa bağlıdır. Kuru buz ile dondurmada ise sıcaklık düşüşü yaklaşık olarak dakikada 35 °C olarak hesaplanmaktadır (Fauvel ve ark., 1999; Suquet ve ark, 2000).

Dondurulmak üzere alınan sperma, payetlere (0,25 - 0,5 ml), dondurma tüplerine (1,5 - 2 ml) veya makro tüplere (5 ml) alınabilir. Azot buharı ile dondurmada soğutma oranı azotun konduğu kaba bağlı olarak azot seviyesine olan uzaklığa bağlıdır ve kullanılan hacime göre dondurma süresi ve sıcaklığı değişmektedir. Payetler (0,25 – 0,5 ml) sıvı nitrojen buharında, nitrojen seviyesinin 6,5 cm üzerinde 15 dakikada dondurulur. Daha sonra sıvı azota içinde depolanır (Fauvel ve ark., 1999; Suquet ve ark., 2000).

Spermanın dondurulmasında kullanılan diğer bir yöntem ise; yine azot gazına bağlanan programlanabilir dondurma makineleri ile uygulanmaktadır. Bu makineler payetleri istenilen sıcaklığa (istenilen soğutma oranları ile) düşürülmesinde kullanılmaktadır. Çipura spermasını dondurma esnasında soğutma oranları ile ilgili yapılan bir çalışmada 1 °C'den 100 °C'e kadar 6 grup arasından, sıcaklığın dakikada 10 °C düşürülmesinin en iyi sonucu verdiği saptanmıştır (Billard, 1978; Chen ve ark., 2004). Fabbrocini ve ark. (2000) da soğutma oranları ile ilgili olarak 10 °C/dk'lık soğutma oranının 15 °C/dk'den daha başarılı olduğunu bildirmişlerdir.

Özellikle tatlı su balıklarında pelet yöntemi ile dondurulması sıkça kullanılmaktadır. Bu yöntemde sulandırılan sperma kuru buz üzerinde – 79 °C de pelet biçiminde dondurulur. Optimum pelet büyüklüğü 0,1 ml olduğu ve sulandırma – dondurma arasındaki sürenin 2 dk'ı geçmemesi gerektiği belirtilmektedir. Dondurulan peletler direkt nitrojen içine transfer edilmekte ve saklanmaktadır (Akçay ve ark. 1995; Holtz, 1993).

Levrekte, Barbato ve ark. (1996), 10 °C/dk soğutma oranı kullanmalarına rağmen Fauvel ve ark. (1998) 65 °C/dk soğutma oranının daha başarılı olduğunu belirtmektedirler. Kalkan balığında ise 99 °C/dk soğutma oranı daha başarılı bulunmuştur (Dreanno ve ark., 1997).

#### 1.7.1.6.4. Spermanın Çözdürülmesi

Çözdürme aşamasının hızlı geçilmesi kristalizasyonu önlemek için gereklidir. Çözdürme sıcaklıkları levrek spermasında 35 °C/dk çipurada spermasında 26 °C/dk olarak uygulama alanı bulmuştur (Suquet ve ark., 2000; Fauvel ve ark., 1998; Barbato ve ark., 1996). Mercan türünde (2ml'lik dondurma tüpleri) ise en iyi çözdürme sıcaklığının 40 °C/dk olduğu belirtilmiştir (Liu ve ark., 2006).

| Tür    | Çözdürme sıcaklığı (°C/dk) |
|--------|----------------------------|
| Çipura | 26 (Barbato ve ark., 1996) |
| Levrek | 35 (Fauvel ve ark., 1998)  |
| Kalkan | 30 (Dreanno ve ark., 1997) |
| Kod    | 38 (Mounib, 1978)          |

Çizelge 1.2. Bazı balık türlerinde çözdürme sıcaklıkları

#### 1.7.2. Dişilerde Reprodiktif Fizyoloji

##### 1.7.2.1. Pubertas

Üreme yönünden, protandurus (ilkin erkek olma hali) hermafrodit olan çipuralar 2 yaşından sonra populasyonun %80'i dişi özelliği göstermektedir. Çipuralarda 1 yaş üremenin ilk sezonudur ve bu dönemde populasyonun tüm bireyleri erkek özellik gösterir. 3 yaşındaki çipuların bazıları intersex özelliği gösterebilmektedir (Alpbaz, 2005; Zohar ve ark., 1995).

### 1.7.2.2. Oogenesis ve Yumurtlama

Çipuralarda yumurtalık içindeki yumurta hücresinin gelişimi 7 aşamada meydana gelmektedir.

- 1- İlk yumurta hücreleri çok küçük olup boyutları 8 – 12 mikron arasındadır. Hücreler mitoz bölünme ile çoğalır.
- 2- Yumurta hücresinin etrafında folikül (yumurta hücrelerin beslenmesini sağlayan ve hormonların sentezlendiği yer) oluşmuştur. Bu, hücrenin ikinci katını oluşturur.
- 3- Hücrelerin boyutları 40 - 200 mikron büyüklüğe ulaşır. Etrafı folikül ile tamamen çevrilidir.
- 4- Vitellogenesis başlamıştır. Yumurta çapı 200 - 350 mikron arasındadır. Yağların sitoplazma içinde birikimi başlamıştır.
- 5- Sitoplazma yağ damlacıklarla doludur. Vitellogenesis hızlanmıştır. Yumurta büyüklüğü 300 - 350 mikron arasındadır.
- 6- Yumurta sarısı tabakası, yağ damlasını ikinci halkanın oluşmaya başladığı yer olan hücre kenarına doğru iter. Çekirdek içi maddeler protein sentezinde ve besin maddesi birikimde rol oynayan çekirdek içi maddelerin çekirdek zarına yapıştığı görülür. Yumurta çapı 600 mikrondur.
- 7- Vitellogenesis tamamlanmıştır. Yumurta çapı 700 - 800 mikron arasındadır. Çekirdek içi maddeler merkeze doğru çekilmeye başlamıştır. Mikropil deliği bu dönemde oluşmuştur. Yumurta değişme uğrakmaksızın birkaç hafta bu durumda kalır.

Uygun şartlar sağlandığında folikül tekasındaki kasların kontraksiyonu ile ovulasyon meydana gelir. Eğer biyotik ve abiyotik şartlar uygun hale gelmezse yumurtalar geri emilir. Yumurtlama sezonu süresince oositlerin bir kısmı vitellogenesis safhasına başlarken diğer bir kısmı vitellogenesisin son safhasını geçirir. 3 - 4 aylık yumurtlama periyodu boyunca vücut ağırlığının 0,5 - 2 katı yumurta bırakırlar (Alpbaz, 2005; Saka ve Fırat, 2006).

İşletmelerde yumurta temini için kullanılan rutin yöntem damızlık tanklarına bağlı kollektör sistemidir. Tekli yada çiftli olabilen bu sistem ile yüzeydeki yumurtaların toplanmasını sağlar. Kollektör sistemi ile teymin edilen yumurtalar kuluçka sistemine (inkübatör tanklarına) yerleştirilmelidir. Sıcaklık farkı  $\pm 0,5$  °C'i geçmemelidir. Yumurta çatlatma sıcaklığı 16 - 18 °C arasında olmalıdır. Kuluçka sisteminde doğal deniz suyu tuzluluğu kullanılmalıdır (Alpbaz, 2005).

### **1.7.2.3. Yumurta ve Yumurta Özellikleri**

Balık (Teleost Balıklar) yumurtaları koriyon olarak bilinen ince glikoprotein örtü ile kaplıdır. Yeni yumurtlanmış çipura yumurtaları ortalama 0,9 – 1 mm çapında ve saydamdır. Normalde tek bir yağ damlası içerir. Pelajik yani suda yüzen bir yapıya sahiptir. Yumurta zarı şeffaf ve ince olup mikropil deliği yaklaşık 14 mikrondur (Alpbaz, 2005; Andoh ve ark., 2008). Çipura yumurtaları olgunlaşmalarını tamamlamasının ardından suya bırakılması ve hidrolize oldukları zaman yumurta çapı 1100µ kadar olabilmektedir (Modig ve ark., 2008).

Cansız yada döllenmemiş yumurtalar birkaç saat içinde opak renge dönüşür ve tankın (veya inkübatörün) dibine çöker. Yumurtaların pelajik yapısından dolayı sadece suda yüzen yumurtaların yaşayabilir ve embriyo oluşturabilir olduğu belirtilmiştir (Alpbaz, 2005). Buna bağlı olarak yumurtaların döllenip döllenmediği veya canlı olup olmadığı Barbaro ve ark (1991) belirttiği yöntemle yapılmaktadır: 1- Yüzeyde kalan ve bölünen yumurtalar canlı yumurta olarak 2- Dibe çöken yumurtalar (döllenmiş buruşuk ve katinden önce bırakılan) bozuk yumurta olarak değerlendirilir.

#### 1.7.2.4. Yumurtalamada Hormon Kullanımı

Balıklarda üremenin kontrolü için hormon uygulamaları yaklaşık 60 yıldır kullanılmaktadır (Rottmann ve ark., 1991). Yumurtlamada kullanılan hormonlar 3 grupta toplanabilir:

1. Hipofiz ekstraktları,
2. Ovaryum ve testisleri uyarmak için pürifiye gonadotropinler,
3. Hipofizi stimüle etmek için GnRHa (LHRHa) ve bazı balık türlerinde sperma üretimini düzenlemek için kullanılan steroidlerdir (Anonymous, 1997).

Balığın kondüsyonu ve stress durumu, cinsel olgunluk safhası, balığın büyüklüğü ve beslenmesi, önceki dönemlerde ne zaman yumurta alındığı, su sıcaklığı ve mevsim gibi faktörler hormon kullanımının başarısını etkiler (Anonymous, 1997; Rottman ve ark., 1991). Çipuralardan hormonla yumurta alımında ilk kez gonadotropik etkisi olan Human Chorionic Gonadotropin (HCG) kullanılmıştır (Zohar ve Gordin, 1979).



Şekil 1.5. Çipurada hormanal enjeksiyon (Alpbaz, 2005)

Çipuraların aralıklı yumurtlama göstererek bir çok kez yumurta bırakması, yumurtaların sağım esnasında zedelenmesi ve sağım sırasında pulların dökülmesine bağlı meydana gelen enfeksiyonlardan dolayı çipura yetiştiriciliğinde (rutinde) sağım pek tercih edilmez (Atay ve Bekcan, 2000). Levreklerde ise sağım yöntemi ile

yumurta alımı yapılan çalışmalar mevcuttur (Fırat ve Saka, 2006). Buna rağmen sağım yöntemi yumurtaların küçük olmasından ve döllenme oranının düşüklüğünden dolayı fazla uygulama alanı bulamamıştır.

HCG ile uyarılan anaçlarda kuvvetli bir bağışıklık sistemi oluşur. Hipofizden gonadotropin (GtH) salgılanmasındaki başarısızlıktan dolayı daha önceden kullanılan anaçlarda yumurtlama ve yumurtaların oluşumu sırasında sorunlar oluştuğunu saptanmıştır. HCG enjekte edilen anaçlarda hipotalamus-hipofiz eksenindeki eksilme sonucunda, anaçlarının yumurtalarını oluşturmada azalma görülür. Bunun sebebi hipofizde gonadotropin seviyesinin artmasına rağmen dolaşım sistemine salgılanmamasıdır (Fırat ve Saka, 2006; Zohar ve ark, 1990).

HCG hormonu kullanımında oluşan sorunlar araştırmacıları yeni arayışlara itmiş ve GnRH veya GnRH analoglarının kullanılabileceği orataya konulmuştur. GnRH ve GnRHa'nın çeşitli türlerin plazmalarındaki gonadotropin (GtH) düzeyini yükselttiği ve HCG hormonuna göre daha avantajlı olduğu saptanmıştır. Bu hormonların HCG hormonuna göre avantajları ise; GnRH (LHRH) balığın kendi GtH üretimini sağlar. Küçük moleküldür ve GnRH kolayca sentezlenebilir ve saf olarak temin edilebilir. Yumurtlama sırasında kullanılan miktar azdır. GnRH türlere göre düşük miktarda kullanılabilir. Küçük polipeptidlidir ve bağışıklık gelişmez (Barbaro ve ark., 1997; Zohar ve ark, 1990).

Yapılan bilimsel çalışmalar sonucunda yumurtlamayı uyarmak için en etkin yolun GnRHa'nın sürekli salınımı sağlamak olduğu açıktır ve günümüzde ticari olarak uygulanmaya başlanmıştır. Uzun salınımlı LHRHa sistemleri, implantlar (3 mm çapında), mikroküreler (50 - 150 µm çapında) şeklinde intramuskuler veya intraperitoneal olarak uygulanmaktadır. GnRHa'nın etkin dozları kullanılan uygulama yoluna göre 25 - 100 µg/kg arasında değişmektedir. Yumurtlama, hormon uygulamasından 48 - 72 saat sonra başlar (Zohar ve ark., 1995).

### 1.7.3. Fertilizasyon ve Fertilizasyon Teknikleri

Dış dölleme görülen balıkların doğal döllemede, dişi yumurtlamak için yer ararken, erkek dişiye devamlı yumurtlamaya zorlamaktadır. Dişi yumurtalarını bıraktıktan sonra erkekte spermasını yumurtaların üzerine bırakır ve dölleme gerçekleştirilir (Woynarovich ve Horvath, 1980). Yeni yumurtlanmış yumurta hızla su alarak şişer, spermatozoonun yumurtadaki mikropili hızlıca bulması ve mikropil deliğini kullanarak yumurtaya girmesi için en fazla 2 dakika süresi vardır (Kime ve ark., 2001).

Yeni sağılmış yumurtada bulunan mikropil içeriye doğru kıvrılan küçük bir huniye benzer. Gözeneklerden giren su perivitellin sıvı ile birleştikten sonra, dış kabukla yumurta sarısı zarı arasındaki boşluğu doldururken, mikropil bir tarafa doğru yatmaya başlar. Perivitellin boşluğunun dolma işlemi mikropil iyice kapanıncaya kadar devam eder. Mikropil açıklığı ne kadar küçük olursa yumurta döllemesi de o kadar zor olmaktadır. Yumurta ve sperma ancak belli bir süre dölleme güçlerini muhafaza edeceklerinden sağım zamanının iyi ayarlanması gerekir (Atay, 1980).

Yanagimachi ve Kanoh (1953) ringa balığı spermatozoonlarının deniz suyunda motilitesinin zayıf olduğunu, mikropil bölgesindeki koryon zararına temas ettiğinde aktivenin arttığını ve birer birer mikropilden girdiklerini bunun da  $Ca^{2+}$  iyonuna bağlı olan kemotaksisin etkili olduğunu bildirmişlerdir. Suziki (1958) bazı balık türlerinde spermatozoonların mikropil bölgesinde toplandığını ve aktive olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmalarda spermatozoonun yumurtaya girmesinin rastgele olmadığı vurgulanmaktadır (Andoh ve ark., 2008).

Mikropilden birden fazla spermatozoon girsede sadece bir tanesi yumurtanın plazma membranına girebilmektedir. Mikropilin çıkış noktası, türe özel spermatozoonun kafa çapında olduğu bildirilmiştir. Mikropilden giren diğer spermatozoonlar kortikal granüllerin etkisiyle atılmaktadır (Andoh ve ark., 2008).

Polzonetti ve ark., (2002) ipura yumurtlarının fertilizasyonu üzerine yaptığı çalışmada sadece yüzen yumurtaların gelişebilir ve embriyo oluşturabildiğı olduğunu ve cADPR'ın fertilizasyonla ilgili olduğunu belirtmişlerdir. Spermatozoonun yumurtaya girmesinden sonra artmaya başlayan cADPR, yumurta homojenatı içerisinde  $Ca^{2+}$  iyonlarının serbest bırakılmasını indüklemektedir. Fertilize olmuş yumurtalarda  $NAD^+$  ve onun metaboliti olan cADPR yanı sıra ADPR, ATP, ADP Adenozin ve Adenin miktarların önemli ölçüde arttığı saptamışlardır (Polzonetti ve ark, 2002)

Fertilizasyon tekniği olarak iki farklı yöntem uygulanmaktadır. En çok tercih edileni kuru yöntem olmakla birlikte diğer yöntem ise ıslak veya yaş yöntemdir.

#### **1.7.3.1. Kuru Yöntem**

Bu metot ile yumurtaların hemen hepsinin döllenmesi mümkün olmaktadır. Bu yöntemde balığın vücudu balığın bir bezle silindikten sonra yumurtalar kuru bir kap içine sağılır. Yumurtaların zerine vücudu silinmiş olan erkek veya erkeklerin sperması sağılır. Daha sonra yumurta ve sperma bir telek yada tüy yardımıyla iyice karıştırılır ve üzerlerine spermatoozonları aktive edici fertilizasyon solusyonu (deniz balıkları için deniz suyu) eklenir. Birkaç dakika yumurtaların döllenmesi beklenir ve inkübasyona alınır (elikkale, 1994).

#### **1.7.3.2. Islak veya Yaş Yöntem**

Islak yöntemde içerisinde su bulunan bir kaba yumurta ve sperma sağılması suretiyle yapılmaktadır. Bu yöntemde su ile temas eden yumurtaların su alıp şişmeye hemen başlaması ve mikropil deliğinin kapanması dolayısıyla döllenme oranı kuru yönteme oranla önemli derecede düşük çıkabilmektedir (elikkale, 1994).

#### 1.7.4. Yumurta ve Sperma Alımında Anestezi

Damızlık erkek ve dişi balıklarda sağım esnasında zarar vermemek, kanama, ezilme ve hatta ölümleri önlemek; ayrıca anesteziyle kas gevşemesi sonucu yumurta alımını kolaylaştırmak için balıklar anesteziye alınır. Bu amaçla anestezi ile iş gücünden de tasarruf edilmektedir. Anestezik dozun yüksek olmamasına dikkat edilmelidir çünkü yüksek doz spermatozoanın hareket kabiliyetini olumsuz etkilemektedir (Emre ve Kürüm, 1997).

MS 222 çok yaygın olarak kullanılan bir anesteziktir ve suda iyi çözünür. Bilimsel çalışmalarda genellikle 100 – 120 mg/l olarak kullanılmaktadır, alabalık için 100 mg/l, çipura için 120 mg/l olarak uygulanmaktadır (Cabrita ve ark., 2005a,b). Fenoksi etanol da MS 222 gibi yaygın bir kullanıma sahiptir. Fenoksi etanolün dozajı, MS 222’de olduğu gibi 100 – 120 mg/l olarak uygulanmaktadır (Zilli ve ark., 2005; Fauvel ve ark. 1998).

Bonzacain, Quinaldine, Chorbutanol ve karanfil yağının da anestezik madde olarak kullanılabileceği bildirmiştir (Emre ve Kürüm, 1997; Akçay ve ark., 1995).

