



Fonksiyonel Erkekleştirilmiş  
Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus  
mykiss*) Spermasının Dondurulması,  
Çözdürme Sonrası Motilite ve DNA  
Hasarının İncelenmesi

Su Ürünleri Mühendisliği Ana Bilim Dalı

Doktora Tezi

Mustafa Doğan

ORCID 0000-0002-1882-6930

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Erkan Can

Tez Eş-danışmanı: Doç. Dr. Filiz Kutluyer Kocabaş

Ocak 2023

İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi **Mustafa Doğan** tarafından hazırlanan **Fonksiyonel Erkekleştirilmiş Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Spermmasının Dondurulması, Çözdürme Sonrası Motilite ve DNA Hasarının İncelenmesi** başlıklı bu çalışma tarafımızca okunmuş olup, yapılan savunma sınavı sonucunda kapsam ve nitelik açısından başarılı bulunarak jürimiz tarafından DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

**ONAYLAYANLAR:**

**Tez Danışmanı:** **Prof. Dr. Erkan Can**  
İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi

**Tez Eş-danışmanı:** **Doç. Dr. Filiz Kutluyer Kocabaş**  
Munzur Üniversitesi

**Jüri Üyeleri:**

**Prof. Dr. Tevfik Tansel Tanrıkul**  
İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi

**Prof. Dr. Muammer Kürşat Fırat**  
Ege Üniversitesi

**Prof. Dr. İlker Zeki Kurtoğlu**  
Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi

**Prof. Dr. Cemil Kaya Gökçek**  
Mustafa Kemal Üniversitesi

**Savunma Tarihi: 19.01.2023**

# Yazarlık Beyanı

Ben, **Mustafa Doğan**, başlığı **Fonksiyonel Erkekleştirilmiş Gökkuşağı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Spermalarının Dondurulması, Spermalarının Dondurulması, Çözdürme Sonrası Motilite ve DNA Hasarının İncelenmesi** olan bu tezimin ve tezin içinde sunulan bilgilerin şahsıma ait olduğunu beyan ederim. Ayrıca:

- Bu çalışmanın bütünü veya esası bu üniversitede Doktora derecesi elde etmek üzere çalıştığım süre içinde gerçekleştirilmiştir.
- Daha önce bu tezin herhangi bir kısmı başka bir derece veya yeterlik almak üzere bu üniversiteye veya başka bir kuruma sunulduysa bu açık biçimde ifade edilmiştir.
- Başkalarının yayımlanmış çalışmalarına başvurduğum durumlarda bu çalışmalara açık biçimde atıfta bulundum.
- Başkalarının çalışmalarından alıntıladığımda kaynağı her zaman belirttim. Tezin bu alıntılar dışında kalan kısmı tümüyle benim kendi çalışmamdır.
- Kayda değer yardım aldığım bütün kaynaklara teşekkür ettim.
- Tezde başkalarıyla birlikte gerçekleştirilen çalışmalar varsa onların katkısını ve kendi yaptıklarımı tam olarak açıkladım.

Tarih: 19.01.2023

---

# Fonksiyonel Erkekleştirilmiş Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Spermalarının Dondurulması, Çözdürme Sonrası Motilite ve DNA Hasarının İncelenmesi

## ÖZ

Su ürünleri yetiştiriciliğinde, büyüme performansı açısından tümü dişi Salmonid popülasyonları önemli bir yere sahiptir. Bu çalışmada, cinsiyeti tersine dönüştürülmüş (XX) gökkuşığı alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) spermalarının dondurulması, saklanması ve çözündürme sonrası sperm kalitesine olumlu katkısı olması açısından da farklı sulandırma oranlarında (1:9, 1:15, 1:25) ve farklı dozlarda [0 mM (Kontrol), 1 mM, 2 mM ve 4 mM) antioksidan (N-(2-Merkaptopropionil)-Glisin) madde ana sulandırıcıya [Glukoz (0,3 M), DMSO (%10), yumurta sarısı (%11), Penicilin/Streptomycin (%0,3)] eklenmiştir. Payetler (0,5 ml) 37 °C'de su banyosunda 40 saniye boyunca çözündürülmüştür. Kullanılan antioksidan maddenin kriyoprezervasyon işleminden sonra çözündürülen spermaların motilite, dölleme ve yumurta açılma oranına etkisi belirlenmiş ve DNA hasarı araştırılmıştır. Denemeler sonucunda, N-(2-Merkaptopropionil)-Glisin'in en uygun değerleri; çözüm sonrası hareketlilik (%76,3±3,21), dölleme oranı (%63,33±2,10) ve yumurtadan açılma oranı (%53,33±2,90) için 2 mM konsantrasyon ve 1:25 seyreltme oranı olduğu belirlenirken DNA hasar tespiti sonucunda ise en iyi sonuçların 1:15 seyreltme oranında olduğu ve tüm konsantrasyonların (1 mM, 2 mM ve 4 mM) bir birine yakın olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, N-(2-Merkaptopropionil)-Glisin, kriyoprezervasyon işlemi sırasında verimlilik göstermiştir ve koruyucu ajan olarak kullanılabilir.

**Anahtar Sözcükler:** N-(2-Merkaptopropionil)-Glisin, kriyoprezervasyon, antioksidan, DNA hasarı, sperm, gökkuşığı alabalığı.