#### 1.7.5 Kuluçka ve Prelarva

Kollektörlerden toplanan yumurtalar inkübatörlere ortalama 1500 - 2500 adet/lt olacak şekilde konulur. İnkübasyon süresince ışık kullanılmaz. İnkübatörlerde su sıcaklığı 16 - 18 °C olmalı ve ‰ 35 - 38 tuzluluk oranı olan ortamlarda inkübe edilmelidir. Kollektörlerden alınan yumurtalar alındıkları ortamla aynı sıcaklıktaki inkübatörlere aktarılması gerekmektedir. İnkübatörlerin bulunduğu tanklarda saatte % 40-60 su değişimi uygulanmalıdır. İnkübatör sıcaklığı optimum düzeyden uzaklaştıkça açılım yüzdesi azalır ve anomali oranı artar (Alpbaz, 2005). Çipurada levrekte olduğu gibi 425-530 µ göz açıklığına sahip inkübatörler kullanılmaktadır (Çoban ve ark., 2004).

Çipura prelarvaları, yumurtadan çıktıklarında yaklaşık 2,6 - 2,8 mm boydadırlar. Vitellüs kesesi çapları ise 0,9 - 1 mm'dir. Ağız ve anüs kapalıdır. Baş vücuda oranla küçük, gözler büyük ve pigmentsizdir. Çipura yumurtalarının 18 °C'deki embriyolojik gelişimleri Çizelge 1.7.5'de verilmiştir (Saka ve Fırat, 2006).

Çizelge 1.3. Çipura yumurtalarının embriyolojik gelişimi (Saka ve Fırat, 2006)

| <b>Embriyolojik Safhalar</b>  | <b>Oluşum Süresi (Saat)</b> |
|-------------------------------|-----------------------------|
| 2'li Blastomer Safhası        | 0.45 s                      |
| 8'li Blastomer                | 1.45 s                      |
| Morula Safhası                | 3.15 s                      |
| Gastrulasyon Safhası          | 10.00 s                     |
| Gastrulasyon ½                | 11.00 s                     |
| Gastrulasyon ¾                | 14.00 s                     |
| Embriyo ½                     | 25.00 s                     |
| Somit Oluşumu                 | 26.30 s                     |
| Kupfer Cisimciğinin Görülmesi | 28.00 s                     |
| Kalp oluşumu                  | 30.00 s                     |
| Pigmentasyon Başlangıcı       | 32.00 s                     |
| Embriyo ¾                     | 43.00 s                     |
| Yüzgeç oluşumu                | 43.20 s                     |
| Yıldızsı Kromotoforlar        | 45.00 s                     |
| Kalp Atışı                    | 46.00 s                     |
| Açılım                        | 60.00 s                     |

Çipura prelarvaları yoğun üretim koşullarında 80 - 100 adet/lit olacak şekilde hacimleri 2 m<sup>3</sup>'ten 15 m<sup>3</sup>'e kadar olan tanklara yerleştirilir. Oksijen değeri 5-6 mg/lit dir. Su girişi alttan, çıkışı ise üsttendir. 16 - 18 °C su sıcaklığında çipuralarda prelarval dönem 3. günde sona erer ve postlarval dönem başlar (Saka ve Fırat, 2006). Çipura larva yetiştiriciliği çalışmalarında kullanılan su sıcaklık aralığı 18 - 22 °C arasında değişim göstermiştir. Su sıcaklığı ilk 15 günlük dönem içerisinde 18 - 20 °C arasındadır (Alpbaz, 2005).



Şekil 1.6. Kapalı kuluçka sistemi (Alpbaz, 2005)

Bu araştırmada, büyük ekonomik öneme sahip ve yetiştiriciliği yapılan çipura balığının bazı spermatolojik özelliklerinin saptanması, spermasının dondurulması ve dondurulmuş spermanın suni tohumlamadaki başarısını ortaya koymak amacıyla yapılmıştır. Spermanın dondurulması aşamasında, deniz balıklarında yaygın olarak kullanılan 4 farklı sulandırıcı (Mounib, Tuzlu Mounib, Ringer, % 1 NaCl), 3 farklı kriyoprotektan (DMSO, EG, DMA) ve 2 farklı çözündürme işleminin (26 °C’de 20sn, 35 °C 15sn) motilite üzerine etkisi ortaya koymak ve bu dondurulmuş spermanın dölverimi yeteneği ile suni tohumlamadaki başarısı değerlendirilmiştir.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Araştırmanın Yapıldığı Yer

Araştırma, Kılıç Deniz Ürünleri Üretimi İhracat ve İthalat A.Ş.'nin Dalyan mevkiî Akyeniköy'deki Bafa Yavru Üretim Merkez'ine ait damızlık tesislerinde gerçekleştirilmiştir.

### 2.2. Çalışma Materyali Seçimi

Çalışmada kullanılan materyal, işletmede larva üretimi için kullanılan damızlık nitelikli çipuralardan sağlanmıştır. Çalışmada, toplam 100 dişi, 150 erkek damızlık çipura arasından rastgele seçilen 10 erkek, 4 dişi çipura kullanılmıştır. Rastgele seçilen erkekler 800 – 1280 g, dişiler 1100 – 2300 g arası olarak tartılmıştır.

### 2.3. Çipura Damızlık Tanklarının Özellikleri ve Çevre Koşulları

Damızlık erkek ve dişi çipuralar 2 : 3 (dişi/erkek) oranında 23 ton kapasiteli yuvarlak pvc tanklarda yetiştirilmektedir. Üreme mevsiminde tankın su sıcaklığı  $18 \pm 0,5$  °C olarak ayarlanmıştır. Sıcaklık değişimlerinin minimum düzeyde tutulması için günde 2 kere sıcaklığı kontrol edilmiştir. Tankdaki suyun tuzluluk oranı ‰ 36, pH'sı 7,5 – 8,0, çözünmüş oksijen ise 7 – 10 mg/l olarak kaydedilmiştir.

Çalışma, coğrafi açıdan çipuranın üreme sezonun ortalarına denk gelen Ocak ayı içerisinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada doğal koşullara uygun olarak 18 saat aydınlık, 6 saat karanlık uygulanmıştır. Aydınlatma için floresans lambalar

kullanılmıştır. Çalışma sırasında dış ortam sıcaklığı ise  $15 \pm 3$  °C olarak kaydedilmiştir.



Şekil 2.1. Damızlık tankları.

#### 2.4. Damızlıkların Beslenmesi

Üreme sezonu boyunca damızlıkların beslenmesinde temel olarak yaş yem kullanılmıştır. Yaş yem olarak mürekkep balığı (sübye) ve kalamar gibi yumuşakcalar kullanılmıştır. Yaş yem yanında ticari kesif yemler kullanılmıştır.



Şekil 2.2. Damızlıkların beslenmesinde kullanılan dondurulmuş mürekkep balığı (yaş yem)

## 2.5. Sperma ve Yumurta Alınması

Sperma alınmadan önce balığın hızlıca anesteziye girmesi ve kolay yakalanması için tankın su hacmi azaltılmıştır. Anestezik madde olarak fenoksietanol kullanılmıştır. Balıkların anesteziye verdiği tepkiye gözleyerek, yavaşca anesteziye alınmıştır. Balıklar yarı anestezik durumda 100 litrelik küçük tanklara alınıp, son titresi 100-120 mg/l 2-fenoksietanol olacak şekilde tam anestezi duruma getirilmiştir.

Anesteziye alınan çipura erkekleri bir havlu yardımı ile tutulup, genital bölgesi kağıt havlu ile kurulanmıştır. Genital bölgesi temizlenen çipuralar başı yukarda olacak şekilde tutulup önce bağırsaklar ve üreterleri dolu olup olmadığı öğrenmek için alt kısmına çok hafif bir basınç yapılmıştır. Varsa dışkı ve üre dışarı alınıp, genital bölge tekrar temizlenmiştir.

Genital bölgesi temizlenen çipura, üst abdominal bölgeye yapılan hafif bir basınçla (cranio-caudal) sperma toplama kadehi içine alınmıştır. Sperma toplamak için 15 ml'lik dereceli plastik tüpler kullanılmıştır.

Dişi çipuralardan yumurta almak için de sperma alımında belirtilen koşullara uyulmuştur. Dişilerden sağılan yumurtalar ise 50 ml'lik plastik kaplara alınmıştır.

Spermanın renginde veya viskosesinde bir değişiklik fark edildiği zaman dışkı ve üre karışmış olabileceği şüphesi ile bu spermalar çalışmada kullanılmamıştır. Alınan spermalar numaralandırılarak soğuk termos (0 – 4 °C) içerisinde ışıksız bir ortamda laboratuvara nakledilmiştir.



Şekil 2.3. Küçük tanklarda tam anesteziye alınan damızlık çipuralar.



Şekil 2.4. Spermanın abdominal masajla alınması.

## 2.6. Spermatolojik Muayeneler

Sperma alındıktan sonra makroskobik, mikroskobik ve kimyasal muayeneleri yapılarak başlıca spermatolojik özellikleri belirlenmiştir.



Şekil 2.5. Spermatolojik muayenelerin yapıldığı yer.

### 2.6.1. Makroskobik Muayene

Spermanın makroskobik muayenesinde renk gözlem yoluyla, sperma miktarı ise dereceli sperma alma tüplerinden okunarak ml olarak belirlenmiştir.



Şekil 2.6. Çipura Sperması.

#### **2.6.1.1. Sperma Rengi**

Plastik tüplere alınan sperma, nispeten loş bir ortamda florenans ışık altında insepeksiyon yöntemi ile hemospermi ve pyospermi yönünden değerlendirilmiştir.

#### **2.6.1.2. Sperma Miktarı**

Toplanan sperma dereceli plastik tüplere alınarak tüp üzerindeki skaladan mililitre (ml) cinsinden miktarı ölçülmüştür.

#### **2.6.2. Spermanın Mikroskopik Muayenesi**

Spermanın mikroskopik muayenesinde; taze spermatozoa motilitesi ve dondurma sonrası spermatozoa motilitesi ile spermatozoa yoğunluğu tespit edilmiştir.

##### **2.6.2.1. Spermatozoa Motilitesi**

İleri yönde ve aktif hareket eden spermatozonların, hareketsiz ve diğer hareket biçimi gösteren spermatozoonlara oranı olarak ifade edilen spermatozoa motilitesi taze ve dondurma sonrası olarak 2 aşamada tespit edilmiştir. Motilite tayini ısıtma tablası kullanılmadan oda sıcaklığı olan  $15 \pm 3$  °C’de yapılmıştır. Motilite tayini için lam üzerine küçük bir damla sperma alınıp üzerine 1:10 oranında aktivasyon solusyonu (30g/l NaCl, 0,8 g/l KCl, 1,3 g/l CaCl<sub>2</sub>, 6,6 G/l MgSO<sub>4</sub>, 0,18 g/l NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,2, osmolarite 987 mOsmol/kg) eklenerek hızlıca karıştırılıp lamel kaparatak yapılmıştır. Aktivasyon solusyonu ile temastan itibaren 4-8 sn içinde lamel kapatılıp, 400x büyütmede motilitesi tespit edilmiştir. Motilite değerlendirmesi en az 3 kişi

tarafından 5 farklı mikroskop sahası incelenerek subjektif olarak yapılmış ve % olarak not edilmiştir.

#### 2.6.2.2. Spermatozoa Yoğunluğu

Birim hacimde bulunan spermatozoon sayısı olarak ifade edilen spermatozoa yoğunluğu, hemositometrik yöntem ile belirlenmiş ve spermatozoon/ml olarak ifade edilmiştir. Bu yöntemde, spermatozoonları tesbit eden ve mikroskop sahasında dengeli dağılımlarını sağlayan, aşağıda bileşimi verilen Hayem solüsyonu kullanılmıştır (Tekin, 1994).

Hayem Solusyonu (eriyiği);

Sodyum Sülfat 5,0 gr

Sodyum Klorür 1,0 gr

Civa Klorür 0,5 gr

Distile Su 200,0 ml

Thoma lamında sayım yapıldıktan sonra yoğunluk hesaplanması aşağıda verilen formüle göre yapıldı. Nativ spermadan alınan numuneler sulandırılması için 10 ml Hayem solüsyonu içeren tüplerden 10 µl solüsyon otomatik pipetle atılarak, 10 µl sperma numunesi konularak sperma numuneleri 1/1000 oranında sulandırıldı. Daha sonra Thoma lamında sayıldı ve  $\times 10^9$  spz/ml olarak kayıt edildi.

$$\text{Yoğunluk (10}^9\text{/ml)} = \frac{\text{Sayılan Hücre Sayısı (n)}}{\frac{\text{Sayılan Büyük Kare}}{\text{Büyük Kare}} \times \frac{\text{Büyük Kare Hacmi}}{\text{Sulandırma Oranı}}}$$

Sayılan Büyük Kare (10)      X      Büyük Kare Hacmi (1/250 µl)      X      Sulandırma Oranı (1/1000)

### 2.6.3. Spermanın Kimyasal Muayenesi

Spermanın kimyasal muayenesinde sadece pH değeri saptanmıştır.

#### 2.6.3.1. Spermanın pH Değeri

Spermanın pH'sını belirlemek için pH indikatör kağıtları kullanılmıştır. pH değeri sadece taze spermada saptanmıştır. Bu amaçla, bir damla sperma indikatör kağıdı üzerine damlatıldıktan sonra, kağıt üzerindeki renk değişimine bakılarak, skalaya göre okuma yapılmıştır.

### 2.7. Spermanın Dondurulması

Uygun sulandırıcı ve kriyoprotektan ile sulandırılan sperma 0,25 ml'lik payetlere çekilerek, payetlerin açık ucu *Polivinil Alkol* ile kapatılıp hemen suya (12 - 13 °C de) aktarılmıştır. Payetler *Polivinil Alkol*'ün sertleşmesi için 1 - 2 dk suda bekletilmiştir. Payetler alışım safhası uygulanmadan dondurulmak üzere hemen strafora aktarılmışlardır. Strafor üzerindeki raflara dizilen payetler azot seviyesinin 4 – 6 cm üzerinde 10 dk'da dondurma işlemi gerçekleştirilmiştir. Dondurma işlemi biter bitmez sıvı azot (-196 °C) içerisine daldırılmıştır ve sıvı azot içinde depolanmıştır.



Şekil 2.7. Sıvı azot buharında dondurulan payetler

### 2.7.1. Deney 1 (Sulandırıcı Seçimi)

Alınan sperma soğuk termos içerisinde 20 dk içerisinde labaratuvara nakledilmiştir. 10 farklı ejakulat ayrı ayrı spermatolojik muayeneleri yapıldıktan sonra (yoğunluk tesbiti vakit kaybetmemek için dondurma sonrası yapılmıştır) 50 ml'lik plastik tüpde birleştirilmiştir. Birleştirilen (pooling) sperma split örnekler halinde dondurulmak üzere 4 farklı sulandırıcı ile 1 : 3 oranında sulandırılmıştır. Tüm sulandırıcılara % 10 DMSO katılıp alıştırma aşaması uygulanmadan 3 – 5 dk içinde dondurma işlemi başlatılmıştır. Dondurmak için 0,25 ml'lik payetlerde çekilen sulandırılmış sperma, azot seviyesinin 4 – 6 cm üzerinde 10 dk tutulup azota bırakılmıştır.

Sulandırıcı I: Mounib Mediyumu;

10 mg/ml  $\text{KHCO}_3$

2 mg/ml azaltılmış glutatyon

42,7 mg/ml sukroz

10 mg/ml BSA

Sulandırıcı II : Tuzlu Mounib Mediyumu;

10 mg/ml  $\text{KHCO}_3$

19,4 mg/ml NaCl

6,2 mg/ml  $\text{NaHCO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

2,2 mg/ml glisin

Sulandırıcı III: Ringer Solusyonu;

6,5 mg/ml NaCl

0,40 mg/ml KCl

0,12 mg/ml CaCl<sub>2</sub>

0,2 mg/ml NaHCO<sub>3</sub>.2H<sub>2</sub>O

2 mg/ml glukoz

Sulandırıcı IV; %1'lik Deniz Suyu;

%1 NaCl (10mg/ml)

Sulandırma sırasında, alınan sperma ile sulandırıcıların birbirlerine yakın sıcaklıkta (8 - 14 °C) olmasına dikkat edilmiştir. Çalışmada 4 farklı sulandırıcı arasında çözüm sonu en iyi motiliteyi veren sulandırıcı çalışmanın ana sulandırıcısı olarak seçilmiş ve bu sulandırıcı ile çalışmaya devam edilmiştir.



Şekil 2.8. Spermanın sulandırılması ve payetlere çekilmesi

### 2.7.2. Deney 2 (Kriyoprotektan Seçimi)

En iyi sulandırıcının seçiminden sonra bu sulandırıcıya 3 farklı kriyoprotektan katılıp bu kriyoprotektanlar arasında hangisinin daha iyi çözüm sonu motilite verdiğine bakılmıştır.

Kullanılan kriyoprotektanlar:

Kriyoprotektan I: %10 DMSO (Dimetil sulfoksit)

Kriyoprotektan II: %10 EG (Etilen glikol)

Kriyoprotektan III: %10 DMA (Dimetil asetamid)

Çözüm sonu en yüksek motiliteyi veren kriyoprotektan ile çalışmaya devam edilmiştir.

### **2.7.3. Deney 3 (Spermanın Çözdürülmesi)**

Çözdürme işlemi, su banyosunda 26 °C’de 20 sn ve 35 °C’de 15 sn olarak iki şekilde uygulanmıştır. En iyi sulandırıcı, en iyi kriyoprotektan kombinasyonu uygulanmış spermalar, 2 farklı sıcaklıkta çözdürülüp motiltesi tayin edilmiştir. En iyi çözüm sonu motilite veren çözdürme sıcaklığı ile fertilizasyon deneylerine gidilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla dondurulmuş sperma istenen sıcaklık ve sürede bir su banyosu içinde çözdürülmüş ve en yüksek çözüm sonu motiliteyi veren grup fertilizasyonda kullanılmıştır.

### **2.8. Suni Tohumlama ve Dölverimi**

Çalışmanın sonunda en iyi sulandırıcı, en iyi kriyoprotektan ve en iyi çözüm sonu sıcaklığı kombinasyonu sağlandıktan sonra bu sperma ile fertilizasyon deneyleri yapılmıştır.

Fertilizasyon için dişi çipuralardan yumurta sağılmasının hemen ardından fertilizasyon işlemi başlatılmıştır. 4 farklı dişiden alınan yumurtalar her grupta 5 gr (yaklaşık 5000 – 6000 adet) olacak şekilde ayarlanmıştır. Yumurtaların alınması sırasında inspeksiyonla şeffaf olmayan bozuk yumurtalar çalışmada kullanılmamıştır. Fertilizasyonda biri deney 3 tanesi kontrol olmak üzere 4 farklı grup oluşturulmuştur.