# Cryopreservation of Functional Sex-reversed Male Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Sperm Freezing, Motility and DNA Damage After Thawing

## Abstract

In aquaculture, all female Salmonid populations have an important place in terms of growth performance. In this study, in terms of freezing, storage and positive contribution to sperm quality after thawing, semen of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) of sex-reversed (XX) were determined at different dilution ratios (1:9, 1:15, 1:25) and at different doses [0], Mm (Control), 1 mM, 2 mM and 4 mM) antioxidant (N-(2-Mercaptopropionyl)-Glycine) substance to main extender [Glucose (0.3 M), DMSO (10%), egg yolk (11%), Penicillin/Streptomycin (0.3%)] was added. Straws (0.5 ml) were melted in a 37 °C water bath for 40 seconds. The effect of the antioxidant substance used on the motility, fertilization and egg hatching rate of thawed sperm after cryopreservation was determined and DNA damage was investigated. As a result of the trials, the most suitable values of N-(2-Mercaptopropionyl)-Glycine; 2 mM concentration and 1:25 dilution ratio were determined for post-solution motility (76,3%±3,21), fertilization rate (63,33±2,10), and hatching rate (53,33±2,90). As a result of DNA damage detection, it was determined that the best results were at 1:15 dilution ratio and all concentrations (1 mM, 2 mM and 4 mM) were close to each other. As a result, N-(2-Mercaptopropionyl)-Glycine has shown efficiency during the cryopreservation process and can be used as a preservative agent.

**Keywords:** N-(2-Mercaptopropionyl)-Glycine, cryopreservation, antioxidant, DNA damage, sperm, rainbow trout.

*Tez çalışmalarım sırasında desteğini esirgemeyen sevgili aileme, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Sayın Prof. Dr. Barış Atalay USLU'ya ithaf ediyorum.*

# Teşekkür

Tez çalışmalarım sırasında bana destek olan başta sevgili aileme, tez çalışmamın her aşamasında, planlanmasında, protokolün ilerleyişinde, bilgi ve birikimlerini paylaşan saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Erkan CAN'a, tez eş danışmanı Doç. Dr. Filiz KUTLUYER KOCABAŞ'a, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Dekanı Prof. Dr. T. Tansel TANRKUL'a ve tez çalışmamın başından itibaren her zaman destek olan diğer hocalarıma, arazi çalışmalarım da destek olan çalışma arkadaşım Mutlu GÜLEÇ'e sonsuz teşekkür ediyorum.

# İçindekiler

Yazarlık Beyanı .....	ii
Öz.....	iii
Abstract .....	iv
Teşekkür .....	vi
Şekiller Listesi .....	x
Tablolar Listesi .....	xi
Kısaltmalar Listesi .....	xii
Semboller Listesi .....	xiii
<b>1 Giriş .....</b>	<b>1</b>
1.1 Dünya’da ve Türkiye’de Su Ürünleri Yetiştiriciliği.....	1
1.2 Gökkuşuğu Alabalığı Taksonomisi .....	4
1.3 Gökkuşuğu Alabalığı Morfolojisi.....	6
1.4 Gökkuşuğu Alabalığı Yetiştiriciliği.....	6
1.5 Gökkuşuğu Alabalığı Üreme Fizyolojisi .....	7
1.5.1 Erkeklerde Üreme Fizyolojisi .....	8
1.5.2 Dişilerde Üreme Fizyolojisi .....	8
1.5.3 Yumurta Morfolojisi .....	8
1.5.4 Sperm Morfolojisi .....	10
1.6 Alabalık Yetiştiriciliğinde Uygulanan Biyoteknolojik Yöntemler .....	11
1.6.1 Sperm Dondurulması .....	16
1.6.2 Spermin Muhafazası.....	18
1.7 Sperm Dondurmada Kullanılan Kryoprotektanlar .....	19
1.7.1 Yumurta Sarısı.....	20
1.7.2 Dimetil Sülfoksit (DMSO) .....	20
1.7.3 Glikoz.....	21



1.7.4 Gliserol.....	21
1.8 Sperm Dondurmada Antioksidanların Önemi .....	21
1.9 N-(2-Merkaptopropionil)-Glisin (MPG).....	24
1.10 Dondurulmuş Spermin Çözdürülmesi .....	25
1.11 DNA Hasarı .....	27
<b>2 Literatür Özetleri.....</b>	<b>28</b>
<b>3 Materyal ve Metod .....</b>	<b>43</b>
3.1 Denemenin Yapıldığı Yer .....	43
3.2 Hormonlu Yemin Hazırlanması .....	43
3.3 Fonksiyonel Erkek (XX) Balığın Elde Edilmesi .....	45
3.4 Gonadların Çıkarılması .....	46
3.5 Sulandırıcıların Hazırlanması .....	49
3.6 Spermin Payetlere Çekilmesi ve Dondurulması.....	53
3.7 Anaç Sağımı ve Yumurta Alımı .....	55
3.8 DNA Hasar Tespiti.....	61
3.9 İstatiksel Analizler.....	61
<b>4 Sperm, Antioksidan ve DNA Hasarı .....</b>	<b>62</b>
4.1 Spermatolojik Muayene Bulgular .....	62
4.2 N-(2-Merkaptopropionil)-Glisinin Etkileri .....	62
4.3 Dondurulmuş Spermada DNA Hasar Tespiti.....	64
<b>5 Tartışma.....</b>	<b>68</b>
<b>6 Sonuç ve Öneriler .....</b>	<b>75</b>
<b>7 Kaynaklar .....</b>	<b>77</b>
<b>Ekler .....</b>	<b>101</b>
Ek B Tezden Üretilmiş Yayınlar .....	101
<b>Özgeçmiş .....</b>	<b>102</b>

# Şekiller Listesi

Şekil 1.1	Fonksiyonel erkek (XX) gökkuşacağı alabalığı ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )'nin morfolojik görünümü .....	5
Şekil 1.2	Gökkuşacağı alabalığı yumurtası .....	9
Şekil 1.3	Gökkuşacağı alabalığı sperminin genel görünümü ve yapısı .....	10
Şekil 3.1	Denemenin yapıldığı Abalıoğlu Balık ve Gıda Ürünleri A.Ş. Alabalık üretim tesisi görünümü / Fethiye .....	43
Şekil 3.2	Hormonun yeme absorbe edilmesi ve kurutulması .....	44
Şekil 3.3	Fonksiyonel erkek (XX) damızlık gökkuşacağı alabalığı ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ).....	46
Şekil 3.4	Anaç balıkların fenoksietanolde sakinleştirilmesi .....	47
Şekil 3.5	Gonadların çıkarılması.....	48
Şekil 3.6	Gonad kesimi ve spermanın çıkarılması .....	49
Şekil 3.7	Spermin hacmi ve pH'ın ölçülmesi .....	50
Şekil 3.8	Antioksidan tartımı ve sulandırıcın santrifüj edilmesi .....	51
Şekil 3.9	Sperm, antoksidan ve sulandırıcı karışımı .....	52
Şekil 3.10	Sperm ve sulandırıcı karışımının payetlere çekilmesi .....	53
Şekil 3.11	Sperm muhafaza tankına azot ilave edilmesi .....	54
Şekil 3.12	Çözdürme sonrası sperm hareketliliğinin incelenmesi .....	55
Şekil 3.13	Gökkuşacağı alabalığı ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) yumurta sağımı ve çapı ....	56
Şekil 3.14	Spermin çözdürülmesi ve yumurtaların döllenmesi .....	57
Şekil 3.15	Dikey inkübasyon dolabı ve gözlenmiş yumurta .....	58
Şekil 3.16	Yumurtadan yeni çıkmış ve keseli alabalık yavrusu.....	59
Şekil 3.17	Kuluçka dolapları ve yavru ön büyütme tankları .....	60
Şekil 4.1	DNA hasarlarının flörsan mikroskop altında 50 µm boyutunda görüntüleri .....	66

# Tablolar Listesi

Tablo 1.1 Dünya’da ülkelerine göre su ürünleri üretimi (ton).....	2
Tablo 3.1 Denemede kullanılan ticari yemin besin içerişi .....	45
Tablo 4.1 Normal ve fonksiyonel erkek gökkuşuğu alabalığı ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )’nın taze sperm parametreleri.....	62
Tablo 4.2 N-(2-Merkaptopropionil)-Glisin ve farklı sulandırma oranlarının motilite oranı ve süresi üzerindeki etkileri.....	63
Tablo 4.3 N-(2-Merkaptopropionil)-Glisin ve farklı sulandırma oranlarının motilite oranı ve süresi üzerindeki etkileri.....	64
Tablo 4.4 Gruplar arasında hasar durumuna göre DNA hasar değerleri.....	65
Tablo 5.1 Geçmişte yapılan benzer çalışmaların sonuçlarının karşılaştırılması.....	74

# Kısaltmalar Listesi

ml	Mililitre
DMSO	Dimetilsülfoksit
DMA	Dimetil Asetamit
MPG	Merkoptotropionil
mM	Milimolar
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
GSH	İndirgenmiş glutatyon (glisin, sistein, glutamik asit)
Mg	Miligram
DNA	Deoksiribonükleikasit
ATP	Adenosintrifosfat
SP	Seminal Plazma
SSA	Sığır Serum Albümin
BSA	Bovim Serum Albümin
Dk	Dakika
UV	Ultraviyole

# Semboller Listesi

$\alpha$	Alfa
$^{\circ}C$	Sıcaklık birimi
v/v	Hacim/hacim
sn	Saniye
$\mu\text{m}$	Mikrometre
ppm	Parts per million (milyonda 1 birimlik)
K	Potasyum
Ca	Kalsiyum
Mg	Magnezyum
Na	Sodium
Cl	Klorür

# Bölüm 1

## Giriş

### 1.1 Dünya’da ve Türkiye’de Su Ürünleri Yetiştiriciliği

Dünya’da dengeli beslenmeye önem vermiş milletler hayvansal protein kaynaklarını arttırmak ve çeşitlendirmek için besin kaynaklarının arasına su ürünlerini de eklemek adına kaynak sularından ve denizlerden nasıl yararlanacakları konusunda çalışmaktadırlar [1]. Aynı zamanda su ürünleri yetiştiricilik sektörü en hızlı büyüyen gıda sektörü arasındadır. İnsan tüketiminde protein kaynağı olarak su ürünlerine yer verilmesinin yanında, yaş, cinsiyet, eğitim, din, medeni hal gibi sosyodemografik özelliklerin de su ürünleri tüketimi üzerindeki etkileri araştırmalara konu olmuştur [2-3].

Dünya’da ve ülkemizde balık ihtiyacı, deniz ve iç sularda avcılık ve kültür balıkçılığı yolu ile karşılanmaktadır [4]. Sürekli artış gösteren su ürünleri yetiştiriciliğinin 2000 yılında küresel üretime katkısı %25,7 iken, 2016 yılında %46,8’e yükselmiştir. Su ürünleri yetiştiriciliği 1980’ler ve 1990’larda gösterdiği yıllık yüksek büyüme oranlarını artık yakalayamamakla birlikte, 2001-2016 döneminde yıllık %5,8’lik büyüme oranı ile diğer önde gelen gıda üretim sektörlerinden daha hızlı bir büyüme göstermiştir [5].

Su ürünleri üretimi 2018 yılında yaklaşık 178.550.941 ton olarak gerçekleştiği rapor edilmiştir (Tablo 1.1). Bu üretimin yaklaşık 156 milyon tonu doğrudan insan tüketimi olarak değerlendirilirken, geri kalan 22 milyon tonu ise insan tüketimi dışı balık yemi sanayiinde balık yağı ve balık unu olarak değerlendirildiği bildirilmiştir. Toplam üretimin 62.207.599 tonluk bölümü ile yani %35’lik pay ile Çin’in dünyada 1. sırada yer aldığı bildirilmiştir. Diğer bir Asya ülkesi olan Endonezya 2. sırada, Hindistan ise 3. sırada yer almıştır. Su ürünleri avcılık üretiminde dünyada 9. sırada olan Norveç, Avrupa kıtası ülkeleri içinde 3.843.920 ton üretim ile 1. sırada yer almıştır. Bununla birlikte ülkemizde her geçen gün üretim artmasına rağmen istenilen düzeylere

ulaşılamamıştır. Bunun yanında ülkemizde olduğu gibi dünyada da çeşitli nedenlere bağlı olarak kişi başına balık veya diğer su ürünleri tüketimi, gıda açığı bulunan ülkelerde 2019'da kişi başına tüketim 5,4 kg olarak tespit edilirken, orta gelirli ülkelerde 15,2 kg, yüksek gelirli ülkelerde ise 26,5 kg olarak bildirilmiştir [6-7].