I. Grup  
Dondurulmuş sperma  
15 µl

II. Grup (kontrol)  
Sulandırılmış (inaktivasyon solusyon)  
Taze sperma 10 µl

III. Grup (kontrol)  
Taze Sperma 10 µl

IV. Grup (kontrol)  
Doğal Döllenmiş Yumurta

Aktivasyon solusyonu; 30g/l NaCl, 0,8 g/l KCl, 1,3 g/l CaCl<sub>2</sub>, 6,6 G/l MgSO<sub>4</sub>, 0,18 g/l NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,2

İnaktivasyon solusyonu (aktive etmeyen); 3,5 g/l NaCl, 0,11 g/l KCl, 0,30 g/l MgCl<sub>2</sub>, 1,68 g/l NaH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 10 g/l BSA, pH 7,5

Fertilizasyon için 50 ml'lik plastik kapların içine 5 gr (yaklaşık 5000 – 6000 adet) civarı yumurta alınıp üzerine sperma eklenmiştir. Yaklaşık 15 - 20 sn'lik hafif karıştırma hareketinin ardından spermaların aktive olması ve yumurtların su alıp şişmesi için aktivasyon solusyonu eklenmiştir. Aktivasyon solusyonun miktarı yumurtaların yaklaşık 3 katı olacak şekilde tüm gruplara 15 ml katılmıştır. Aktivasyon solusyonu plastik kapların kenarından yavaşca akıtılmıştır. Aktivasyon solusyonu balıkların tank sıcaklığı ve yumurta sıcaklığı ile aynı olması için 18 °C suda bekletilmiştir. Fertilizasyon sırasında ortam sıcaklığı 16,5 °C olarak ölçülmüştür. Aktivasyon solusyonu ile fertilizasyon başatılmasından 3 dk sonra işletmede hazırlan 500 mikron göz açıklığına sahip inkübatörlere aktarılmışlardır. Aktarma işlemi de olası sıcaklık ve osmotik şok olasılığını en aza indirmek için yavaş yavaş ve kademeli olarak yapılmıştır.



Şekil 2.9. Suni tohumlama ve spermatozoonların aktivasyonu

Yumurtaların maruz kalacağı dış etkileri en aza indirmek için fertilizasyonun tamamlanması ve tüm grupların inkübatörlere alınması toplam 20 - 30 dk sürmüştür. Kontrol gruplarında kullanılan spermalar % 90 ve üzeri motiliteye sahip, 3 farklı erkekten alınan spermaların karışımından elde edilmiştir. Fertilizasyonda spermatozoon, yumurta oranı ortalama değerler üzerinden saptanmış ve dondurulmuş sperma (15  $\mu$ l) ve taze sperma (10  $\mu$ l) yaklaşık olarak  $1 - 1,5 \times 10^4$  spermatozoa / yumurta olarak hesaplanmıştır. Fertilizasyon denemeleri 3 kez tekrarlanmıştır.

İnkübatörlere alınan her gruba oksijenasyon sağlamak ve yumurtaların birbirlerine yapışmalarını önlemek için hava borusu daldırılmıştır. İnkübatörün dibine daldırılan ağırlık eklenmiş hava borusu sayesinde yumurtalar inkübatör içerisinde sürekli yer değiştirmişlerdir. İnkübatörün su sıcaklığı elektronik termometre ile ölçülmüştür. Kuluçka süresi boyunca su sıcaklığı günde 2 kere  $17,9 \pm 0,4$  °C olarak ölçülmüştür. Kuluçka süresi boyunca inkübatörlere karanlık ortam sağlanmıştır.

Kuluçkaya alınan yumurtalar 24 saat sonra havaları içlerinden alınıp bozuk ve döllenmemiş yumurtaların çökmesi için 3 - 5 dk beklenmiştir. Yumurtalar çökdükten sonra inkübatörün bulunduğu ortamda karanlık ortamın devamı için ışık açılmadan el feneri kullanılmıştır. Çöken yumurtalar cam boru sistemi vasıtasıyla inkübörlerden

alınmışlardır. İnce uçlu cam boru sistemi dezenfektan ile dezenfekte edilip steril deniz suyu ile yıkanmıştır. Vakum etkisi ile toplanan yumurtalar sistemin diğer ucunda 500  $\mu$ 'luk ağda tutularak alınmıştır. Alınan yumurtalar gramın 100'de 1'i hassasiyetindeki elektronik terazi ile tartılmıştır. Tartılmadan önce yumurtaların içinde bulunduğu su çekilmiştir. 24. ve 48. saatte alınan yumurtalar grublara göre not edilip 70. saatteki kuluçkadan çıkan larva oranlarına ulaşılmıştır. 70. saattede dipte yumurta varlığı araştırılmıştır.



Şekil 2.10. Alınan yumurtaların birleştirilmesi ve inkübatörler. 4 farklı dişiden alınan yumurtaların birleştirilmesi ve elektronik terazi (a), 500  $\mu$  göz açıklığına sahip inkübatörler (b)

## 2.9. İstatistiksel Değerlendirme

Araştırmada elde edilen verilerin ortalama değeri ve standart hataları hesaplanmıştır. Sulandırıcılar, kriyoprotektanlar ve dölverimi arasındaki farkların ortaya konulmasında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testinden yararlanılmıştır. Farklılığın önemli olduğu grupların saptanması için Tukey testi ile yapılmıştır. Çözdürme sıcaklıklarını arasındaki farkı ortaya koymak için ise “student t” testinden faydalanılmıştır.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Spermatolojik Muayene Bulguları

Yapılan çalışmada, 10 adet çipura (*Sparus aurata*) erkeğinden sağılan ejakulatlarda başlıca spermatozolojik özelliklerden sperma miktarı, spermatozoa yoğunluğu, sperma pH'sı ve sperma rengi tespit edilmiştir.

##### 3.1.1. Spermanın Rengi

Alınan tüm ejakulatlarda, spermanın rengi bir çok balık türünde olduğu gibi beyaz – krem (süt beyaz) renge sahiptir. Herhangi bir hemospermi ve pyospermi bulgusuna rastlanmamıştır. (Çizelge 3.1.)

##### 3.1.2. Spermanın Miktarı

10 adet erkek çipura balığından alınan sperma miktarı en fazla 13 ml, en az 2 ml ve ortalama  $6,77 \pm 1,25$  ml olarak bulunmuştur. Alınan spermaların spermatozojik özellikleri Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

##### 3.1.3. Spermatozoa Motilitesi

Alınan 10 farklı ejakulatın motilite değerlerinin birbirlerine çok yakın olduğu gözlenmiştir. Nativ spermatozoa motilitesi en yüksek % 95, en düşük % 85, ortalama  $90,5 \pm 1,20$  olarak kaydedilmiştir. Muayeneler mikroskobun  $40 \times$  objektifinde en az 5 değişik bölge değerlendirilerek yapılmıştır. Yapılan ön

çalışmalarda ‰ 37'lik (Deniz suyu, NaCl) solusyon ile aktive edilen spermaların motilitesi önemli oranda düşük gözlenmiştir. Bu nedenle aktivasyon için aktivasyon solusyonu (‰ 30) kullanılmıştır. (Çizelge 3.1.)

Sperma aktive edilmesini takiben 10 sn içerisinde değerlendirmeye alınmıştır. Gözlendiğı andan 20. sn'e kadar motile oranı hızla artığı 20 - 30. sn'de maksimum motiliteye geldiğı ve kısa bir süre (yaklaşık 1 - 2dk) maksimum motiliteyi koruduğı ve daha sonra azalmaya başladığı gözlemlenmiştir.

#### 3.1.4. Spermatozoa Yoğunluğu

Alınan ejakulatlar arasında yoğunluk açısından büyük farklar olduğu gözlenmiştir buna göre en düşük yoğunluk ml'de  $11,6 \times 10^9$ , en yüksek  $32,2 \times 10^9$ , ortalama  $21,55 \pm 2,29 \times 10^9$  spermatozoon olarak kaydedilmiştir. (Çizelge 3.1.)

#### 3.1.5. Spermanın pH'sı

Alınan spermaların pH'ları birbirlerine çok yakın tespit edilmiştir. Çalışmada en düşük pH 7 en yüksek 7,5 ortalama  $7,3 \pm 0,05$  olarak bulunmuştur. (Çizelge 3.1.)

Çizelge 3.1. Çipura spermasının spermatolojik özellikleri (n=10)

| Balık No | Miktar (ml) | Motilite (%) | Yoğunluk ( $\times 10^9/\text{ml}$ ) | pH   | Renk       |
|----------|-------------|--------------|--------------------------------------|------|------------|
| 1        | 2           | 95           | 16,6                                 | 7,25 | Süt beyazı |
| 2        | 10          | 95           | 14,1                                 | 7,50 | "          |
| 3        | 9,2         | 85           | 17,8                                 | 7,25 | "          |

|            |                 |                 |                  |                |   |
|------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|---|
| 4          | 13              | 90              | 29,48            | 7,50           | " |
| 5          | 12              | 90              | 30,5             | 7,25           | " |
| 6          | 4,5             | 90              | 11,6             | 7,25           | " |
| 7          | 3,5             | 85              | 23,6             | 7,25           | " |
| 8          | 4               | 95              | 32,2             | 7,25           | " |
| 9          | 6               | 90              | 22,35            | 7,0            | " |
| 10         | 3,5             | 90              | 17,35            | 7,50           | " |
| $X \pm Sx$ | $6,77 \pm 1,25$ | $90,5 \pm 1,20$ | $21,55 \pm 2,29$ | $7,3 \pm 0,05$ | - |

### 3.2. Deney 1 (Sulandırıcı Seçimi)

Rastgele seçilen 10 adet damızlık erkek çipura balığından alınan spermalar; motilite kontrolünden sonra zaman kaybetmeden tüm ejakulatlar 50ml'lik plastik tüpde birleştirilmiştir. Alınmasını takiben 30 dk içerisinde materyal metot kısmında belirtilen 4 farklı sulandırıcı ile sulandırıp % 10 DMSO eklendikten sonra dondurulmuştur.

Yapılan denemeler ve sonuçları Çizelge 3.2.'de verilmiştir. Sulandırma sonrası 0,25 ml'lik payetlerde doldurulan spermada en yüksek motiliteyi (% 73) III Nolu Sulandırıcı olan Ringer solusyonunu vermiştir. En yüksek motilitenin gözlemlendiği Ringer solusyonu, çalışmanın ana sulandırıcısı olarak seçilmiştir ve bu sulandırıcı ile çalışmaya devam edilmiştir.

Çalışmada Ringer sulandırıcısı ve Mounib sulandırıcısı arasında birbirlerine çok yakın sonuçlar alınmıştır. En iyi sulandırıcı tespitinde canlılık süreside göz önüne

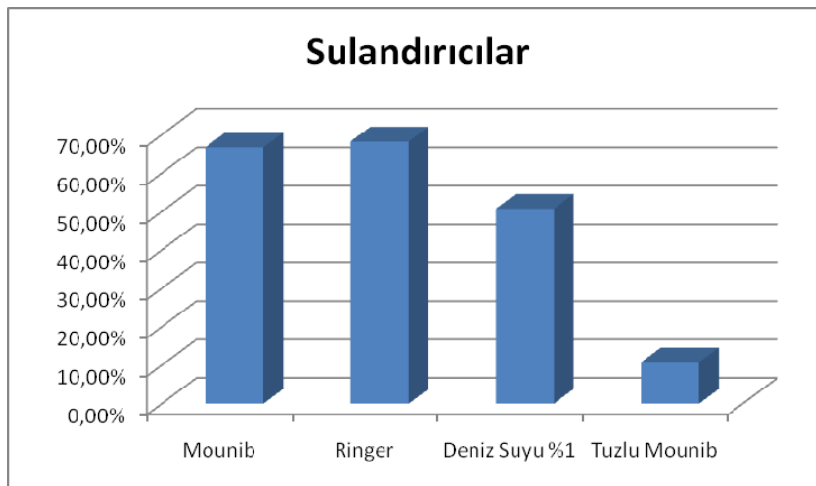
alınmıştır. Ringer solusyonunda, Mounib sulandırıcısı göre 10 - 20 sn daha uzun süre motilite süresi gözlenmiştir.

Yapılan istatistiki değerlendirmede ( $p>0,05$ ) Ringer ve Mounib sulandırıcı arasında önemli bir fark bulunamamıştır. Ancak rakamsal olarak Ringer sulandırıcısı daha yüksek olduğu için çalışmaya bu sulandırıcı ile devam edilmiştir. Diğer sulandırıcılar arasındaki fark ise önemli bulunmuştur.

Çizelge 3.2. Sulandırıcılar arasındaki motilite farkları

| Sulandırıcı   | Çözüm sonrası motilite<br>$\bar{X} \pm S_x$ |
|---------------|---------------------------------------------|
| Mounib        | %66,75 $\pm$ 1,18 <sup>a</sup>              |
| Tuzlu Mounib  | %10,75 $\pm$ 0,75 <sup>c</sup>              |
| Ringer        | %68,25 $\pm$ 1,97 <sup>a</sup>              |
| Deniz Suyu %1 | %50,75 $\pm$ 0,75 <sup>b</sup>              |

<sup>a,b,c</sup> Farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasındaki fark  $p<0,05$  seviyesinde önemlidir.



Şekil 3.1. Sulandırıcılar arasındaki motilite farkları

### 3.3. Deney 2 (Kriyoprotektan Seçimi)

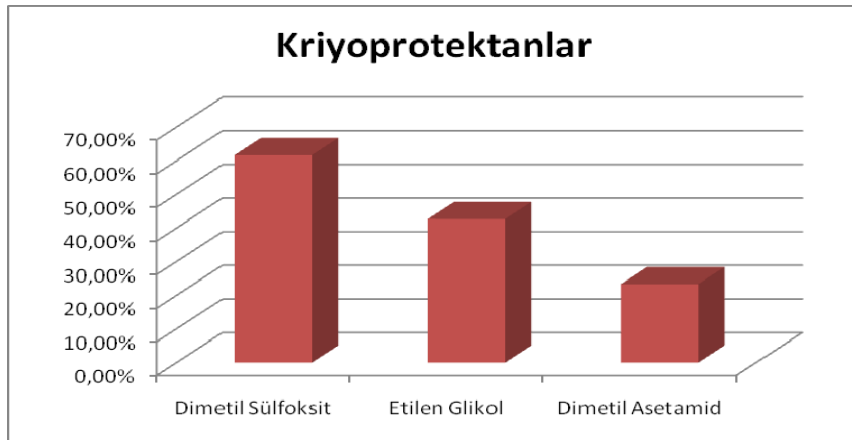
Ringer solusyonun çalışmanın ana sulandırıcısı olarak seçilmesinden sonra bu sulandırıcıya ayrı ayrı %10 DMSO (Dimetil sulfoksit), %10 EG (Etilen glikol), %10 DMA (Dimetil asetamid) katılarak çalışmanın en iyi kriyoprotektanı seçilmiştir.

Kriyoprotektanların başarısı Çizelge 3.3.'de verilmiştir. Çalışmada en iyi motilite %10 DMSO'de alınmıştır. Yapılan istatistiki değerlendirmede ( $p < 0,05$ ) kriyoprotektanlar arasındaki fark önemli bulunmuştur.

Çizelge 3.3. Kriyoprotektanların arasındaki motilite farkları

| Kriyoprotektan    | Çözüm sonrası motilite $\bar{X} \pm s_x$ | Önemlilik Derecesi |
|-------------------|------------------------------------------|--------------------|
| Dimetil Sülfoksit | %61,66 $\pm$ 1,66 <sup>a</sup>           | *                  |
| Etilen Glikol     | %42,66 $\pm$ 1,45 <sup>b</sup>           | *                  |
| Dimetil Asetamid  | %23,33 $\pm$ 1,66 <sup>c</sup>           | *                  |

<sup>a,b,c</sup> Farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arasındaki fark  $p < 0,05$  seviyesinde önemlidir



Şekil 3.2. Kriyoprotektanların arasındaki motilite farkları

### 3.4. Deney 3 (Spermanın Çözdürülmesi)

26 °C’de 20 sn ve 35 °C’de 15 sn olarak iki şekilde uygulanan çözdürme sıcakları Çizelge 3.4.’de verilmiştir. İki çözdürme sıcaklığı arasında motilite yönünden çok küçük farklar gözlenmiştir. 35 °C’de 15 sn uygulanan çözdürme prosedürü küçük farklarla da olsa daha iyi bir sonuç vermiştir. Yapılan istatistiki değerlendirmede ( $p>0,05$ ) iki sulandırma sıcaklığı arasında fark önemsiz bulunmuştur.

Çizelge 3.4. Çözüm sıcaklıkları arasındaki motilite farkı

| Çözüm Sıcaklığı | Motilite<br>$X \pm s_x$ | Önemlilik<br>Derecesi |
|-----------------|-------------------------|-----------------------|
| 26°C            | %67±1,22                | -                     |
| 35°C            | %69±0,57                | -                     |

- Grup ortalamaları arasındaki fark  $p>0,05$  düzeyinde önemsizdir.

### 3.5. Suni Tohumlama ve Dölverimi

Suni tohumlama, damızlık 4 adet dişiden alınan yumurtaların 5’er gramdan oluşan 4 gruba ayrılmasının ardından yapılmıştır.

Çalışmada kullanılan dondurulmuş sperma, çalışma boyunca elde edilen çözüm sonu en iyi motiliteye sahip, %10 DMSO katılan Ringer solusyonundan elde edilmiştir. İki çözdürme sıcaklığı arasında motilite bakımından istatistiksel fark tespit edilmediğinden yumurtalara yakın bir sıcak olması nedeni ile spermaların çözdürülmesi için 26 °C ‘de 15 sn kullanılmıştır.

Yaklaşık 5 gr yumurta üzerine dondurulmuş sperma (I. Grup), sulandırılmış taze sperma (II. Grup), taze sperma (III. Grup) ve doğal döllenmiş yumurtadan (IV. Grup) oluşan biri deney 3’ü kontrol olmak üzere 4 farklı grup oluşturulmuştur. 24. ve 48.

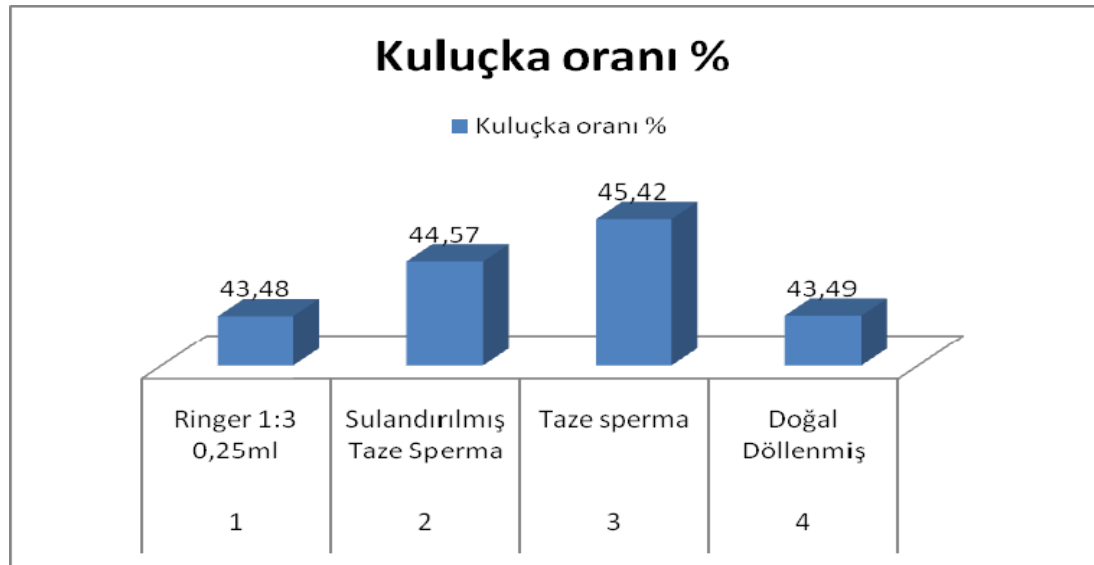
saatlerde ölü yumurtalar dipten toplanmış ve tartılmıştır. 70. saatte yapılan kontrolde kalan yumurtaların %100'e yakını açılmıştır.