Tablo 1.1 Dünya’da ülkelerine göre su ürünleri üretimi (ton)

Ülkeler	2016	2017	2018	2019	2020
Çin	61.605.135	62.198.086	62.207.599	62.242.310	62.846.808
Endonezya	11.495.213	12.307.666	12.668.063	13.455.205	14.140.699
Hindistan	10.876.369	11.711.313	12.386.253	13.253.701	12.151.946
Vietnam	6.648.243	7.136.167	7.481.039	7.871.286	8.022.708
Peru	3.796.978	4.157.414	7.169.817	4.968.902	5.770.371
Rusya	4.759.392	4.864.504	5.108.858	5.211.894	5.342.456
ABD	5.348.349	5.473.700	5.212.754	5.290.541	4.694.411
Bangladeş	3.878.324	4.134.436	4.276.641	4.384.219	4.503.371
Norveç	3.359.975	3.686.996	3.843.920	3.762.245	3.940.977
Japonya	3.876.920	3.821.112	3.773.800	3.762.008	3.751.228
<b>Türkiye</b>	<b>585.657</b>	<b>627.797</b>	<b>625.776</b>	<b>834.662</b>	<b>785.822</b>
Diğer	49.956.110	52.608.231	53.796.421	52.820.072	51.817.746
<b>Dünya</b>	<b>166.186.665</b>	<b>172.727.422</b>	<b>178.550.941</b>	<b>177.857.045</b>	<b>177.768.543</b>

Güncel verilere göre dünyada toplam balıkçılık ve su ürünleri üretimi 214 milyon ton ile geçmiş yılların en yüksek rakamına ulaşmıştır. 2020 yılında 178 milyon ton su ürünleri üretilirken 36 milyon ton ise su bitkileri üretilmiştir. Her ne kadar sektörel büyüme oranı düşük olsa da büyüme devam etmiştir. Burada büyümeyi olumsuz etkileyen başlıca neden tüm dünyada ektili olan coronavirus (COVID-19) etkili olmuştur. Dünyada 2020 yılında kişi başı tüketim ise 20,2 kg/kişi olarak gerçekleşmiştir. 2030 yılında ise tüketimin 21,4 kg/kişi olması beklenmektedir. Aynı zamanda su ürünleri ve balıkçılık üretimi dünyada iyi bir istihdam potansiyeline de sahip olup toplam 58 milyon kişiye iş olanağı sağlamıştır. Çalışanların üretimde dağılımı ise, %35 kültür üretimi tarafında %65'i de avcılık tarafında istihdam edilmektedir. Aynı zamanda toplam çalışanların %21'ini kadınlar oluşturmaktadır [6-8].

Türkiye’de ise son yıllarda her ne kadar kültür balıkçılığı üretimi hızla artsa da balık tüketimi istenilen düzeylerde değildir. Kişi başına balık tüketimi 2016 yılında 5,35

kg/kişi iken 2021 yılında 6,5 kg/kişi olarak bildirilmiştir [9]. Her geçen gün dünya nüfusu hızla arttarken bu artışa paralel olarak nüfusun gerek gıda gerekse gıda dışı ihtiyaçları da hızla artmaktadır. Bu nedenle daha kaliteli ve verimli ürün üretimi için araştırmalar hızla devam etmektedir. Üretim yaparken birim alan, zaman, maliyet göz önünde bulundurularak en uygun üretimi yapmaya çalışılmaktadır. Bu çalışmalar kapsamında balık yetiştiriciliğinde üretimi artırmak için bir çok alanda biyoteknolojik çalışmalar da yapılmaktadır.

Ülkemizde, Tarım ve Orman Bakanlığı'na ait verilerin, Türkiye İstatistik Kurumu tarafından tutulan Su Ürünleri İstatistikleri; 2000 yılından 2017 yılına kadar olan veriler incelendiğinde; 2000'li yıllardan sonra düzenli olarak artış gösterdiği görülmektedir. Bu verilere göre; yakın geçmiş tarih bilgisi olarak 2017 yılında avcılık yolu ile 345.318 ton (322.173 tonu denizel avcılık yolu ile üretim, 32.145 tonu ise iç su avcılık yolu ile üretim) iken yetiştiricilik yolu ile 276.502 ton (172.492 tonu denizel üretim, 104.010 tonu ise iç sulardaki üretimi ifade etmektedir) olup yıllık olarak toplamda avcılık ve yetiştiricilik dâhil 630.820 ton olarak gerçekleşmiştir [10]. Dünya su ürünleri yetiştiriciliğinde, yemlenerek üretimi yapılan (entansif ve yarı entansif) sucul türlerinin üretimi, yemleme yapılmayan (extansif) sucul türleri geride bırakıldığı bildirilmiştir.

Geçen son bir kaç yılda Türkiye'de gerek iç sularda gerek denizel ortamlardaki üretim 2020 yılında önceki yıla göre bir miktar azalış göstermiş olsa da 2021 ve 2022 yıllarında üretimde yeniden artış gözlenmiştir. Son TÜİK verilerine Türkiye'de su ürünleri üretimi 2021 yılında bir önceki yıla göre %2 oranında artarak 799.851 ton olarak gerçekleşmiştir. Dünyada olduğu gibi Türkiye'de de toplam üretimi içerisinde avcılıkla yoluyla elde edilen üretim azalırken, yetiştiricilikle yapılan üretimde artış gözlenmiştir. Avcılıkla elde edilen üretim 2021 yılında bir önceki yıla göre %10 düşüşle, 328.165 ton olmuştur. Yetiştiricilik üretimi ise bir önceki yıla göre %12 oranında artarak 471.686 ton olarak gerçekleşmiştir. Toplam yetiştiricilik miktarı içerisinde alabalık (*Oncorhynchus mykiss*), %35'lik pay ile ilk sırada yer alırken bunu levrek (*Dicentrarchus labrax*) %33 ile ikinci sırada çipura (*Sparus aurata*) ise %28 ile üçüncü sırada yerini almıştır. Su ürünleri üretiminde avcılıktan elde edilen ürün miktarının azalıp, yetiştiricilikten elde edilen ürün miktarının artış göstermesi, küreselanlamda da üretimin doğru yönelimde olduğu belirtilmiştir [11,9].