Suni tohumlama açılım yüzdeleri Çizelge 3.5.'de verilmiştir. Yapılan istatistikî değerlendirilmede ( $p>0,05$ ) dondurulmuş sperma ile kontrol grupları arasındaki fark önemsiz bulunmuştur.

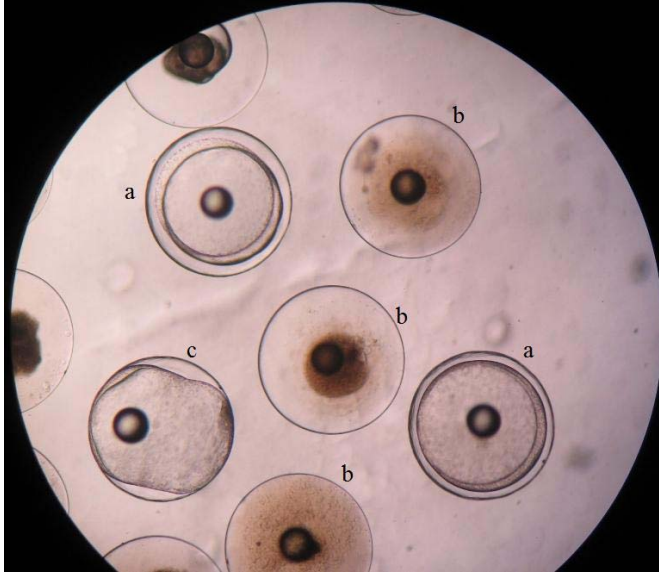
Çizelge 3.5. Suni tohumlamada açılım yüzdeleri

| Grup No | Kullanılan Sperma Miktarı | Sulandırıcı                            | Açılım oranı % $X \pm S_x$ | Önemlilik derecesi |
|---------|---------------------------|----------------------------------------|----------------------------|--------------------|
| 1       | 15 $\mu$ l                | Ringer 1:3 0,25ml                      | 43,48 $\pm$ 1,87           | -                  |
| 2       | 10 $\mu$ l                | Sulandırılmış <sup>1</sup> Taze Sperma | 44,57 $\pm$ 1,40           | -                  |
| 3       | 10 $\mu$ l                | Taze Sperma                            | 45,42 $\pm$ 1,30           | -                  |
| 4       | -                         | Doğal Döllenmiş                        | 43,49 $\pm$ 2,73           | -                  |

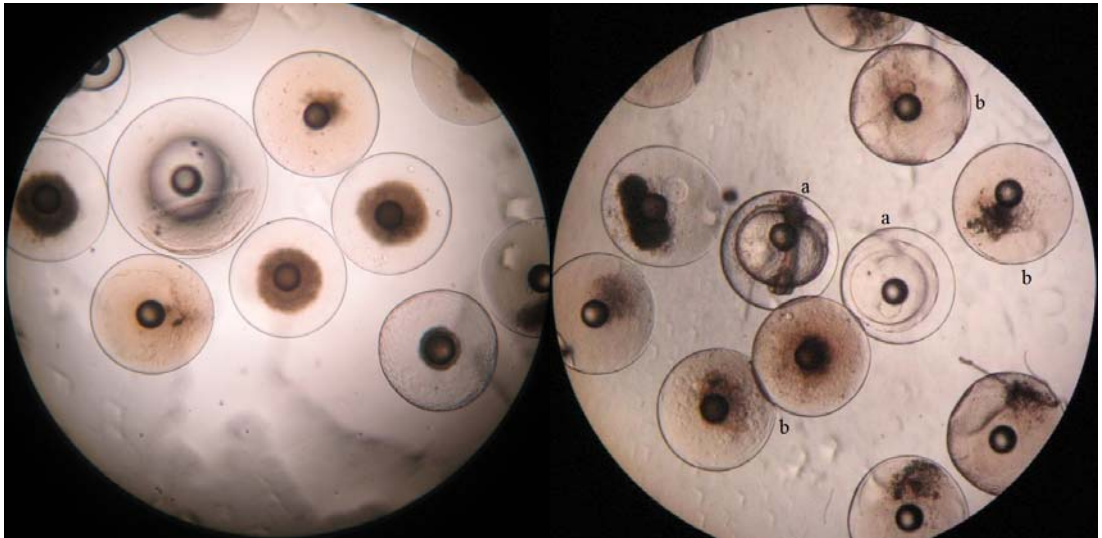
<sup>1</sup> İnaktivasyon (aktive etmeyen) solusyonu ile 1 : 3 oranında sulandırılmış sperma - grup ortalamaları arasındaki fark önemsizdir



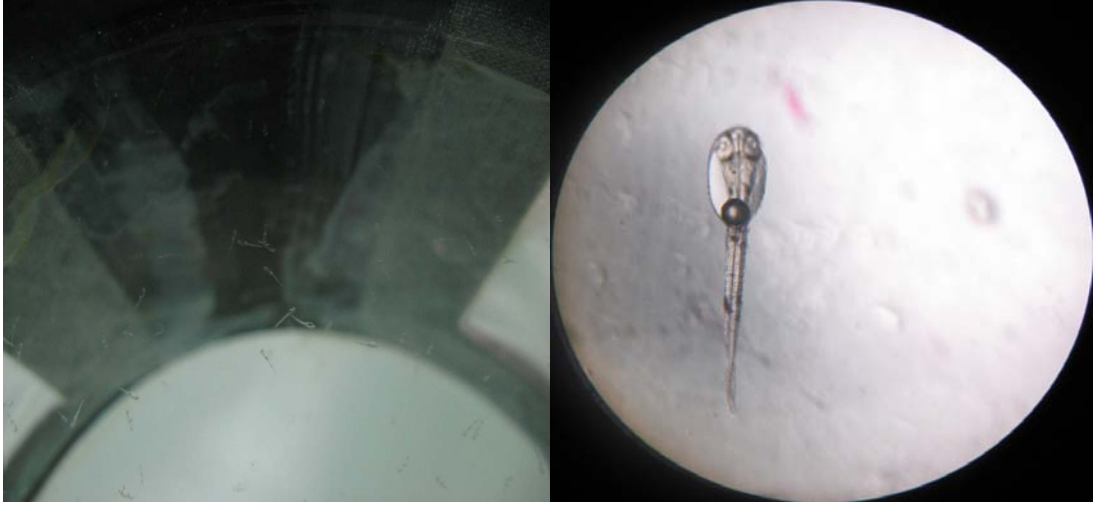
Şekil 3.3. Suni tohumlamada açılım yüzdeleri



Şekil 3.4. Tohumlardan 3 saat sonra alınan yumurtalar a- döllenmiş yumurta (blastomer safhası), b-döllenmemiş, atrezik yumurta c- aynı anda döllenilen yumurtalardaki farklı blastomer safhası



Şekil 3.5. Soldaki resim; Alınan yumurtaların çapı büyük oranda farklılık göstermiştir. Sağdaki resim; a- Döllenmiş yumurta (embriyo safhası) b- 48.saatte alınan döllenmemiş yumurtalar



Resim 3.3. Çalışmada üçüncü günde (70. saat) açılan prelarvalar

## 4. TARTIŞMA

### 4.1. Spermatolojik Muayeneler

Alınan 10 ejakulatta sperma rengi inspeksiyon yoluyla kontrol edilmiş ve anormal bir renge rastlanmamıştır. Seçer (1998), spermanın rengini bir çok balık türünde olduğu gibi çoğunlukla beyaz-krem renge sahip olduğunu bildirmiştir. Bu beyaz (süt beyaz) renkten dolayı balık spermasına “balık sütü – ersuyu” veya milt denilmektedir. Yapılan çalışmada Seçer (1998)’i bildirdiği gibi beyaz – krem renk saptanmış olması normal sınırlar içinde olduğunu göstermektedir.

Spermanın renginin bazı durumlarda beyazın yanında soluk kırmızı ve soluk sarı renkte de olabileceği belirtilmiştir. Bu renk farklılıkları özellikle besleme şartları, bireysel özellikler ve hastalık etkenlerinden kaynaklanabilmektedir. Salmonidae’lerin spermasının renginde nadiren soluk kırmızı ve soluk sarı rengine rastlanmıştır (Aas ve ark., 1991).

Yapılan çalışmada, anestezi sonrası abdominal masaj yöntemi ile sperma alınmıştır. Alınan sperma miktarı en az 2 ml, en fazla 13 ml ve ortalama  $6,77 \pm 1,25$  ml olarak bulunmuştur. Barbato ve ark. (1998), çipuralardan 0 – 3,1 ml Cabrita ve ark. (2005a, b) ise çipurada abdominal masaj yöntemi ile 1 ml sperma elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Barbato ve ark. (1998)’nin yaptığı çalışmada çipuralardan alınabilecek sperma miktarı (0 - 3,1 ml) olarak bildirmelerine karşın, Cabrita ve ark. (2005a, b) uçsuz enjektöre aspirasyon yoluyla 1 ml olarak aldıklarını bildirmişlerdir. Fabbrocini ve ark. (2000), Zilli ve ark., (2008) ve Maricchiolo ve ark., (2007) çipura sperması ile ilgili çalışmalar yapmalarına karşın alınan yada alınabilecek miktarı bildirmemişlerdir.

Yapılan çalışmada alınan sperma miktarının ( $6,77 \pm 1,25$  ml) Barbato ve ark. (1998)'den (0 - 3,1 ml) daha yüksek olduğu bunun nedenin ise iki çalışma arasındaki damızlıkların niteliği olduğu düşünülmektedir. Çalışmada, ağırlığı 800 – 1280g olan 2 – 3 yaşlı damızlık erkek balıklar kullanılmasına karşın, Barbato ve ark. (1998), yaptıkları çalışmada ağırlığı 118 – 444 g arası olan (1 yaşlı) çipuralar kullanılması oluşan farklılığı açıklamaktadır. Ayrıca sperma alma koşulları ve sezonun sperma miktarına etkisi olduğu dikkate alınabilir.

Erişkin teleost balıklarının erkekleri yılda canlı ağırlığının her kilogramına  $10^{10}$  ile  $10^{12}$  arası spermatozoon verebildiği ve yaşça ileri ve tecrübeli erkeklerin daha genç olanlara oranla daha fazla miktarda sperma verdiği bildirilmiştir (DeGraaf ve ark., 2004).

Gökkuşluğu alabalığında sperma miktarı ortalama 6 - 12 ml olarak bildirilmesine karşın bu miktar pek çok faktöre göre değişebilmektedir. Bunların başında suyun sıcaklığı, spermanın sağım aralığı, yaş, ortamdaki dişi varlığı ve özellikle de bakım besleme şartları sperma miktarı üzerine oldukça etkili faktörler olarak bildirilmektedir (Büyükhatipoğlu ve Holtz, 1984; DeGraaf ve ark., 2004).

Tekin ve ark. (2003) gökkuşluğu alabalığında yaptığı çalışmaya göre sperma miktarı ile vücut ağırlığı ve vücut uzunluğu arasında pozitif bir ilişki bulunmaktadır. Barbato ve ark. (1998) 'a göre ise çipuralarda böyle bir korelasyon olmadığı belirtilmiştir.

Kültür balığı yetiştiriciliğinde yavru verimi çok önemli olduğundan ve buna bağlı olarak sadece motil olan spermatozoonların yumurtayı dölleme yeteneğine sahip olması, alınan ejakulatların motilitesinin tespit edilmesini çok önemli hale getirmektedir.

Alınan spermanın kullanılmadan önce motilitesine bakılması gerekmektedir. Ayrıca balık spermasının türlere uygun şekilde aktive edilmesi gerekmektedir

(Suquent ve ark., 2000). Spermatozoon aktivasyonu için birçok hücre dışı etken bildirilmiştir. Deniz balıklarında flageller aktivasyonu hiperosmotik osmotik ortam, tatlı su balıklarında ise hipoosmotik ortam sağlamaktadır. Salmonid'lerde ve mersin balığında motilite aktivasyonun en önemli tetikcisi  $K^+$  konstarasyonudur (Billiard, 1983; Zilli ve ark., 2008). Ancak çipurada böyle bir bulgu bildirilmemiştir.

Çipurada 500 mM NaCl ile % 50, 550 mM NaCl ile ise % 90 motilite sağlanmıştır. Çipura spermasında iyonik olmayan çözünmüş 1100 mM çözelti ile de aktivasyon sağlanabilmektedir. Zilli ve ark., (2008) çipurada  $K^+$  ve  $Ca^{2+}$  'ın sperma aktivasyonda hiç etkisi olmadığını ve spermatozoonları aktive etmek için optimum osmolariteyi 1100 mOsm/Kg olarak bildirmişlerdir. Spermatozoonların aktive olması için halibutda 900 - 1100 mOsm/Kg (Billard ve ark., 1995), kalkanda 300 - 1100 mOsm/Kg (Dreanno ve ark., 1999b) olarak değişik araştırmacılar tarafından geniş aralıklı değerler verilmektedir.

Rideout ve ark., (2004), kod (*Gadus morhua*) ve *Melanogrammus aeglefinus* balıklarında sperma alma zamanının motilite açısında büyük önem arz ettiği rapor etmişlerdir. İki türde de üreme sezonun başlarında ( 1. ve 2. haftada) alınan spermanın sezonun sonlarında (bitime 1 veya 2 hafta kala) alınan spermadan dondurma sonrası en az % 40 motilite farkı yarattığı saptanmıştır. Aynı şekilde Chao ve ark. (1986) çipura gibi sparidae ailesine ait *Acanthopagrus schlegelii*'in spermasının üreme sezonun başlarında alınmasının dondurma başarısında büyük öneme sahip olduğunu belirtmişlerdir. Levrekte de sperma alma zamanının önemli olduğu ve üreme sezonun sonlarına doğru motilitede önemli düşüşler gözlemlendiği bildirilmiştir (Rainis ve ark., 2003). Dreanno ve ark., (1999a)'da levrekte sperma alma zamanının çok önemli olduğunu, üreme sezonun başında alınan spermanın, üreme sezonun sonunda alınan spermaya göre motilite, yoğunluk, kısa süre saklanma kapasitesi (süresi), dondurma başarısı, fertilizasyon yeteneği ve hücre içi ATP miktarı önemli önemli düşüşler tespit edildiği bildirmişlerdir. Yapılan araştırmada üreme sezonun ortalarında sperma alınmıştır.

Cabrita ve ark. (2005a,b) çipura balıklarında üreme sezonun ortalarında (Aralık-Mart – Güney İspanya) gamet almışlardır. Gamet toplamak için 2 yaşlı ortalama 1,2 kg olan erkekler ve 3 yaşlı ortalama 3,5 kg olan dişiler seçilmiştir. Alınan spermada spermatozoon aktivasyonu için yapay deniz suyu (aktivasyon solusyonu) kullanılmıştır. Bu araştırmacılar farklı olarak Barbato ve ark. (1998) ile Fabroccini ve ark. (2000)'ı motilite aktivasyonu için 1:10 oranında deniz suyu (% 37) kullanmışlardır. Cabrita ve ark. (2005a,b), yaptıkları 2 çalışmada da aktivasyon için 1:10 oranında % 30'luk aktivasyon solusyonu (30 g/l NaCl, 0,8 g/l KCl, 1,3 g/l CaCl<sub>2</sub>, 6,6 G/l MgSO<sub>4</sub>, 0,18 g/l NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,2, osmolarite 987 mOsmol/kg) kullanmışlardır. Yine Rideout ve ark., (2004), deniz balıklarında yaptıkları çalışmada motilite aktivasyonu için %30'luk deniz suyu kullanmışlardır. Çipura ile aynı aileye ait mercan balığında yapılan bir çalışmada (Liu ve ark., 2006) ise aktivasyon için 1 : 1000 oranında deniz suyu kullanılmıştır. Deniz balıklarında yapılan pek çok çalışmada motilite aktivasyonu için % 36 – % 38'lik deniz suyu kullanımı yaygın olarak görülmektedir (Chen ve ark., 2004; Sansone ve ark., 2002; Zilli ve ark., 2005). Bazı araştırmacılar ise deniz suyuna (% 37) % 1 - 2'lik BSA katarak daha yüksek aktive etmeye çalışmışlardır (Fauvel ve ark., 1998; Rouxel ve ark., 2008).

Bu çalışmada aktivasyon için % 37 oranında NaCl katılan saf su, işletmeden elde edilen % 36'lık steril deniz suyu ve %30'luk aktivasyon solusyonu (30 g/l NaCl, 0,8 g/l KCl, 1,3 g/l CaCl<sub>2</sub>, 6,6 G/l MgSO<sub>4</sub>, 0,18 g/l NaHCO<sub>3</sub>) test edilmiştir. Yapılan ön çalışmalarda % 37 NaCl ve % 36'lık steril deniz suyu ile aktivasyonda yeterli hareket sağlanmadığı nativ spermaların motilitesinin % 50 – 60 oranında kaldığı ve hareketlerinin daha yavaş olduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenden dolayı çalışma boyunca spermatozoa aktivasyonu için %30'luk aktivasyon solusyonu kullanılmıştır. Solusyonlar arasındaki bu farkın nedeninin spermatozoa üzerinde oluşan ozmotik şok olduğu düşünülmektedir.

Araştırmada, taze çipura spermasından elde edilen spermatozoa motilitesi en yüksek % 95, en düşük % 85, ortalama % 90,5 ± 1,20 olarak kaydedilmiştir.

Çipurada yapılan bir çalışmada, Fabroccini ve ark. (2000) nativ spermatozoa motilitesinin hangi yüzdelerde olduğu ve standart hata bildirilmemesine karşın, motilite süresi verilen tabloda motilitenin % 95'in üzerine çıktığı görülmektedir. Cabrita ve ark. (2005a, b)'da yaptıkları bu iki çalışmada da motilite ortalaması belirtilmemiştir. Fakat genel olarak nativ sperma % 95 motil olarak kabul edilmiştir. Fauvel ve ark., (1998, 1999)'nın levrekte yaptıkları çalışmalarda nativ spermanın %90 ve üzeri motiliteye sahip olduğu saptanmıştır. Araştırmada elde edilen motilite bulguları tüm bu çalışmalardaki bulgularla benzerlik göstermektedir.

Spermanın birim hacimde bulunan toplam spermatozoa sayısının bilinmesiyle ancak, toplam motil spermatozoon miktarı veya diğer spermatolojik özellikler sayısal olarak ifade edilebilir (Tekin, 1994). Ayrıca sayısal olarak ortaya koyulan yoğunluk değeri ile suni tohumlama sırasından kullanılan toplam motil spermatozoa (TMS) sayısı saptanarak uygun tohumlama dozu kullanılabilir.

Testis içi gamet yaşlanması birçok balık türünde gözlenmekte ve özellikle üreme sezonunun sonunda sperma kalitesini olumsuz etkilemektedir. Yaşlanan spermatozoon yapısındaki değişiklikler, elektron mikroskopu ile gözlenmektedir. Üreme sezonun başında, sonuna göre daha uzun süre spermatozoon aktivitesi korunmaktadır (Sorbera ve ark., 1996; Suquet ve ark., 2000). Bunların yanında alınan spermanın idrar ile kontamine olması ve spermatozoon yaşlanması da alınan spermanın kalitesini önemli oranda etkilediği belirtilmektedir (Suquet ve ark., 2000). Sperma kalitesine etki eden bu faktörlerin spermatozoa yoğunluğuna da etki yapması olasıdır.

Yapılan bu araştırmada, çipura spermasının yoğunluğunu tespit için hemositometrik yöntem kullanılmıştır. Kullanılan bu yöntem, Barbato ve ark. (1998), Çevik (2000), Hatipoğlu (2007) ve Tekin ve ark., (2003)'ün kullandığı yöntemlerle aynıdır. Fauvel ve ark., (1998, 1999) ve Ciereszko ve Dabrowski (1993) ise spektrofotometrik yöntemle balık spermasının spermatozoa yoğunluğunu tespit etmişlerdir.

Balık spermasının memeli spermalarına göre çok daha yoğun olması nedeniyle düşük sulandırma oranları sayımı zorlaştırmaktadır. Aynı oranda sayımdaki hata payınıda arttırmaktadır. Yapılan bu çalışmada, çipura spermasının en düşük yoğunluğu ml'de  $11,6 \times 10^9$ , en yüksek  $32,2 \times 10^9$ , ortalama  $21,55 \pm 2,29 \times 10^9$  spermatozoon olarak kaydedilmiştir. Barbato ve ark. (1998) çipura da ml'de yoğunluğun  $11,6 - 26,7 \times 10^9$  olarak değiştiği, ortalamanın ise ml'de  $17,95 \times 10^9$  olduğu belirtilmiştir. Cabrita ve ark. (2005a), çipura spermanın yoğunluğunun  $5,5- 17,5 \times 10^9$  spermatozoa/ml olarak vermişlerdir. Yapılan çalışmada elde edilen yoğunluk değerleri her iki çalışmadan da daha yüksek kaydedilmiştir. Oluşan farkın nedeni ise kullanılan damızlıkların yaşı, beslenmesi, üreme sezonun hangi evresinde olduğu ve diğer çevresel faktörler (suyun sıcaklığı, pH'sı, çözünmüş oksijen değeri) olarak düşünülmektedir. Yapılan araştırma, çipurada bildirilen en yüksek spermatozoa yoğunluğu olmuştur ( $32,2 \times 10^9$  spz/ml).

Balıklarda da diğer türlerde olduğu gibi spermanın pH'sının bilinmesi spermaya uygulanacak işlemler açısından oldukça önemlidir (Akçay ve ark., 1995; Suquet ve ark., 1993).

Yapılan çalışmada, spermanın pH'sını belirlemek için pH indikatör kağıdı kullanılmıştır. Bu yöntem, Çevik (2000) ve Hatipoğlu (2007)'un uygulandığı yöntemle aynıdır. Cabrita ve ark., (2005a) ise elektronik pHmetre kullanmışlardır.

Yapılan çalışmada, en düşük pH 7 en yüksek 7,5 ortalama  $7,3 \pm 0,05$  olarak bulunmuştur. Elde edilen bu değerler Cabrita ve ark., (2005a), elde ettiği değerden (pH 8,2) daha düşük gözlenmiştir. Oluşan bu farkın damızlık erkeklerin beslenmesi ve spermatozoa yoğunluğunun farklı olması yanı sıra, bulunduğu suyun tuzluluk ve pH'sının oluşan farkta önemli etki yaptığı düşünülmektedir.

#### 4.2. Spermanın Dondurulması ve Çözdürülmesi

Deniz balıkları spermasının dondurulması için kullanılan sulandırıcılar çoğunlukla tuzlu (% 1-10 konsantrasyon) veya şekerli (% 1-10) solusyanlardır. Sulandırıcıların spermatozoon motilitesini aktive etmemesi gerekmektedir (Suquet ve ark., 2000). Spermanın sulandırılma oranı araştırmacılara ve uygulanan balık türüne göre 1 : 1 – 1 : 20 oranında değişmektedir. Sulandırma oranı artırılan çalışmalarda çözüm sonu motilite oranı ve süresi düşmüştür. Cambeyron ve Zohar (1990), çipuralarda 1 : 50 oranında sulandırılan spermanın, daha düşük oranda sulandırılanlara göre çözüm sonu motilitesinin daha düşük olduğunu not edilmiştir.

Yapılan çalışmada kullanılan 4 farklı sulandırıcının çipura spermasının dondurulmasındaki başarısı ortaya konulmuştur. Çalışmada Mounib, tuzlu Mounib, Ringer ve % 1'lik NaCl kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan sulandırıcılar bir çok balık türünde kullanılmaktadır. Çipura spermasının dondurulmasında ile yapılan araştırmalarda sulandırıcı olarak genellikle % 1 NaCl kullanılmaktadır (Barbato ve ark., 1998; Cabrita ve ark., 2005a,b; Fabroccini ve ark., 2000).

Mounib (Mounib, 1978) sulandırıcısı tek başına veya BSA eklenmiş olarak bir çok çalışmada ve balık türünde kullanılmıştır. Örneğin Chen ve ark. (2004) kalkan (*Scophthalmus maximus*) balığında, Rideout ve ark. (2004), kod balığında, Fauvel ve ark. (1998) ve Zilli ve ark. (2005) levrekte Mounib solusyonunu başarı ile kullanmışlardır.

Çalışmada kullanılan Ringer sulandırıcısı da yine bazı değişikliklerle veya yalın olarak bir çok balık türünde başarı ile uygulanmıştır. Dreanno ve ark. (1997) ve Chen ve ark. (2004) kalkanda, Chao ve ark. (1975) gri kefalde bu sulandırıcıyı başarı ile kullanmışlardır. Dreanno ve ark. (1997)'in kalkan spermasında Ringer tabanlı bir sulandırıcı ile elde ettiği çözüm sonu % 69,9 motilite, yapılan bu çalışmada Ringer bulgusu (% 68,25) ile benzerlik göstermektedir. Liu ve ark. (2006) çipura ile aynı

aileden olan mercanda (*Pagrus major*) yaptıkları çalışmada, Ringer solusyonu (% 64,3) ile Mounib (% 42) ve tuzlu Mounib solusyonlarından (% 63,6) daha başarılı sonuçlar almışlardır.

Araştırmada kullanılan tuzlu Mounib solusyonu ise Liu ve ark. (2006)'ın tuzlu Mounib solusyonuna, Mounib (Mounib, 1978) solusyonun içerdiği gibi 10 mg/ml  $\text{KHCO}_3$  eklenerek elde edilmiştir. Liu ve ark. (2006) mercanda yaptıkları bu çalışmada tuzlu Mounib solusyonu ile (% 63,6) normal Mounib solusyonuna (%42) oranla daha iyi çözüm sonu motilite başarısı elde etmişlerdir. Genetik yakınlık dikkate alınarak çipurada araştırılması gerekliliği üzerine bu sulandırıcı çipurada da uygulanmıştır.

Çalışmada kullanılan % 1'lik NaCl solusyonunun çipura spermasının dondurulması ile ilgili çalışmalarda yaygın olarak kullanıldığı ve başarılı olduğu rapor edilmiştir. Bu araştırmada % 1 NaCl solusyonu test edilmiş ve çipura sperması için en uygun sulandırıcı olup olmadığı araştırılmıştır.

Elde edilen bulgulara göre, çözüm sonu en yüksek motilite veren Mounib ve Ringer solusyonları arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Çalışmanın ana sulandırıcısı olarak seçilen Ringer solusyonunun Mounib solusyonuna göre daha yüksek motilite değerleri verdiği ve Mounib solusyona göre motilite süresinin daha uzun olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmadaki en düşük motilite ise mercan balığında (Liu ve ark., 2006) yapılan çalışmanın aksine tuzlu Mounib solusyonunda (%10,75) gözlenmiştir. Bu sulandırıcı ile alınan başarısız sonuçlardan sonra sulandırma sonrası motilitenin aktive olup olmadığı gözlenmiştir. Alınan başarısız sonuçların en önemli nedeni ise bu sulandırıcı içerisindeki % 19,4'lük NaCl ve % 10'luk DMSO'nun osmolariteyi artırması ve spermatozoonların büyük bir bölümünün aktive olmasını sağladığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle aktive olan spermatozoonların 3 – 5 dk içerisinde

dondurulmak üzere sıvı azot buharına konana kadar geçen süre, spermatozoonların 0,25 ml'lik payetlerde donma süre ve donmanın yarattığı şok ve buz kristallerinin başarıyı düşük tuttuğu dikkate alınmalıdır.

Bu araştırmanın diğer bir bulgusu ise %1 NaCl solusyonun %50,75 motilite ile başarılı bir sulandırıcı olduğu fakat çipura sperması için ideal sulandırıcıları olan Ringer (%68,25) ve Mounib (%66,75)'den daha başarısız olduğu ortaya konulmuştur.

Yapılan çalışmada, Fabbrocini ve ark. (2000)'nın (% 1 NaCl solusyonu) ve Cabrita ve ark. (2005a)'da aynı sulandırıcı ile (10mg/ml BSA eklenmiş) sırasıyla çözüm sonu % 67 ve % 70 motilite değerleri ile yapılan bu çalışmadaki aynı sulandırıcıdan alınan çözüm sonu motiliteden (% 50,75) farklı olduğu saptanmıştır. Fabbrocini ve ark. (2000) yaptıkları çalışmada, 1 : 6 oranında sulandırılan spermada, dondurma öncesi uyguladıkları toksisite testleri sonucu % 5 DMSO'u çalışmadaki kriyoprotektan olarak seçmişlerdir. Aynı çalışmada soğutma oranı olarak 10 °C/dk'ın 15 °C/dk'a oranla daha iyi olduğu belirtilmiştir. Çözdürme sıcaklığı olarak ise 30 °C'de 10 °C/sn kullanıldığı bildirilmiştir. Cabrita ve ark. (2005a)'nın da aynı prosedürü uyguladığı, tek farkın sulandırıcıya katılan BSA olduğu görülmektedir. Yapılan bu çalışmada elde edilen çözüm sonu motilitenin diğer araştırmacılardan farklı olmasının nedenleri çalışmalar arasındaki sulandırma oranının farklı olması (1 : 3), kriyoprotektan oranının farklı olması (%10), dondurma ve çözündürme prosedüründeki farklardan kaynakladığı düşünülmektedir. Ayrıca spermatozoa yoğunluğundaki farklılıkların ve dondurma süresinin etkili olduğunu düşünülmektedir. Fabbrocini ve ark. (2000)'ın çözüm sonu en iyi motilite veren (%67) kombinasyonu (%1 NaCl %5 DMSO, 10 °C/dk) ile bu çalışmada Ringer solusyonu %10 DMSO (%68,25) ile elde edilen çözüm sonu motilitenin çok yakın olduğu gözlenmiştir.

Yapılan kaynak taramalarında dondurma sıcaklık ve oranlarının farklılık gösterdiği gözlenmiştir. Bu çalışmada, 0,25ml'lik payetlere çekilen sperma sıvı azot buharının 4 – 6 cm üzerinde 10dk'a dondurulmuştur. Buna karşın, Barbato ve

ark. (1998) ise 0,5 ml'lik payetleri sıvı azot seviyesinin 4,3 cm üzerinde 10dk'da dondurmuşlardır. Fabbrocini ve ark. (2000) ise 0,25 ml'lik payetlerde soğutma oranları ile ilgili yaptığı çalışmada, payetlerin 0 °C'den -150 °C'e dakikada 10 °C tutulması 15 °C/dk'dan daha iyi sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Cabrita ve ark. (2005a,b) ise soğutma oranları ilgili Fabbrocini ve ark. (2000)'ın tarif ettiği şekilde kullanmışlardır. Diğer bazı balık türlerinde, Dreanno ve ark. (1997), Zilli ve ark. (2005), Fauvel ve ark. (1998) dondurulmak üzere alınan spermaları 0,25 ml'lik payetlerde sıvı azot seviyesinin 6,5 cm üzerine 15 dk'da dondurmuşlardır.

Balık spermasının uygun bir sulandırıcı ile sulandırılmasının ardından dondurma sırasında oluşabilecek zararlara karşı kriyoprotektan katılması gerekmektedir. Balık spermasının dondurulması ile ilgili çalışmalarda, hücre içi kriyoprotektanlar olan EG, PG, gliserol, DMSO, DMA ve methanol arasından genellikle DMSO'nun en iyi sonucu verdiği bildirilmektedir. (Holtz, 1993; Suquet ve ark., 2000). DMSO'nun diğerlerine göre daha etkili olmasının nedeni hızlı penetrasyon yapması ve spermanın fosfolipit tabakasıyla etkileşime girmesidir. DMSO'nun toksik etkisinin balık türlerine bağlı olarak değiştiği bildirilmektedir (Suquet ve ark., 2000).

Yapılan bu çalışmada, Ringer solusyonuna eklenen DMSO, EG ve DMA'nın % 10'luk konantrasyonları kullanılmıştır. Çalışmadaki üç kriyoprotektan arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Buna göre alışım uygulanmadan dondurulan spermallerden çözüm sonu DMSO ile % 61,66, EG ile %42,66, DMA ile %23,33 motilite elde edilmiştir. Bu çalışmada uygulanan yöntemle göre 3 – 5 dk içerisinde (sulandırma, payetlere çekilmesi ve payetlerin kapatılması sırasında geçen süre) dondurma işlemine başlanan spermallerin dondurma sonrası başarısı değerlendirilmiştir. Fabbrocini ve ark. (2000) ise taze spermayı, sulandırıcıya katılan (%1 NaCl) DMSO, EG ve PG'ı değişik oranlarda (% 5, % 7, % 10, % 15) kullanılmış ve sonrasında 2 dk, 10 dk, 20 dk, 30 dk alışım sonrası spermatozoonlar üzerindeki toksik etkisine göre değerlendirmişlerdir. Bunun üzerine en az toksik konsantrasyonlar olan %5 DMSO, %10 EG, %10 PG'nun çözüm sonu başarısı araştırmışlardır.

Çipurada yapılan bu çalışma, Fabbrocini ve ark. (2000)'ın % 5 DMSO içeren % 1'lik NaCl solusyonunda alınan % 67 çözüm sonu başarısı ile farklı olmuştur. Bu farkın nedenleri üstte de belirtildiği gibi sulandırma oranının farklı olması (1 : 3), kriyoprotektan oranının farklı olması (% 10), soğutma oranı ve çözündürme prosedüründeki farklılardan ve kriyoprotektanların etkinliğini belirleyen sulandırıcının farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Aynı çalışmada % 1 NaCl ile sulandırılan % 10 EG eklenmiş spermadan elden edilen çözüm sonu % 40 – 45 motilite bulguları ile bu çalışma (% 42,66) benzer sonuç vermiştir.

Liu ve ark. (2006), mercanda yaptıkları çalışmada, % 12'lik DMA'nın ve % 9'luk EG'ün sırasıyla, çözüm sonu % 69 ve % 84 motilite değerleri vermesi genetik yakınlığı bilinen çipurada denenmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır.

Bu araştırmada, % 10'luk DMA'nın kriyoprotektif etkisinin çok düşük olduğu ortaya konulmuştur. % 10 EG ise orta derecede bir koruma sağlamasına karşın bu konsantrasyonda çözüm sonu en yüksek % 45 motilite ile başarısız olarak nitelebilmektedir. Liu ve ark. (2006)'nın mercanda yaptıkları çalışmadan farklı sonuçlar elde edilmesi başta uygulanan tür olmak üzere kullanılan sulandırıcıların farklı olması, dondurma prosedürünü farklı uygulanması, kullanılan payet hacimlerinin (2 ml) farklı olması ve çözündürme sıcaklığı ve sürenindeki farklılardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Yapılan bu araştırmada, diğer bazı balık türlerinde olduğu gibi DMSO'un kriyoprotektif etkisinin yüksek olduğu ve kriyopreservasyon sırasında taze spermanın sahip olduğu motilitenin yaklaşık % 80'nin korunabildiği gözlenmiştir. Bu bulgu, Maisse ve ark. (1998)'ın çipura spermasında % 85 kriyopreservasyon başarısı ile paralellik göstermektedir. Dreanno ve ark. (1997)'in kalkan spermasında % 70'lik kriyopreservasyon başarısında ise daha yüksek bulunmuştur.

Çözdürme aşamasının hızlı geçilmesi kristalizasyonu önlemek için gereklidir (Suquet ve ark., 2000). Yapılan çalışmada, çözdürme işlemi 26 °C’de 20 sn, 35 °C’de 15 sn olarak uygulanmıştır. Barbato ve ark. (1998), çipura spermasını 1,5 ml’lik payetleri 26 °C’de 2 dk’da çözdürmüşlerdir. Fabbrocini ve ark. (2000) ise çözdürme işlemini 30 °C’de 10 °C/sn (22 sn) ve 15 °C/sn (15 sn) olacak şekilde 2 türlü uygulamışlardır.

Levrekte 0,25 ml’lik payetlerdeki dondurulmuş sperma 35 °C’de 5 sn’de çözdürülmüştür (Fauvel ve ark., 1998, 1999; Zilli ve ark., 2005). DeGraaf ve ark. (2004) levrekle aynı aileye ait *Centropristis striata* spermasını 0,5 ml’lik payetlerde 20 °C’de 30 sn’de çözdürmüşlerdir. Bu çalışmada ise, 26 °C’de 20 sn ve 35 °C’de 15 sn’lik çözdürme işlemleri arasındaki anlamlı fark görülememesine karşın 35 °C’de 15 sn’de çözdürülen payetlerin sayısal olarak daha yüksek motilite verdiği tespit edilmiştir.

#### 4.3. Suni Tohumlama ve Dölverimi

Araştırmanın yöntemi dikkate alındığında dondurulmuş sperma ile yapılacak fertilizasyon denemelerinde spermanın çözdürülmesi için 35 °C’de 15 sn kullanılması gerekirken, yumurta ve sperma arasında sıcaklık farkı yaratmamak ve aynı zamanda taze sperma ile benzer koşulların oluşması için (yumurtalar ve taze sperma yaklaşık 18 °C) 26 °C’de 20 sn kullanılmıştır. İki çözdürme sıcaklığının motilite bakımından tahmin edilenden daha az etki yapması ve istatistiksel olarak önemsiz olması değişiklik yapılmasını destekler niteliklidir.

Yapılan çalışma, Barbato ve ark. (1998)’ın kullandıkları yöntemden farklılık göstermektedir. Bu araştırmacılar, fertilizasyonda kullanmak üzere 4 erkek çipuradan ortalama 300 µl sperma elde etmiştir. Fertilizasyonda kullanacak yumurtaları bir diğiden kateterizasyon yöntemi ile (4 g) almışlardır. Fertilizasyonda çözüm sonu motilite klasmanı 4 olarak nitelendirilen (muhtemel % 65 – 80 motilite) sperma ile

10 grup tohumlanmıştır. Her grup ortalama 165 yumurta olacak şekilde oluşturulmuştur. Bu grupları A ve B olarak iki ana grupta toplamışlardır. A grubu inkübasyon boyunca kontrol edilmemiş (muamele edilmemiş), inkübasyon sonunda çıkan larva sayısına bakılmıştır. B grubunda ise inkübasyon boyunca 2 veya 3 kere yapılan muameleye göre tekrar gruplandırılmıştır. Fertilizasyon, yumurta başına  $2,6 \times 10^5$  spz olacak şekilde hesaplanmıştır. Aktivasyon için 2,4 ml deniz suyu kullanmışlardır. İnkübasyon, 500 ml deniz suyu içeren, sabit 17,5 °C sıcaklıkta yavaşça karıştırılan beherlerde yapılmıştır. Sonuç olarak kuluçka oranının % 13,6 - % 58,6 arası değiştiğini bildirmişlerdir.