Yapılan bir çalışma sonuçlarına göre, Türkiye su ürünleri sektörü genel durumu hakkında öngörüle bulunmak ve bir değerlendirme yapabilmek adına, su ürünleri üretim ve dış ticaretinin 2000-2018 yıllarına ait zaman serisi verileri kullanılarak, gelecek 5 yıla (2019-2023) ilişkin öngörüler sunulmuştur. Buna göre su ürünleri avcılık üretiminde azalmaların yaşanmasına karşın yetiştiricilik üretim miktarında artış yaşanacağı muhtemel görülmektedir. Üretilen ürünlerin ise ihracat miktarının artış oranının ithalat miktarına oranla daha yüksek gerçekleşmesi mümkün olabileceği bildirilmiştir. Bunun 2018 yılında %112,9 olan kendine yeterlilik düzeyinin 2023 yılında %119,4'e ulaşması, ithalata bağımlılık düzeyinde ise önemli değişimlerin yaşanmayacağı bildirmişlerdir [10].

Türkiye'de yetiştiriciliği en fazla yapılan balıkların başında salmonidler gelmektedir. Salmonidleri diğer balık gruplarından ayıran en önemli özelliklerinden biri, uzun yıllardır yetiştiriliyor olması ve yetiştiricilikle ilgili birçok araştırma yapılmış olmasıdır [12]. Ülkemizde kültür balıkçılığı 1970'li yıllarda pasifik kökenli gökkuşacağı alabalığı ile başlamış olup halen iç sularda üretimi yapılan balık yetiştiriciliği içinde ön sırada yer almaktadır [13]. Bugün ülkemizim hemen her bölgesinde gökkuşacağı alabalığı yetiştiriciliği görülmektedir. Ülkemizde gökkuşacağı alabalığı dışında ise yerli alabalıklar olarak da bilinen alabalık türleri; karadeniz alabalığı (*Salmo trutta labrax*), dağ alabalığı (*Salmo trutta magrostitigma*), dere alabalığı (*Salmo trutta caspius*), abant alabalığı (*Salmo trutta abanticus*)'dur [14]. Hastalıklara karşı direncinin yüksek olması, elden beslenmeye alışkın olması ve adaptasyon yeteneğinin fazla olması gökkuşacağı alabalığını yetiştiricilik açısından cazip kılmaktadır.

Küresel anlamda düşünülürse su ürünleri dış ticaretinde Türkiye, önde gelen ülkelerden biri olma potansiyeline sahiptir. Bu potansiyele ulaşabilmesi için uluslararası ticarete haksız rekabete yol açmayacak politika araçları ile sektörü desteklemesi ve markalaşma çalışmalarını yapması gerekmektedir. Ayrıca, Türkiye'de düşük olan su ürünleri tüketiminin artırılması için çalışmaların yapılmasının, sektörün büyümesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir [15,10].

## 1.2 Gökkuşacağı Alabalığı Taksonomisi

Toplamda üç alt familyaya ayrılan Salmonidae familyası, Salmoniformes takımının tek familyasıdır. Bu familyalardan Thymallinae 11 tür, Coregoninae 82 tür, Salmonidae ise 109 türden oluşmaktadır [16-17]. Gökkuşacağı alabalığı (*Oncorhynchus*

*mykiss*) ise (Şekil 1.1), bu familyalar içerisinde Salmonidae familyasının üyesi olup, dünyada ve Türkiye’de yaygın olarak yetiştirilen türlerden biridir [17,19].

İlk defa 1836 yılında Colombia ırmağında Richardson tarafından saptanan gökkuşağı alabalığı’na, *Salmo gairdneri* adı verilmiştir [20-22]. 1988 yılında Pasifik alabalığı ve salmonu, Atlantik alabalığı ve salmonundan ayırt edilebilmesi amacıyla *Oncorhynchus* cins adı verilmiş, aynı zamanda Kamchatka alabalığı (*Salmo mykiss*) ile aynı biyolojik tür olduğu kanıtlandığından, tür adı olarak *gairdneri* yerine *mykiss* adının kullanılması Amerika Balıkçılık Derneği Balık İsimleri Komitesi tarafından kabul edilmiştir [22].

- Alem : Vertebrata
- Altalem : Pisces
- Sınıf : Osteichthyes
- Takım : Salmoniformes
- Aile : Salmonidae
- Cins : *Oncorhynchus*
- Tür : *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum,1972)



Şekil 1.1: Fonksiyonel erkek XX gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)’nın morfolojik görünümü

### 1.3 Gökkuşığı Alabalığı Morfolojisi

Gökkuşığı alabalığı lateral olarak yassılaştıran vücut, kısa ve kalın yapıdadır. Ağız yarı elips at nalı görünümündedir. Dil üzerinde, damakta ve çenelerde; sivri, dikene benzeyen ince ve aynı zamanda kuvvetli dişler bulunmaktadır. Deriye gömülmüş vaziyette bulunan ve deriyi örten sikloit şekilli küçük pullara sahiptir. Yanal çizgi balığın yan tarafında boyuna uzanan vücudunun ortasında yer alır. Alabalıkları diğer balıklardan ayıran en önemli yapılardan biri balığın dorsal yüzgeci ile kaudal yüzgecin arasından bulunan adipöz (yağ yüzgeci) bulunmaktadır. Ayrıca sırt ve kuyruk yüzgeçlerinde olmakla beraber başta, vücudun dorsal ve lateral bölgesinde, solungaç kapağı üzerinde fazla sayıda küçük, yuvarlak kahverengi-siyah ve yeşilimsi beneklerde ayırt edici morfolojik özelliklerdendir [23].

Baş kısmının üst tarafı ve arka kısmı mavi-yeşil, çelik mavisine yakındır. Vücudun kenar bölümleri gümüşü, soluk sarı-yeşilden griye dönen bir renktedir. Karın kısmı gümüşü andıran beyaz veya sarıdır. Yine vücut kenarları mavimsi ya da açık pembe bir şerit ile çok sayıda küçük lekeler bulundurmaktadır. Yumurtlama zamanı geldiğinde anaçlarda renk koyulaşır ve yanal çizgi ise belirgin kırmızı renk alır. Renklenme yaşam alanı, boyut ve cinsiyete bağlı olarak farklılıklar göstermektedir. Akarsuda yaşayan ve üreyen gökkuşığı alabalığında daha koyu ve yoğun renklenmeler görülmekle beraber, gölde yaşayanlarında ise daha açık, parlak renkler mevcuttur. Çiftleşme dönemi bazı balıklarda görülen ağız çevresinde tübüller görülmez, fakat üreme döneminde erkeklerde alt çene öne doğru uzaması çok belirgin olmakla beraber baş kısımlarında ufak renk değişiklikleri oluşabilir [24].

Vücudun tam ortasında yer alan yanal çizgi boyunca parlak, gökkuşığı renginde şeritler yer alır ve üreme döneminde bu şeritler erkeklerde daha dikkat çekici olur. Balığın isminin gökkuşığı alabalığı olmasının nedeni, sahip olduğu bu özelliğinden kaynaklanmaktadır [23].

### 1.4 Gökkuşığı Alabalık Yetiştiriciliği

Gökkuşığı alabalığı Pasifik kökenli olup, yaşadığı bölgeden başka bir bölgeye ilk nakli 1874 yılında Mr. S. Green tarafından Kuzey Kaliforniya'daki McCloud nehrinden Kaledonya (New York)'taki özel kuluçkahanesine olmuştur. Yine ilk olarak Kuzey

Amerika dışına transferi ise Mr. J. B. Campbell tarafından 1877 yılında Tokyo'ya götürülmesi ile gerçekleşmiştir. 1885 yılında Buckinghamshire (İngiltere)'de Iver yakınındaki Delaford kuluçkahanesi ve Stirling (İskoçya) yakınındaki Howietown kuluçkahanesine yapılan nakiller Tokyo'ya yapılan nakli takip etmiştir. Kültür ortamında yetiştirmeye alınması, 1912 yılında Norveç'te gerçekleşmiştir. Ülkemizde Gökkuşığı Alabalığı kültürüne başlanması ise 1969 yılında iç sulardaki havuzlarda, 1980'li yılların başında kafeslerde 1990'lı yıllarda da deniz kafeslerinde yapılan faaliyetlerle hayata geçirilmiştir [22].

Gökkuşığı alabalığı üretimi ilk olarak doğadan yakalanan balıklardan yumurta alınması ve daha sonra suni döllenmesi ile başlamıştır. Orijini Amerika olan bu balık 1800'lü yıllarda Avrupa'ya getirilmiş ve dünyanın birçok bölgesine üretim amaçlı taşınmıştır [25]. Türkiye'de alabalık yetiştiriciliği 1970'li yıllarda başlamış bugüne kadar hızla artmıştır. 1990'lı yıllara kadar karada beton ve toprak havuzlarda geleneksel alabalık yetiştiriciliği uygulanmıştır. Aynı zamanda bu yıllardan itibaren yetiştiricilik alanında istihdam edilecek kalifiye personelin de yetiştirilmesi ile üretim hız kazanmıştır [22]. Şu anda ülkemizin hemen her bölgesinde farklı su kaynaklarında (kaynak suları, akarsu, baraj, deniz) yetiştiriciliği yaygınlaşmıştır [26].

Ülkemizde alabalık yetiştiriciliği 1990'lı yıllarda 3000-4000 ton/yıl iken bugün hem iç sularda hem denizlerde üretim yapılabilmekte ve 2021 verilerine göre 136.000 ton/yıl olarak gerçekleşmiştir. 30 yılda 30 kat artmış durumdadır. Yakın gelecekte Tarım ve Orman Bakanlığı'nın desteği ve teşviki ile 250.000 ton/yıl hedeflenmektedir [9].

## 1.5 Gökkuşığı Alabalığı Üreme Fizyolojisi

Bütün canlılarda olduğu gibi balıklar da yaşamlarını devam ettirebilmek ve gelişebilmek için yaşadıkları sucül ortamına adapte etmek zorundadırlar. Doğada varlığını sürdürebilmek adına verilen bu mücadelede neslinin devamı için üreme hayati önem taşımaktadır. Canlılar buldukları ortamda üreme faaliyetlerini gerçekleştirebiliyorlarsa adapte olduklarının en büyük kanıtıdır [20].

Alabalıklar üreme mevsime bağlı olarak etkinlik gösterirler. Bu balıklarda normal üreme yalnızca yılın belirli bir mevsiminde gerçekleşirken günümüzde fotoperiyot

uygulamaları ile yılın hemen her mevsiminde üreme sağlanabilmektedir. Erkek ve dişi balıklarda üreme etkinliğinin, yumurtadan çıktıktan sonra yeterli vücut gelişimine ulaşması, çevresel ve hormonal mekanizmalar ile doğrudan bağlantılıdır. Genellikle erkekler (1,5-2 yaş), dişiler (2-3 yaş)'den daha erken cinsel olgunluğa (puberta) ulaşırlar[27-28].