Cabrita ve ark. (2005a), çipurada 3 dişiden sağım yolu ile elde ettikleri yumurtaları plastik kaplara almışlardır. Alınan yumurtalar birleştirilmiştir (pooling). Birleştirilen yumurtalar yaklaşık 2000 adet (2 ml) olacak şekilde grublandırılmıştır. Her grup 50 µl taze sperma veya 350 µl dondurulmuş sperma ile fertilize edilmiştir. Yumurta - spermatoozon oranı olarak yaklaşık  $1,3 \times 10^5$  spz/yumurta olacak şekilde hesaplanmıştır. Fertilizasyon için yumurtaların 2 katı deniz suyu (4 ml) eklemişlerdir. Fertilizasyon işleminden 10 dk sonra 50 ml deniz suyu eklenip kuluçkaya (72 saat) alınıncaya kadar bir gün boyunca plastik inkübatörlerde tutulmuşlardır. Yumurtalar  $18 \pm 1$  °C'de karanlık ortamda inkübe edilmişlerdir. Döllenmemiş yumurtaların ve kuluçkadan çıkan larvaların karışması amacıyla kullanılan hava kabarcıkları, inkübatörden rastgele alınan 200 ml su ile kuluçkadan çıkma oranı belirlemişlerdir. Sonuçta taze ve dondurulmuş spermadan elde ettikleri fertilizasyon oranlarını sırasıyla % 77 , %75 olarak bildirilmiştir.

Galli ve ark. (2009) ise, çipura dişilerinden yumurta almak için öncelikle GnRHa (40 µg/kg) uygulamışlardır. Yumurtaları abdominal masaj yoluyla almışlardır. Fertilizasyonda, Barbato ve ark. (1998)'nın kullandığı spermatozoon/yumurta oranını ( $2,6 \times 10^5$  spz/yumurta) ve  $1 \times 10^5$  spz/yumurta oranlarını kullanmışlardır. Sonuçta taze ve dondurulmuş spermadan elde ettikleri fertilizasyon oranlarını % 22,6 – 40 arası değiştiğini bildirmişlerdir.

Yeni yumurtlanmış yumurta hızla su alarak şişer, spermatozoonun yumurtadaki mikropili en kısa zamanda bulması ve mikropil deliğini kullanarak yumurtaya girmesi için en fazla 2 dakika süresi vardır (Kime ve ark., 2001). Bundan farklı olarak, Butts ve ark. (2009) ise, kod balığında yaptığı çalışmada, spermatozon – yumurta temas süresinin 30 dakikaya kadar uzatılmasının fertilizasyon oranında önemli bir artış sağladığı bildirilmiştir. Bunun nedeni kod balığı yumurtalarının mikropil deliğinin kapanma süresinin daha uzun olabileceği yada fertilizasyonun ilk dakikalarında yapılan işlemlerin (su eklemek, kabı taşımak, inkübatöre aktarmak) yumurtalar üzerinde olumsuz etki yaratabileceği dikkate alınması gereken bir noktadır.

Bu araştırmada kullanılan aktivasyon solusyonu gibi, Rideout ve ark. (2004)'da aktivasyon için ‰ 30 tuzluluğa sahip deniz suyu kullanmışlardır. *Melanogrammus aeglefinus*'da yapılan bu çalışmada 10 ml yumurta üzerine taze sperma ve dondurulmuş sperma ayrı gruplarda eklenip 1 dk bekletildikten sonra yumurta miktarının 20 katı (200 ml) ‰ 30 tuzluluğa sahip deniz suyu kullanmışlardır. 250 ml'lik cam beherde inkübe edilen yumurtalar, 48 saat sonra mikroskopta değerlendirilerek fertilizasyon oranı ortaya konulmuştur.

Fauvel ve ark. (1998) ise, levrekte yaptığı çalışmada, damızlıkların bulunduğu tankların sıcaklığı 13 °C olarak bildirilmiştir. Yumurtalar alınmadan 72 saat önce, tek enjeksiyon 10 µg/kg dozda LHRHa (GnRHa) kullanmışlardır. Alınan yumurtalar diseksiyon mikroskobu ile muayene edildikten sonra fertilizasyonda kullanılmıştır. Fertilizasyonda kullanılan taze spermalar 6 erkekten sağım yoluyla elde edilip, karıştırılarak kullanılmıştır. Taze spermalar kullanılmadan hemen önce inaktivasyon solusyonu ile 1 : 10, dondurulmuş sperma ise 1 : 3,3 oranında sulandırılmıştır. Böylelikle taze sperma ve dondurulmuş spermanın toplam sulandırma oranı 1 : 10 olarak belirlenmiştir. Her grupta 2 ml yumurtaya, 3 farklı tohumlama dozu ( $3,5 \times 10^4$ ,  $7,0 \times 10^4$ ,  $2,0 \times 10^5$  spz : yumurta) ayrı ayrı uygulanmıştır. Aktivasyon için 13 °C'deki ‰ 38'lik deniz suyu yumurtaların hacminin yarısı (1 ml) kadar kullanılmıştır. Fauvel ve ark. (1998)'nin uyguladığı bu yöntemi Zilli ve ark. (2005)

da aynen uygulamışlardır. Bu araştırmacılar, tohumlama dozu olarak  $2 \times 10^5$  spz/yumurta olarak kullanılmışlardır. Fertilizasyon oranı, 3 saat sonra mikroskopta yapılan muayene ile ortaya konulmuştur.

Yapılan fertilizasyon çalışmasında, dondurulmuş sperma (I. grup), inaktivasyon solusyonu ile 1 : 3 oranında sulandırılan taze sperma (II. grup) ve taze sperma (III. Grup) ile döllenmiş yumurtalar ve kollektörlerden alınan doğal döllenmiş yumurtaların (IV. grup) kuluçkadan çıkma başarıları sırasıyla % 43,48, % 44,57, % 45,42, % 43,49 olarak bulunmuştur. Gruplar arasında istatistiksel fark ( $p>0,05$ ) olmamasına karşın en yüksek kuluçka oranı % 45,42 ile taze spermadan (III. grup) elde edilmiştir. Gruplar arasında en düşük (% 38,73) ve en yüksek (% 48,17) kuluçka oranı doğal döllenmiş yumurtadan elde edilmiştir. Alınan en yüksek ve en düşük kuluçka oranının doğal döllenmiş yumurtalardan alınmasının nedeni döllenme zamanının tam olarak (1 – 3 saat önce) ortaya konulamaması olduğu düşünülmektedir.

Barbato ve ark. (1998) çipurada dondurulmuş sperma ile yaptıkları fertilizasyon deneylerinde kuluçka oranını % 13,6 - % 58,6 olarak bildirmişlerdir. Araştırmada 10 grup arasında en yüksek oranlar (% 44,4 – 58,6), en az işleme tabi tutulan, yumurta - spermatozoon temas süresi 5 dk olan gruplardan elde edilmiştir. Spermatozoon – yumurta temas süresi 5 dk'dan 10 dk'ya çıkarıldığı zaman döllenme oranında önemli oranda düşüş gözlemlendiği ve istatistiksel olarak önemli ( $p<0,05$ ) olduğu saptanmıştır. Yumurtalar üzerine uygulanan işlemler (kontrol-manipulasyon) yalnızca  $p<0,075$  düzeyinde önemli olduğu belirtilmiştir.

Yapılan araştırmada, Barbato ve ark. (1998)'in 8 grupta elde ettiği kuluçka oranında yüksek, bir gruptan düşük (% 58,6) ve bir grupta benzer (% 44,4) değerler elde edilmiştir. Aynı araştırmacılar yumurta - spermatozoon temas süresini artırılmasının kuluçka oranında önemli düşüşlere neden olduğu bildirmişlerdir. Bunun nedeni ise, DMSO'nun (%15) yumurta üzerine yaptığı toksik etkiden kaynaklandığı rapor edilmiştir. Kuluçka sırasında en az işlem gören (1 kez), 10 dk'lık temas süresine sahip gruptan alınan kuluçka oranı % 17 – 22, kuluçka sırasında 2 kez işlem

gören, 10 dk'lık temas süresinde alınan kuluçka oranı % 22,3 – 33,8 bulunmuştur. Fertilizasyon sonrası ve kuluçka sırasında yumurtalara uygulanan işlemlerin kuluçka oranının düşürebileceğinin belirtilmesine karşın, yapılan çalışmada belirtilenin aksine de sonuçlar rapor edilmiştir. Alınan bu sonuçların nedeni yumurta sayılarının az olması ( $165 \pm 6$  adet) ve kullanılan yumurtaların kalitesinin gruplar arasında fark oluşturmuş olabileceği düşünülmektedir. Yapılan bu araştırmada elde edilen değerler ile Barbato ve ark. (1998)'nın elde ettiği değerler arasındaki farkların nedeni ise damızlık dişilerin yaşı, yumurtaların alınma şekli, yumurta kalitesi, aktivasyon için kullanılan solusyonlar (deniz suyu) ve bu solusyonların miktarlarından kaynaklabileceği düşünülmektedir. Ayrıca araştırmalarda kullanılan sulandırıcı ve kriyoprotektan oranlarının farklı olması da elde edilen sonuçlara etki ettiği düşünülmektedir.

Yapılan araştırmada elde edilen kuluçka oranları, Cabrita ve ark. (2005a)'nın taze ve dondurulmuş spermadan elde ettiği fertilizasyon oranlarına göre (sırasıyla % 77 , %75) daha düşük (sırasıyla %45 ve % 43) bulunmuştur. Oluşan bu farkın önemli nedeni ise Cabrita ve ark. (2005a)'nın yaptığı çalışmada kuluçka oranı yerine fertilizasyon oranının verilmesi olduğu düşünülmektedir. Diğer önemli bir etken ise aynı araştırmacıların 2000 (2 gr) yumurtayı 1 : 6 oranında sulandırılan 350 µl dondurulmuş sperma ile tohumlaması dikkate alınmalıdır. Yüksek hacimli sperma ile daha az yumurtada yapılan kuru fertilizasyon tekniğinde daha fazla miktarda spermatozoon'un daha çok yumurtaya temas etmesinin fertilizasyon oranına olumlu yönde önemli etki yaptığı düşünülmektedir. Ayrıca kullanılan sulandırıcıların ve kriyoprotektan oranların (% 1 NaCl, %5 DMSO) farklı olması da fertilizasyonda önemli etki yaratmış olabilir. Her iki çalışmada da taze sperma ile daha yüksek fertilizasyon (veya kuluçka) oranı tespit edilmesine karşın oluşan fark istatistiki olarak önemli olmamıştır.

Yanagimachi ve Kanoh (1953) ringa balığı spermatozoonlarının deniz suyunda motilitelerinin zayıf olduğunu, mikropil bölgesindeki koriyon zararına temas ettiğinde aktivenin arttığını ve birer birer mikropilden girdiklerini bununda  $Ca^{2+}$

iyonuna bağı olan kemotaksisin etkili olduğunu bildirmişlerdir. Suziki (1958) bazı balık türlerinde spermatozoonların mikropil bölgesinde toplandığını ve aktive olduğunu bildirmiştir.

Galli ve ark. (2009) çipurada yaptıkları fertilizasyon çalışmasında, taze sperma ve dondurulmuş spermayı, toplam motil spermatoozon sayısına göre 2 gruba ayırmışlar ve her grupta ortalama 150 yumurta olacak şekilde toplam 4 grupta çalışma gerçekleştirmişlerdir. Taze sperma ile  $2,6 \times 10^5$  spz/yumurta olan grupta % 38,9,  $1,6 \times 10^5$  spz/yumurta olan gruptan % 29,3, dondurulmuş sperma ile  $2,6 \times 10^5$  spz/yumurta olan grupta % 22,6,  $1,6 \times 10^5$  spz/yumurta olan gruptan % 40 fertilizasyon oranı elde edilmiştir. Sonuçta fertilizasyonda elde edilen değerlerin spermanın taze veya dondurulmuş olmasına ve toplam motil spermatoozon sayısına bağı olmadığını belirtmişlerdir. Yapılan bu araştırma, Galli ve ark. (2009)'nın yaptıkları çalışmada öne sürdüğü görüşleri destekler nitelikte olmuştur. Araştırmada, 1 : 3 oranında sulandırılan ve taze sperma ile aynı miktarda (10 µl) kullanılan spermanın (II. grup) kuluçka başarısının, taze sperma ile çok benzer olduğu ortaya konmuştur.

Yapılan ön çalışmalarda, taze spermanın 1 : 3 oranında inaktivasyon solusyonu ile sulandırılmasının ardından in vitro değerlendirmeleri yapılmıştır. Sulandırılan taze spermanın aktivasyon solusyonu ile aktive edilmesinin ardından (3 - 5 dk) motiltesinin taze spermaya oranla düşük olduğu gözlenmiştir. İnaktivasyon solusyonu ile sulandırılan sperma, aktivasyon sonrası % 80 motilitede kalmasına rağmen, fertilizasyonda taze sperma ile aynı fertilizasyon oranını verebilmiştir. Bu durum çipurada, toplam motil spermatozoonun  $3 - 5 \times 10^3$  /yumurta olmasının fertilizasyon için yeterli olabileceği anlamını taşımaktadır.

İşletmelerde rutin olarak kullanılan kollektör sistemi ile çipura yumurtalarından % 80 – 90 kuluçka başarısı elde edilmektedir. Çipura yumurtalarının kollektörlere gelebilmeleri için pelajik (yüzer) olmaları yanı sıra, 15 – 25 tonluk tanklarda yüzeye çıkmak için gereken süre de kalitesiz yumurtaların muhtemel eleminasyonunda

etkili olduğu düşünölmektedir. Kollektörelere gelen yumurtalar, bu bölümde 10 – 20 saat inkübe edilmelerin ardından inkübatörlerle aktarılmaktadır. Bu aşamada kollektörlerde dipe çöken yumurtalar tekrar elemine edilmektedir. Bu aşamalar geçildikten sonra kapalı veya açık kuluçka sistemlerinde kuluçka başarısı % 80 – 90 olmaktadır. Bu çalışmada elde edilen kuluçka oranlarının işletmelerin elde ettiğı kuluçka oranlarından oldukça farklı olduğı tespit edilmiştir. Bu farkın çok yüksek olmasının nedeni ise, öncelikle kalitesiz yumurtaların (döllenmemiş ve atrezik) elenmesi ve sadece oogenezi tamamlamış dişilerin yumurta bırakması olarak düşünölmektedir. Elde edilen kuluçka oranında yine çevresel etkenlerinde (suyu sıcaklığı ve sıcaklık değişimi, suyun pH'sı, çözünmüş oksijen değeri, tuzluluk, kompozisyonu ve ışık) önemli etkisi olduğı dikkate alınmalıdır. Diğer bir önemli etken ise olan anaçların beslenmesi ve besin farklılıklarıdır.

Yumurtlama öncesinde anaçlara verilen yemler % 50 - 55 proteine ve % 10 - 15 deniz orijinli canlıların yağlarından oluşan içeriğe sahip olmalıdır. Yağlar en az % 5 n - 3 HUFA (Highly Unsaturated Fatty Acid) içermeli ve temel olarak 22 : 6n - 3 (DHA, Docosahexaenoic Asit) tipinde olmalıdır. Bu durum yumurta kalitesini doğrudan etkiler. Çoklu doymamış yağ asitlerinin temel rolü ise, steroidegenesis ve oosit olgunlaşmasında önemli role sahip prostaglandinin (PGs) metabolik öncüsü olmasıdır (Zohar ve ark., 1995).

Çipura yumurtaları olgunlaşmalarını tamamlamalarının ardından suya bırakılmaları ile hidrolizasyona (su alıp şişmesi) uğramaları ve bunun sonucunda yumurta çapının 1100 µ kadar arttığı bildirilmiştir (Modig ve ark., 2008). Yapılan çalışmada, alınan yumurtalar ister döllenmiş ve canlı olsun ister döllenmemiş ve atrezik olsun yumurta çapı 940 - 1000 µ arası bulunmuştur. Bu sonucun kuluçka başarısının düşük çıkmasında etkili olduğı düşünölmektedir. Yine kuluçka çıkış oranının düşük olmasının diğer bir nedeni sağım sırasında yumurtaların zarar görmüş olabileceğidir. Buna paralel olarak, Atay ve Bekcan (2000) da benzer şekilde yumurtaların sağım sırasında zarar görebileceğini bildirmişlerdir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Diğer bir çok hayvan türünde olduğu balık yetiştiriciliğinde de erkek damızlıkların bakım beslemesi, yetiştirici açısından ekonomik masraf yanında işi gücü kaybına neden olmaktadır. Çipurada damızlık tanklarında bulundurulmuş dişi : erkek oranının düşük tutulması (sırasıyla 3 : 2 veya 5 : 2) ekonomik masrafları azaltacağı bilinmektedir. Erkek oranının düşük tutulmasının dölleriminde azalmaya neden olmaması için suni tohumlama yapılması gerekmektedir. Bir çok erkek balık bir dişinin yumurtaları üzerine spermasının tümünü bırakabilmektedir. Bu nedenle dış döllenme gözlenen balık türlerinde sperma önemli miktarlarda boşa harcanmaktadır. Bunun yanında fotoperiyot, sıcaklık ve benzeri ekonomik külfet getiren senkronizasyon çalışmalarının sadece dişilerde uygulayabilmesi için spermanın saklamasını zorunlu hale getirmektedir.

Spermanın uzun süreli saklanması (kriyoprezervasyon) diğer canlılarda olduğu gibi balıklarda da önemli avantajlar sağlamaktadır. Dondurulmuş sperma kullanılmasının yaygınlaştırılması ve döllerimi elde edilmesi ülke ekonomisi yanı sıra yetiştiricilikle uğraşan işletmelere de önemli getiri sağlayacağı düşünülmektedir. Buna göre sperma dondurulmadan önce, çipura balığının başlıca spermatolojik özellikleri belirlenmiştir. Damızlık çipura erkeklerinden abdominal masaj yöntemiyle alınan sperma miktarı  $6,77 \pm 1,25$  ml; spermatozoa motilitesi  $\% 90,5 \pm 1,20$ ; spermatozoa yoğunluğu  $21,55 \pm 2,29 \times 10^9$  ve sperma pH'sı  $7,3 \pm 0,05$  olarak tespit edilmiştir.