### 1.5.1 Erkeklerde üreme Fizyolojisi

Spermatozoa, testislerde spermatogenez olarak adlandırılan bir dizi sitolojik aşamaların sonucunda sperm ana hücreleri olan spermatogonialardan oluşmaktadır. Üreme mevsiminde endokrin sistemin harekete geçmesiyle spermatogoniumlar, mitoz yoluyla çoğalıp diferensiyasyon olarak spermatogonia gonositlerini meydana getirmektedirler [27]. Spermatozoa, testisler ve kanal sisteminde hareketsiz durumdadırlar. Ancak su veya ovaryum sıvısı ile temasa geçince hareket kabiliyeti kazanırlar [27-28].

### 1.5.2 Dişilerde Üreme Fizyolojisi

Balıklar yumurtlama dönemine kadar yumurtaların gelişimi hipofiz bezinden salgılanan gonadotropin hormonu ile düzenlenir. Uygun çevresel ve hormonal şartların etkisiyle oluşan impulslar hipotalamusu uyarır. Bu uyarılar sonucunda hipofizden salgılanan gonadotropin hormonları kan yoluyla ovaryumlara ulaşır ve yumurtlama öncesi ovumların olgunlaşmasını sağlar. Gonadotropinlerin ovum üzerindeki etkisi yumurta çekirdeğini mikrofil deliğine yaklaştırır. Bunu ovumun su alarak şişmesi ardından çekirdek zarının kaybolması izler. Kromozomlar görünür ve ilk hücre bölünmesiyle mayoz başlamış olur. Yumurtanın gelişmesine bağlı olarak yumurtayı saran ve yumurtalık duvarına bağlayan folikülün enzimlerle erimesinin ardından ovulasyon şekillenir ve olgunlaşmış yumurta balığın karın boşluğuna düşer. İkinci mayoz spermanın mikrofiliden yumurta içerisine girmesiyle başlar [29-30].

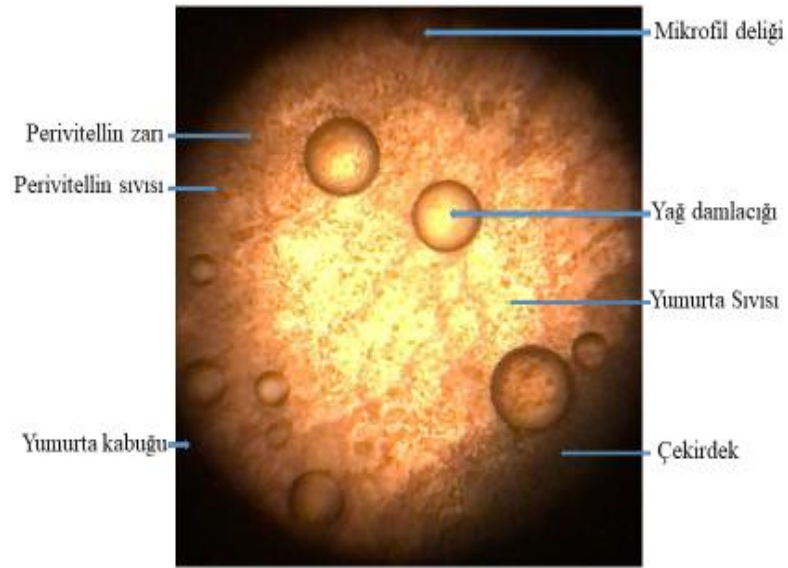
### 1.5.3 Yumurta Morfolojisi

Gerek erkek gerekse dişi balıkların gamet kalitesi yumurta ve yavru balık üretiminde çok önemli bir rol oynamaktadır. Üretimde kaliteli gametlerin kullanılması üretimin

başarı oranını ve verimliliği arttırmaktadır. Balıklarda gamet (yumurta ve sperma) kalitesini belirlemede kullanılan birçok kıstas mevcuttur. Biyolojik olarak gamet kalitesi, spermin motil olması ve dölleyebilme kapasitesi veya yumurtanın döllenebilme ve normal bir embriyoya dönüşebilme yeteneğidir [31].

Döllenmiş yumurta, ikinci mayoz bölünme sonunda oluşan oositir. Bu oosit, oogenetik sürecin son ürünüdür ve sonuçta ovaryumu meydana getirir. Yumurtanın eşgüdümlü birleşimi bazı türler için uzun sürebilmektedir. Bu bağlamda, oogenetik süreçte yumurtanın döllenmesine kadar olan ve döllenebilirlik sonrası normal bir embriyo oluşumuna kadar devam eden süreç çok önemlidir. Bunun yanı sıra yumurta hacminin artmasıyla birlikte oluşan yumurta sarısı proteinlerinin oluşumu üzerinde çalışılmış, [32-33]. Yumurta sarısı proteinlerinin aynı zamanda, mRNA, protein, vitamin, hormonlar gibi birçok bileşen içerdiği tespit edilmiştir.