Spermanın dondurulması için öncelikle uygun sulandırıcıya, uygun kriyoprotektan eklenmesinin ardından alıştırma safhası uygulanmadan 0,25 ml'lik payetlerde sıvı azot buharında ( $-100, -120$  °C) 10 dk'da dondurulmuş ve sıvı azot içerisinde ( $-196$  °C) saklanmıştır. Spermanın dondurulmasında öncelikle 4 farklı sulandırıcı arasında sulandırıcı seçimi yapılmıştır (Deney 1). Sulandırıcı I (Mounib Mediyumu), Sulandırıcı II (Tuzlu Mounib Mediyumu), Sulandırıcı III (Ringer

Solusyonu), Sulandırıcı IV (%1'lik Deniz Suyu)'dan oluşan sulandırıcıların çözüm sonrası motiliteleri sırasıyla % 66,75  $\pm$ 1,18, % 10,75  $\pm$ 0,75, % 68,25  $\pm$ 1,97, % 50,75  $\pm$ 0,75 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada Ringer solusyonu, Mounib sulandırıcısından istatistiksel olarak farklı olmamasına karşın rakamsal olarak en yüksek motiliteyi verdiği için çipura spermasının dondurulmasında en uygun sulandırıcı olarak seçilmiştir. Çalışmanın sonucunda Ringer, Mounib ve % 1 NaCl sulandırıcıları başarılı, tuzlu Mounib sulandırıcısı başarısız bulunmuştur.

Çalışmada çipura sperması için en iyi sulandırıcı seçiminden sonra, % 10 DMSO, % 10 EG ve % 10 DMA arasından hangisinin çipura sperması için en uygun kriyoprotektan olduğu tespit edilmiştir (Deney 2). Sonuçta % 10 DMSO (% 61,66)'nın diğerlerine oranla (sırasıyla % 42,66, %23,33) iyi çözüm sonu motilite verdiği tespit edilmiştir. Kriyoprotektanların %10'luk oranları ile alınan bu sonuçlara göre sadece DMSO'nun kriyoprotektif etkinliğinin yeterli olduğu tespit edilmiştir.

Dondurulmuş spermanın çözündürülmesinde ise iki farklı sıcaklık ve süre uygulanmış ve 35 °C'de 15 sn'de çözündürülen sperma (%69  $\pm$ 0,57), 26 °C'de 20 sn'de çözündürülen spermaya (%67  $\pm$ 1,22) göre daha iyi sonuçlar vermiştir (Deney 3). Fakat elde edilen fark anlamlı bulunmamıştır.

Çalışmanın sonunda taze ve dondurulmuş sperma ile elde edilen dölverimi araştırılmıştır. Sonuçta dondurulmuş sperma (% 43,48 ) ve kontrol grupları olan sulandırılmış (1 : 3) taze sperma (% 44,57), sulandırılmamış taze sperma (% 45,42) ve doğal döllenmiş yumurtaların (% 43,49) kuluçkadan çıkma oranları arasında anlamlı farklılık oluşmamıştır. Elde edilen kuluçka başarısı, çipurada fertilizasyon veya dölverimi üzerine yapılan araştırmaların çoğu ile benzerlik göstermektedir.

Yapılan çalışma, çipura spermasının başlıca spermatolojik özelliklerinin belirlenmesi, spermanın uygun sulandırıcı, uygun kriyoprotektan, uygun çözündürme sıcaklıklarının tespiti ve son olarak dondurulmuş sperma ile dölverimi elde edilmesi

anlamında ülkemizde bir ilktir. Yurtdışında dahi özellikle çipura spermasının spermatolojik özelliklerinin ortaya konulmasındaki literatür bilgi oldukça sınırlıdır. Çipura spermanın dondurulmasında en iyi sulandırıcı, en iyi kriyoprotektan, en iyi soğutma oranı, en iyi çözündürme sıcaklığı ve süresi gibi çalışmalarında oldukça sınırlı sayıda olduğu görülmektedir. Yapılan çalışmanın, çipura spermasının dondurulması ve suni tohumlamada kullanılması için ideal prosedürün belirlenmesinde yardımcı olacağı ve diğer çalışmalara ışık tutacağı dikkate alınmalıdır.

Çipura spermasının dondurulmasında ideal prosedürü belirlemek için, farklı kriyoprotektanları değişik konsantrasyonlarda denemek, dondurulmasında soğutma oranları ile ilgili araştırmaların yapılması, çözündürme sıcaklığı ve süresinin araştırılması, çözündürülmesinin ardından ne kadar süre içerisinde kullanılması gerektiği ve spermatozoa canlılık süresinin tespit edilmesi gibi farklı konularda ek araştırmaların yapılması gerekmektedir.

Bunlara ek olarak, suni tohumlamada kullanılması sırasında gametlerin temas sürelerinin (2 - 5 dk) araştırılması, tohumlamada aktivasyon için kullanılan deniz suyunun özellikleri (‰ 30 – 38 tuzluluk), yumurtaya oranı (1 : 1 – 1 : 5) ve inkübatöre aktarılmadan önceki geçmesi gereken sürelerin (2 - 10 dk) araştırılması önerilmektedir.

## ÖZET

### Çipura Balığı (*Sparus aurata* L. 1758) Spermasının Başlıca Spermatolojik Özelliklerinin Saptanması, Dondurulması ve Dölverimi

Bu araştırmada, büyük ekonomik öneme sahip ve yetiştiriciliği yapılan çipura balığının bazı spermatolojik özelliklerinin saptanması, spermasının dondurulması ve dondurulmuş spermanın suni tohumlamadaki başarısının belirlenmesi ve elde edilecek sonuçlar çerçevesinde çipura balığı yetiştiriciliğinde daha ekonomik ve verimli üretimin sağlanması için temel oluşturması amaçlanmıştır.

Araştırmada damızlık nitelikli balıklar arasından rastgele seçilen 10 erkek, 4 dişi çipura kullanılmıştır. Erkeklerden abdominal masaj yöntemi ile sağılan spermada; renk, miktar, motilite, yoğunluk ve pH belirlenmiştir. Çipura balığı sperması süt beyaz- açık krem renginde, sperma miktarı  $6,77 \pm 1,25$  ml, spermatozoa motilitesi  $\% 90,5 \pm 1,20$ , spermatozoa yoğunluğu  $21,55 \pm 2,29 \times 10^9$  spz/ml ve pH değeri  $7,3 \pm 0,05$  olarak belirlenmiştir.

Dondurulmak üzere alınan spermalar uygun sulandırıcıya, uygun kriyoprotektan eklenmesinin ardından 0,25 ml'lik payetlere çekilmiştir. Alışım safhası uygulanmadan payetler sıvı azot buharında sıvı azot seviyesinin 4- 6 cm üzerinde 10 dk'da dondurulmuş ve sıvı azot içerisinde saklanmıştır. Spermanın dondurulmasında öncelikle 4 farklı sulandırıcı (+% 10 DMSO) kullanılmıştır (Deney 1). Mounib mediyumu, tuzlu Mounib mediyumu, Ringer solusyonu, %1'lik deniz suyu'dan oluşan sulandırıcıların çözüm sonrası motiliteleri sırasıyla  $\% 66,75 \pm 1,18$ ,  $\% 10,75 \pm 0,75$ ,  $\% 68,25 \pm 1,97$ ,  $\% 50,75 \pm 0,75$  olarak bulunmuştur. Bu deneyde çipura sperması için en iyi sulandırıcılar olarak tespit edilen Ringer ve Mounib sulandırıcıları arasında istatistiki fark ( $p > 0,05$ ) bulunmamıştır. Ringer solusyonu rakamsal olarak daha iyi sonuç verdiği için çalışmanın ana sulandırıcısı olarak seçilmiştir.

Daha sonra en uygun kriyoprotektanı belirlemek amacıyla Ringer sulandırıcısına %10 DMSO, %10 EG, %10 DMA katılmıştır (Deney 2). Kriyoprotektanların etkililiğinin araştırıldığı bu deneyde elde edilen çözüm sonu motilite değerleri sırasıyla  $\% 61,66$ ,  $\% 42,66$ ,  $\% 23,33$  olarak tespit edilmiştir. Kriyoprotektanlar arasındaki fark istatistiki ( $p < 0,05$ ) olarak önemli bulunmuştur.

Spermanın dondurulmasının ardından payetlerin çözdürülmesi için  $35^\circ\text{C}$ 'de 15 sn'de ve  $26^\circ\text{C}$ 'de 20 sn'de olarak iki şekilde uygulanmıştır (Deney 3). Çözdürme sıcaklıklarından sırasıyla  $\% 69 \pm 0,57$  ve  $\% 67 \pm 1,22$  motilite alınmıştır. Çözdürme sıcaklıkları arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ).

Çalışmanın sonunda taze sperma, sulandırılmış taze sperma ve dondurulmuş sperma ile 5g (yaklaşık 5000-6000 adet) yumurtadan elde edilen dölverimi sonuçları değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, dondurulmuş sperma ve kontrol grupları olan sulandırılmış taze sperma, sulandırılmamış taze sperma ve doğal döllenen yumurtaların kuluçkadan çıkma oranları arasında anlamlı farklılık oluşmamıştır. Dondurulmuş sperma ile  $\% 43,48$ , kontrol gruplarından ise sırasıyla  $\% 44,57$ ,  $\% 45,42$ ,  $\% 43,49$  kuluçka başarı elde edilmiştir. Dondurulmuş sperma,  $1 - 1,5 \times 10^4$  spz/yumurta oranında kullanıldığı zaman taze sperma ile aynı dölverimi oranına sahip olduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar sözcükler:** Çipura (*Sparus aurata*) , Spermatolojik özellikler, Sperma Dondurma, Dölverimi

## SUMMARY

### **Determination of Principal Spermatological Parameters, Cryopreservation and Fertility of Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata* L. 1758) Semen**

The objective of this study is the determination of principal spermatological parameters, sperm cryopreservation and determining the fertilization potential of gilthead sea bream's frozen semen which has a great economical potential in aquaculture and after all using these results on feasible mass production of this subspecies..

In this study, 10 male and 4 female randomly selected broodstock gilthead sea bream were used. Semen was collected by hand stripping method. Some spermatological properties such as color, semen volume, motility, concentration and pH were determined. The color of semen was light cream-white, semen volume, spermatozoa motility, spermatozoa concentration and pH have been determined as  $6,77 \pm 1,25$  ml,  $\% 90,5 \pm 1,20$ ,  $21,55 \pm 2,29 \times 10^9$  spz/ml, and  $7,3 \pm 0,05$  respectively.

Before the cryopreservation the semen was diluted with suitable extender and cryoprotectant and then packaged in 0,25ml straws. The straws were frozen above 4- 6 cm from liquid nitrogen level for 10 min and stored in liquid nitrogen. On first experiment 4 different types of extender (+ %10 DMSO) are used for freezing the sperm. The extenders were Mounib medium, Mounib medium with NaCl, Ringer solution, %1 NaCl gave  $\% 66,75 \pm 1,18$ ,  $\% 10,75 \pm 0,75$ ,  $\% 68,25 \pm 1,97$ ,  $\% 50,75 \pm 0,75$  motility respectively. In this experiment, Ringer and Mounib were found as best extenders for the gilthead sea bream sperm and difference of these extenders were not significant ( $p > 0,05$ ). Due to getting better numerical results with Ringer Solution, it was selected as main extender of the study.

After that, for determination of the suitable cryoprotectant % 10 DMSO, % 10 EG, %10 DMA was added to Ringer solution and gave  $\% 61,66$ ,  $\% 42,66$ ,  $\% 23,33$  postthaw motility respectively (experiment 2). Difference between these cryoprotectant was significant ( $p < 0,05$ ).

Frozen sperm was thawed in water in two ways ( $35^\circ\text{C}$  15 s and  $26^\circ\text{C}$  20 s) and they gave  $\% 69 \pm 0,57$ ,  $\% 67 \pm 1,22$  motility (experiment 3). Difference between these thawing procedures was not significant ( $p > 0,05$ ).

Artificial insemination with fresh sperm, diluted fresh sperm and frozen sperm were tested on separately 5g (apx. 5000-6000) egg. Hatching rate was  $\% 43,48$  with frozen sperm and control group which were fresh sperm, diluted fresh sperm and naturally inseminated eggs gave  $\% 44,57$ ,  $\% 45,42$ ,  $\% 43,49$  hatching rates respectively. Difference between these groups was not significant ( $p > 0,05$ ). At the  $1 - 1,5 \times 10^4$  spz/egg concentration frozen sperm gave the same hatching rate with fresh semen.

**Key words:** Gilthead sea bream (*Sparus aurata*), Spermatological parameters, Cryopreservation, Fertility

## KAYNAKLAR

- AAS, G.H., REFSTIE, T., GJERDE, B. (1991). Evaluation of milt quality of Atlantic salmon, *Aquaculture*, **95**: 125-132
- AKÇAY, E., TEKİN, N., SEÇER, S. (1995). Balık spermasının preservasyonu. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Dergisi* **12** (3-4): 367-373.
- ALPBAZ A., (2005). Su Ürünleri Yetiştiriciliği, Alp yayınları, Temmuz 2005 s.: 1-245.
- ANDOH, T., MATSUBARA, T., HARUMI, T., YANAGIMACHI R. (2008). The use of poly-L-lysine to facilitate examination of sperm entry into pelagic, non-adhesive fish eggs. *Int. J. Dev. Biol.* **52**: 753-777
- ANOYMOUS (1997). Fish Reproduction; in Compendium of Animal Reproduction, Intervet International B.V.
- ATAY D., BEKCAN S. (2000). Deniz Balıkları ve Üretim Tekniği, Yayın No: 1515, Ders Kitabı: 468. s.: 263-295
- ATAY, D. (1980). Alabalık Üretim Tekniği. Başbakanlık Basımevi. Ankara
- BARBARO, A., FRANCESCON, A., BOZZATO, G., MERLIN, A., BELVEDERE, P., COLOMBO L. (1997). Induction of spawning in gilthead seabream, *Sparus aurata* L., by a long-acting GnRH agonist and its effects on egg quality and daily timing of spawning. *Aquaculture* **154** : 349-359
- BARBARO, A., COLOMBO, L., FRANCESCON, A., BENEDETTI, P., BOZZATO, G., BELVEDERE, P. (1991). Developmental abnormalities in eggs of gilthead seabream, *Sparus aurata* L., following spawning induced with LH-RH analogues. In: Lavens, P., Sorgeloos, P., Jaspers, E., Ollevier, F. (Eds.), Larvi '91. EAS Special Publication, 15, pp. 235-236.
- BARBATO, F., CANESE, S., MORETTI, F., MISITI, S. (1996). Notes on a cryopreservation technique for gilthead sea bream sperm. In: *Proceeding of the Commission C2, Refrigeration and Production, International Symposium Froid et Aquaculture*, p. 21. Bordeaux.
- BARBATO, F., CANESE, S., MORETTI, F., MISITI, S., LACONI, F., RANA K. (1998). Preliminary experiences for cryopresevation of *Sparus aurata* and *Diplodus puntazzo* semen. CIHEAM –Options Mediterraneennes <http://ressources.ciheam.org/om/pdf/c34/98606211.pdf>
- BARNABÉ, G. (1971). Bases biologiques et ecologiques de l'aquaculture. Lavoisier-Tec. Doc. 55 pp.
- BARNABÉ, G., RENE, F. (1972). Reproduction Controlle du Loup *Dicentrarchus labrax* et Production en Masse D'alevins. C.R.Acad Sci, **275**: 2741-2744.
- BENLİ, H.A, BİLECİK, N., ÇOSKUN, F. (1997). Türkiye 1. Su ürünleri Şurası. Türkiye Su Ürünleri Dayanışma Eğitim Araştırma ve Geliştirme Vakfı Yayını 1997. Bölüm: Araştırma ve Eğitim Komisyonu
- BILLARD, R. (1983). Effects of coelomic and seminal fluids and various saline diluent on the fertilizing ability of spermatozoa in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Journal of Reproduction and Fertility* **68**: 77-84.

- BILLARD, R. (1992). Reproduction in Rainbow trout : sex differentiation, dynamicx of gametogenesis, biyogy and preservation of gametes. *Aquaculture*, **100** : 263-298.
- BILLARD, R., (1978). Changes in structure and fertilizing ability of marine and freshwater fish spermatozoa diluted in media of various salinities. *Aquaculture* **14**: 187–198.
- BILLARD, R., COSSON, J., PERCHEC, G., LINHART, O. (1995). Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture*, **124**: 95–112.
- BILLIARD, R., COSSON M.P. (1992). Some problems related to the assesment of sperm motility in freshwater fish. *Journal of Experimantal Zoology* **261**: 122-131.
- BOZKURT, Y. (2004). Aynalı Sazan (Cyprinus Carpio L., 1758) Spermasının Bazı Spermatotolojik Özelliklerinin Belirlenmesi ve Farklı Sulandırıcılar ile Kısa Süreli Saklanması Değerlendirilmesi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Ankara.
- BUTTS, I.A.E, TRIPPEL, E.A, LITVAK M. K. (2009). The effect of sperm to egg ratio and gamete contact time on fertilization success in Atlantic cod *Gordus morhua* L. *Aquaculture* **286**: 89-94.
- BÜYÜKHATİPOĞLU, S., HOLTZ, W. (1984). Sperm output in Rainbow trout (*salmo gairdneri*) effect of age, timing and frequency of stripping and presence of female. *Aquaculture*, **37**: 63-71
- CABRITA, E., ROBLES V., CUÑADO, S., WALLACE, J.C., SARASQUETE, C., HERRÁEZ M.P. (2005a). Evaluation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, sperm quality after cryopreservation in 5ml microtubes. *Criyobiology* **50**: 273-284
- CABRITA, E., ROBLES V., CUÑADO, S., WALLACE, J.C., SARASQUETE, C., HERRÁEZ M.P. (2005b). Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Criyobiology* **50**: 144-153
- CHAMBEYRON, F., ZOHAR, Y. (1990). A diluent for sperm cryopreservation of gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture* **90**: 345–352.
- CHAO N.H., CHEN H.P., LIAO I.C. (1975). Study on cryogeniz preservation of grey mullet sperm. *Aquaculture* **5**: 389-406.
- CHAO, N.H., CHAO, W.C., LIU, K.C., LIAO, I.C., (1986). The biological properties of black porgy *Acanthopagrus schlegeli*. sperm and its cryopreservation. *Proc. Natl. Sci. Counc., Repub. China*, Part B **10**: (2), 145–149.
- CHAUVAUD, L., COSSON, J., SUQUET, M., BILLIARD R. (1995). Sperm motility in turbot, *Scophthalmus maximus*: initiation of movement and changes with time of swimming characteris. *Enviromental Biology of Fishes* **43**: 341-349
- CHEN, S.L., JI, X.S., YU, G.C., TIAN, Y.S., SHA Z.X. (2004). Cryopreservation of sperm from turbot (*Scophthalmus maximus*) and application to large-scale fertilization. *Aquaculture* **236**: 547-556.
- CHERVINSKI, J., CHANIN, Y. (1985). Gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) a candidate for culture in ponds- Laboratory experiments. *Bamidgeh* **37** (2), 42
- CIERESZKO, A., DABROWSKI, K., (1993). Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using spectrophotometric technique. *Aquaculture* **109**: 367– 373.

CLEARWATER, S.J., CRIM, L. W., (1998). Gonadotropin Relasing Hormone – Anologue Treatment Increases Sperm Motility, Seminal Plasma pH and Sperm Production in Yellowtail Flounder *Pleuronectes ferrugineus*. *Fish Physiol. Biochem.*, **19**: 349-357.

ÇELİKKALE, M. S., (1988). Balık Biyolojisi, K.T.Ü. Sürmene Deniz Bilimleri Fak. Yayınları, Fakülte Yayın No: **1**, Trabzon

ÇELİKKALE, M.S. (1991). Balık Biyolojisi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi, Yayın No:**101**, Trabzon.

ÇELİKKALE, M.S. (1994). İç su balıkları ve yetiştiriciliği, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi, Yayın No: **128**, Cilt 1; 2. Baskı Trabzon

ÇEVİK, (2000). Alabalık (gökkuşuğu alabalığı) spermasının dondurulması ve değerlendirilmesi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enst. Doktora Tezi.

ÇOBAN, D., SAKA Ş., FIRAT, K., (2004). Türkiye'deki Çipura (*Sparus aurata* L., 1758) Larva Üretim Tesislerinin Anaç Yönetim Teknikleri. *E.Ü Su Ürünleri Dergisi* Cilt 21, Sayı **(1-2)**: 133-138

DEGRAAF, J.D., KING, W. V., BENTON, C., BERLINSKY, D.L. (2004). Production and stroge of sperm from the black sea bass *Centropitis Striata* L. *Aquaculture Research*, **35**: 1457-1465

DOI M., HOSHINO, T., TAKI Y., OGASAWARA, Y. (1982). Avtivity of the sperm of the bluefin tuna *Thunnus thynnus* under fresh and preserved conditions. *Bulletin of the Japannese Society of Scientific Fisheries* **48**: 495-498.

DREANNO C, COSSON J, SUQUET M, DORANGE G, FAUVEL C, CIBERT C., BILLARD R. (1999a). Effects of osmolality, morphology and intracellular nucleotid content during the movement of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa. *J Reprod Fertil*, **116**:113-125.

DREANNO, C, COSSON, J, SUQUET, M, NAGAHAMA, Y, BILLARD, R. (1999b).Effect of ionic strength on the motility of turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa. In Proceedings of the 6th Int Symp on the Reproductive Physiol of Fish, p.:256 Bergen 600

DREANNO, C., SUQUET, M., QUEMENER, L., COSSON, J., FIERVILLE, F., NORMANT, Y., BILLARD, R. (1997). Cryopreservation of turbot (*Scaphthalmus maximus*) spermatozoa. *Theriogenology* **48**: 589-603.

DROKIN, S.I. (1993). Phospholipid distribution and fatty acid composition of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in sperm of some freshwater and marine species of fish, *Aquat. Living resour.* **6**: 49-56

EMRE, Y., KÜRÜM, V. (1997). Havuz ve kafeslerde Alabalık Yetiştiriciliği Teknikleri.

FABBROCINI, A., LAVADERA, L., RISPOLI, S., SANSONE, G. (2000). Cryopreservation of sea bream (*Sparus aurata*) spermatozoa, *Cryobiology* **40**: 46-53.

FABRE-DOMERQUE, B., (1905). Introduction a l'etude de la pisciculture marine, In "Travail du Laboratoire de Zoolpie Maritime de Concarneau". Vuibert et Nony Ed. Paris, 205-243

FAO (2004), Food and Agriculture Organization of the United Nations. Fisheries Department. Databases and Statistics: <http://www.fao.org/fi/statist/statist.asp>.

FAUVEL C., SAVOYE O., DREANNO C., COSSON J., SUQUET M. (1999). Characteristics of sperm of captive seabass in relation to its fertilization potential. *J Fish Biol*, **54**: 356–369.

FAUVEL, C., SUQUET, M., DREANNO, C., ZONNO, V., MENU, B. (1998). Cryopreservation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa in experimental and production conditions. *Aquat Living Res*, **11**: 387–394.

FIRAT K., VE SAKA S. (2006). Levrek (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) Balığını Biyolojisi ve Yetiştirme Teknikleri. Erişim: [http://www.tarim.gov.tr/arayuz/10/icerik.asp?efl=uretim/su\\_urunleri/su\\_urunleri.htm&curdir=%5Curetim%5Csu\\_urunleri&fl=levrek/levrek.htm](http://www.tarim.gov.tr/arayuz/10/icerik.asp?efl=uretim/su_urunleri/su_urunleri.htm&curdir=%5Curetim%5Csu_urunleri&fl=levrek/levrek.htm) Erişim Tarihi: 25.12.2006

FISHBASE (2009). Sparus aurata Gilthead Seabream. Erişim: <http://www.fishbase.org/Summary/speciesSummary.php?ID=1164&genusname=Sparus&speciesname=aurata> Erişim Tarihi: 10.02.2009.

FRANCESCON, A., BARBARA, A., COLOMBO, L., BOZZATO, G., CHIEREGHIN, S., BELVEDERE, P. (1994). Induction of multiple spawning in the gilthead seabream, *Sparus aurata* L., by LH-RH analogue treatments and their influence on egg quality. *Riv. Ital. Acquacol.* **29**: 109-120.

GALLI, A., ALEANDRI, R., BORNAGHI, V., BALDUZZI, D. (2009). Production and use of frozen sperm in aquaculture. Istituto Sperimentale Italiano, Milan. Erişim: <http://www.istitutospallanzani.it/doc/138.pdf> Erişim tarihi: 05.02.2009

HAFFRAY, P., BRUANT, J., FACQUEUR J., FOSTIER A. (2005). Gonad development, growth, survival and quality traits in triploids of the protandrous hermaphrodite gilthead seabream *Sparus aurata* *Aquaculture* **247**: 107– 117.

HATİPOĞLU, (2007). Abant alabalığında (*salmo turtta abanticus*) bazı reproduktif özelliklerin saptanması, spermanın kısa süreli saklanması ve dölverimi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enst. Doktora Tezi.

HOLTZ, W. (1993). Cryopreservation of rainbow trout sperm practical recommendations. *Aquaculture*, **110**: 97-100.

JAMIESON B.G.M. (1991). Fish evolution and systematics: Evidence from spermatozoa. Cambridge University Press. Cambridge. pp 1-319.

KAMACI, O.H. (1998). Çipura (*S. aurata*) Yumurtalarının Farklı Yoğunluklarda ve Değişik Göz Açıklığına Sahip İnkübatörlerde Stoklamasının Fizyolojik Gelişim ile Yaşama Yüzdesine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi E.Ü Fen Bil. Ens

KIME, D.E., VAN LOOK, K.J.W., MCALLISTER, B.G., HUYSKENS, G., RURANGWA, E., OLLEVIER, F. (2001). Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, Part C **130**: 425–433.

KOLDRAS, M., BIENIARZ, K., KIME, D.E. (1990). Sperm production and steroidogenesis in testis of the common carp, *Cyprinus carpio* L., at different stages of maturation, *Journal of Fish Biology*, **37**: 635-645.

LAHNSTEINER F. and PATZNER R.A. (1995). Fine structure of spermatozoa of two marine teleost fishes, the red mullet, *Mullus barbatus* (Mullidae) and the white sea bream, *Diplodus sargus* (Sparidae). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **27**: 259-266.

LIU, Q., LI, J., ZHANG, S., XU, F. VE DING, F., XIAO, Z., XU, S. (2006). An efficient methodology for cryopreservation of spermatazoa of red seabream, *Pargus major*, with 2-ml cryovials. *Journal of the World Aquaculture Society* Vol 37, No:3

LOIR, M. (1990). Interstitial cells from the testis of the trout in vivo and in primary culture. *Cell and Tissue Research*, **261**: 133-144

MAISSE G., LABBÉ, C., OGIER DE BAUNLY B., LEVERONI. S., HAFFRAY P. (1998). Cryoconservation du sperme et des embryons de poissons. *INRA Productions Animales* **11**: 57-65

MARICCHIOLO G., GENOVESE L., LAURÀ R., MICALÉ, V., MUGLIA U., (2007). Fine structure of spermatozoa in the gilthead sea bream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758) (Perciformes, Sparidae) *Histol Histopathol* **22**: 79-83

MATTEI X. (1970). Spermiogenèse comparée des poissons. In: Comparative Spermatology. Baccetti B. (ed). Academic Press. New York. pp. 55-70.

MATTEI X. (1991). Spermatozoon ultrastructure and its systematic implication in fish. *Can. J. Zool.* 69, 3038-3055.

MIYAKI K., NAKANO S., OTHA H., KUROKURA H. (2005). Cryopreservation of kelp grouper *Epinephelus moara* sperm using only a trehalose solution. *Fisheries Science* **71**: 457-458

MODIG, C., RALDU', D., CERDA' J., OLSSON P-E. (2008). Analysis of Vitelline Envelope Synthesis and Composition During Early Oocyte Development in Gilthead Seabream (*Sparus aurata*). *Molecular Reproduction and Development* **75**:1351–1360

MOUNIB M.S. (1978). Cryogenic preservation of fish and mamalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and fertility* **53**:13-18.

OGIER DE BAULNY B. (1997). Cryoconservation du sperme de poissons. Evaluation des Dommages Cellulaires. Amélioration de la technique de congélation. Perméabilité membranaire aux cryoprotectants. Thesis, Rennes.

PAPADAKI, M., PAPADOPOULOU, M., SIGGELAKI, I., MYLONAS, C. C. (2008). Egg ans sperma and quality of sharpnout sea bream (*Diplodus puntazzo*) in captivity *Aquaculture* **276**: 187-197

POLZONETTI, V., CARDINALI M., MOSCONI, G., NATALINI, P., MEIRI, I., CARNEVALI O. (2002). Cyclic ADPR and calcium signaling in sea bream (*Sparus aurata*) egg fertilization. *Molecular Reproduction and Development*. **61**:213-217.

RAINIS, S., MYLONAS, C.C., KYRIAKOU, Y., DIVANACH, P. (2003). Enhancement of spermiation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) at the end of the reproductive season using GnRH $\alpha$  implants. *Aquaculture* **219**: 873–890.

RIDEOUT, R.M., TRIPPEL, E.A., 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.

ROTTMANN, R.W., SHIREMAN, J.V, CHAPMAN F.A., (1991). Hormonal Control of Reproduction in Fish for Induced Spawning Southern Regional Aquaculture Centre (SRAC) Publication No. 424, Instute of Food and Agricultural Services, University of Florida.

ROUXEL, C., SUQUET, M., COSSON, J., SEVERE, A., QUEMENER, L., FAUVEL, C. (2008). Changes in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) sperm quality during the spawning season. *Aquaculture Research* **39**: 434-440.

SAKA, S., ve FIRAT, K. (2006). Çipura (*Sparus aurata* Lin., 1758) Balığının Biyolojisi ve Yetiştirme Teknikleri.

Erişim:[http://www.tarim.gov.tr/arayuz/10/icerik.asp?efl=uretim/su\\_urunleri/su\\_urunleri.htm&curdir=\uretim\su\\_urunleri&fl=cipura/cipura.htm](http://www.tarim.gov.tr/arayuz/10/icerik.asp?efl=uretim/su_urunleri/su_urunleri.htm&curdir=\uretim\su_urunleri&fl=cipura/cipura.htm) Erişim Tarihi:25.12.2006

SAKA, Ş. (1995). Levrek (*D. Labrax*) Larva Yetiştirme Teknolojisinde Tuzluluk Değişimlerinin Üretime Etkileri. Doktora Tezi. E.Ü. Fen Bil. Ens.

SANSONE, G., FABBROCINI, IEROPOLI, S., LANGELLOTTI, A.L., OCCIDENTE, M., MATASSINO, D. (2002). Effects of extender composition, cooling rate, and freezing on the motility of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) spermatozoa after thawing. *Cryobiology* **44**:229-239.

SCHULTZ, R.W., vISCHER, H.F., CAVACO, J.E. B., SANTOS, E.M., TYLER, C.R., GOOS, H. J., BOGERD, J. (2001). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: *Biochemistry and Molecular Biology* Volume 129, Issues **2-3**, June 2001, Pages 407-417.

SEÇER, S. (1998). Su ürünleri ve balık yetiştiriciliği. *Ankara Bölgesi Veteriner Hekim Odası Üretim Dergisi*, **5/6**: 26-42

SORBERA L.A., MYLONAS, C.C., ZANUY S., CARILLO M., ZOHAR Y. (1996). Sustained administration of GnRH increases milt volume without altering sperm counts in the sea bass. *Journal of Experimental Zoology* **276**: 361-368.

SUQUET, M., DORANGE, G., OMNES M.H., NORMANT. Y., LE ROUX, A., FAUVEL, C. (1993). Composition of the seminal fluid and ultrastructure of the spermatozoon of turbot (*Scophthalmus maximus*) *Journal of Fish Biology*, **42**: 509-516

SUQUET, M., DREANNO, C. FAUVEL, C., COSSON, J., BILLARD R. (2000). Cryopreservation of sperm in marine fish, *Aquac. Res.* **31**: 231-243.

SUQUET, M., DREANNO, C., PETTON, B., NORMANT. Y., OMNES, M.H, BILLARD R. (1998). Long-term effect of the cyropreservation of turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa. *Aquatic Living Resources* **11**: 45-48

SUQUET, M., OMNES M.H., NORMANT. Y., FAUVEL. C. (1992). Assessment of sperm concentration and motility in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture*; **101**:177-185.

SUZUKI, R. (1958). Sperm activation and aggregation during fertilization in some fishes. I. Behavior of spermatozoa around the micropyle. *Embryologia* **4**: 93-102.

TEKİN, N. (1994). Spermanın Muayenesi ve Değerlendirilmesi. *Theriogenoloji; Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon Sun'ı Tohumlama Obstetrik ve İnfertilite*. Editör: Erol ALAÇAM s.:59 - 66

TEKİN, N., SEÇER, S., AKÇAY, E., BOZKURT, Y. VE KAYAM, S. (2003). Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen. *Isr.J. Aquacult-Bamid*, **55**: (3) 208-212.

TÜİK (2007). Türkiye İstatistik Kurumu, Su ürünleri İstatistikleri. <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=2010>

- VON SCHALBURG, K.R., WARBY, CM., SHERWOOD, N.M. (1999). Evidence for gonadotropin-releasing hormone peptides in the ovary and testis of rainbow trout. *Biology of Reproduction*, **60**: 1338-1344
- WOYNAROVICH, E, HORVATH, L. (1980). The artificial procreation of warm-water finfishes a manual for extension. FAO Fisheries Technical Paper No: **201**, Rome.
- YANAGIMACHI, R. and KANO, Y. (1953). Manner of sperm entry in the herring egg, with special reference to the role of calcium in fertilization. *J. Fac. Sci.Hokkaido Univ. Ser. 6 (Zool.)* **11**: 487-498.
- ZILLI L, SCHIAVONE R, ZONNO V, ROSSANO R, STORELLI C, VILELLA S, (2005). Effect of cryopreservation on sea bass sperm proteins. *Biology of Reproduction* **72**: 1262-1267.
- ZILLI L., SCHIAVONE, R. , STORELLI C., VILELLA S., (2008). Molecular mechanisms determining sperm motility initiation in two sparids (*Sparus aurata* and *Lithognathus mormyrus*). *The Society for the Study of Reproduction*. DOI:10.1095/biolreprod.108.068296
- ZOHAR, Y., BRETON, B., SAMBRONI, E, FOSTIER, E., TOSKY, M., PAGELSON, G., LIEBOVITZ, D. (1990). Development of homologous radioimmunoassay for a gonadotropin of the gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture*, **88**: 189-204.
- ZOHAR, Y., GORDIN H. (1979). Spawning kinetics in the gilthead seabream, *Sparus aurata* L. After low doses of human chorionic gonadotropin. *Journal of Fish Biology*, **15**: 665-70.
- ZOHAR, Y., HAREL, M., HASSIN, S., TANDLER, A. (1995). Broodstock management and egg and larval quality. Editors: Bromage, R., Roberts, R. Blackwell Science Ltd. Cambridge UK 94-118.
- ZOHAR, Y.;TOSKY, M.; PAGELSON, G.; FINKELMAN, Y. (1989). Induction of Spawning in the Gilthead Sea bream, *Sparus aurata*, using [D-Ala<sup>6</sup>-Pro<sup>9</sup>NET] –LHRH: Comparison with the Use of HCG. *Israel Journal of Aquaculture*, **4**: 105-113.

## ÖZGEÇMİŞ

### I. Bireysel Bilgiler

Adı: Erkut Derviş  
 Soyadı: Özgöray  
 Doğum yeri ve tarihi: Lefkoşa – K.K.T.C. 06/06/1982  
 Uyuşu: Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti  
 Medeni durumu: Bekar  
 Askerlik durumu: Tecilli  
 İletişim adresi ve telefon: Bahçelievler, 45/2 Çankaya Ankara  
 05336124226  
 Paraşüt sokak No:6 Karaoğlanoğlu Girne  
 KKTC – 05338751401

### II. Eğitimi

2005 - 2009 Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dölerme ve Suni  
 Tohumlama Anabilim Dalı Doktora Programı  
 1999 – 2005 Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
 1996 – 1999 Türk Maarif Koleji – KKTC (Lise)  
 1993 – 1996 Bayraktar Türk Maarif Koleji – KKTC (Orta okul)  
 1988 – 1993 Taşkınköy İlkokulu – KKTC (İlkokul)

Yabancı Dil: İngilizce

### III. Ünvanları

Veteriner Hekim (03/2005)

### IV. Mesleki Deneyimi

2002: Veteriner Dairesi (KKTC): Yaz Stajı (7 Hafta)  
 2005: Ankara Bölgesi Veteriner Hekimler Odası: Kanatlı Eti Üretim  
 Tesislerinde HACCP ve Resmi Veteriner Hekim Sertifikası.  
 2007: Veteriner Dairesi (KKTC): Sığırlarda Embriyo Transferi ve Suni  
 Tohumlama Sertifikası.

2007: Veteriner Hekimler Sendikası (KKTC): Akredite Veteriner Hekim -  
İSO 22000 Sertifikası.

#### **V. Üye olduğu Bilimsel Kuruluşlar**

Kıbrıs Türk Veteriner Hekimler Birliği

Reproduksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Derneği

#### **VI. Bilimsel İlgi Alanları**

Köpeklerde Reproduksiyon

Balıklarda Reproduksiyon

##### **Yayınları**

##### **1- Makaleler**

ÖZGÖRAY, E.D., AKÇAY E., (2009). Levrek (*Dicentrarchus labrax* L. 1758) Balıklarında Reproduksiyon. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, 80 (2): 19-24.

ÖZGÖRAY, E.D., AKÇAY E., (2009). Deniz Balıklarında Sperma, Yumurta ve Embriyo Dondurulması. *Lalahan Hay. Arş. Ens. Der.*, (Basımda).

##### **2- Tebliğ ve Posterler**

ÖZGÖRAY, E.D, KULAKSIZ, R., AKÇAY E. (2007). Deniz Balıklarında spermanın alınması, dondurulması ve sun'i tohumlama. IV. Ulusal Reproduksiyon ve Sun'i Tohumlama Bilim Kongresi. Kongre Tebliğ Özetleri Kitaplığı:203-204.

#### **VII. Bilimsel Etkinlikleri**

##### **1- Seminerler**

Çipura (*Sparus aurata* L. 1758) ve Levrek (*Dicentrarchus labrax* L. 1758) Balıklarında Reproduksiyon ve Suni Üretim

Deniz Balıklarında Sperma, Yumurta ve Embriyo Dondurulması