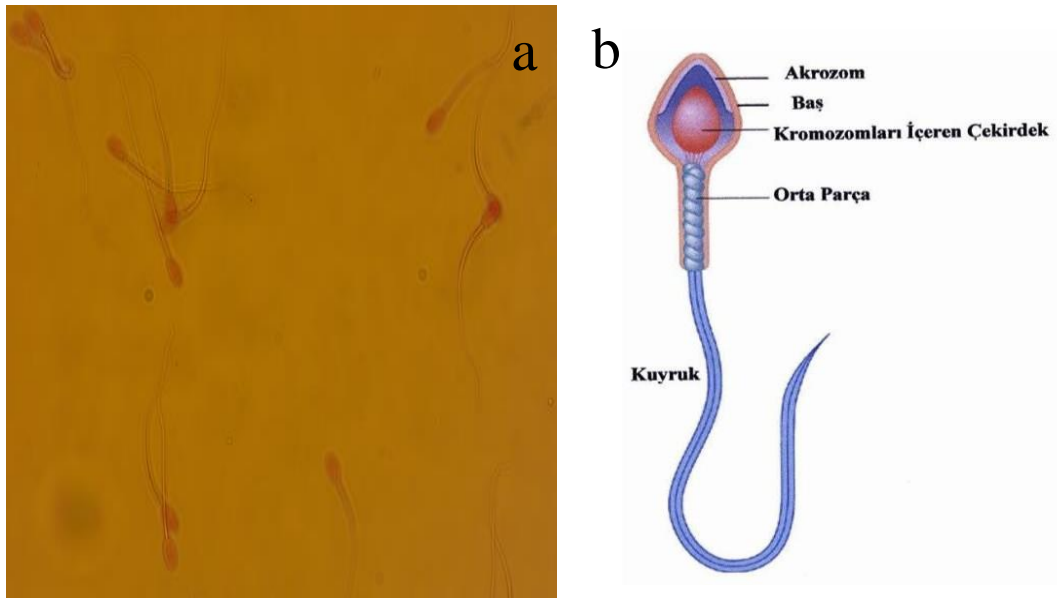
Döllenmemiş yumurtaların hormonal içerikleri hakkındaki bilgiler yeterli düzeyde değildir. Tiroit hormonları [34], cinsiyet steroidleri [35], [36] gibi konularda birden fazla çalışma yapılmıştır. Yumurtanın bileşimindeki hormonal durum ile alakalı çok sayıda çalışma yapılmış fakat yumurtadaki hormonal fonksiyonların işlevleriyle ilgili yapılan çalışmalar yetersiz kalmıştır [37,38].



Şekil 1.2: Gökkuşaağı alabalığı yumurtası

## 1.5.4 Sperm Morfolojisi

İlk defa 1677 yılında Johann Ham tarafından görülen ve spermium adı verilen erkek germ hücresinin baş, orta parça ve kuyruk olmak üzere üç kısımdan oluştuğu saptanmıştır. Baş bölgesi genetik materyalin taşındığı bölüm olup, yumurta ile penetre olduktan sonra akromozom yardımıyla yumurtanın mikrofıl deliğinden içeri girmesi ile döllenme sağlanmış olur. Boyun denilen bölüm ise sperm enerjisi kaynağıdır. Hareket başladıktan sonra yaklaşık 30 sn ile 2 dk kadar hareketli olabilmektedir. Kuyruk bölümü ise sperm yol almasına yardımcı olmaktadır [39,38].



Şekil 1.3: Gökkuşaağı alabalığı spermının genel görünümü ve yapısı (a), (b); [40,38]

Kültüre alınan balık üretimi ve yetiştiriciliğinde en önemli faktörlerin başında yumurta ve sperm gelmektedir. Bu durum göz önünde bulundurulduğunda, yetiştiricilikte ve üretimde kullanılacak damızlık balıkların sperm ve yumurtalarının kalite kriterlerinin bilinmesi ve belirlenmesi büyük önem taşımaktadır [41]. Alabalık üretiminde mevsim dışı yumurta alımı yapılırken dönüştürülmüş erkeklerden çoğu zaman sperm elde edilememektedir. Tamamı dişi veya kısır balık üretimi için cinsiyeti dönüştürülmüş erkek spermi kullanılması gerekliliğinden sperm dondurulması gerekmektedir. Günümüzde sperm dondurma çalışmaları yapılmakta ve çalışmalar devam etmektedir.

## 1.6 Alabalık Yetiştiriciliğinde Biyoteknolojik Yöntemler

Su ürünleri yetiştiriciliği, hayvansal gıda üretimi içinde en hızlı büyüyen sektörlerin başında gelmektedir. Dünyanın hemen her yerinde güvenilir gıda üretimi ve aynı zamanda üretimin de sürdürülebilirliği açısından büyük potansiyele sahiptir. Bu bakımdan üretimi verimli hale getirmek için bireylerin cinsiyetinin üreme, büyüme ve ürün kalitesi üzerindeki olumsuz etkileri azaltmak veya ortadan kaldırmak ve verimli bir şekilde çoğaltılması için çalışılması gerekmektedir. Günümüzde balık cinsiyetini ve üreme periyotlarını programlayarak kontrol ederek, ticari olarak önemli türlerde araştırmalar yoğunlaşmıştır.

Gökkuşuğu alabalıklarında dişi bireylerin erkek bireylere göre daha hızlı büyüdüğü, hastalıklara karşı daha dirençli olduğu ve et kalitesinin daha iyi olduğu bilinmektedir. Cinsel olgunlukla beraber erkek ve dişi balıkların gelişimlerinde önemli oranda farklılıkların olması yetiştiricilikte tamamının dişi bireylerden oluşması zorunlu hale geldiğini vurgulamışlardır [42].

Geçmişte yapılan bilimsel çalışmalarda erkek alabalıkların 2 yaşında cinsi olgunluğa ulaştığı, dişi alabalıkların ise nadiren 2 yaşında ama genellikle 3 yaşında cinsi olgunluğa ulaştığını bildirmişlerdir. Ancak günümüzde mevsimsel değişimlerinde etkisi ile bu süreç her iki cinsiyette de neredeyse 1 yıl öne çekilmiştir. Yani erkek alabalıklar yaklaşık 1-1,5 yaşında cinsi olgunluğa ulaşırken, dişi alabalıklar 2-2,5 yaşlarından cinsi olgunluğa ulaşmaktadır. Alabalıkların doğal üreme dönemi sonbahar mevsiminin sonu (Kasım ayı) ile ilkbahar mevsiminin başlangıcı (Mart ayı) arasında gerçekleşmektedir. Ancak günümüzde fotoperiyot uygulamaları ile yıl boyu yumurta ve sperm alımı yapılabilmektedir. Yumurtadan çıktıktan sonra belirli bir vücut gelişimine ulaşması sıcaklık, ışık ve hormonal mekanizma ile doğrudan ilişkilidir. Bunun yanında çevresel faktörler balıkların cinsiyet oluşumuna ve cinsel gelişimine de etkili olduğunu bildirmişlerdir [43,44].

Yapılan başka bir çalışmada balıklarda cinsiyeti kontrol etmek amacıyla kullanılan temel prensiplere değinmişlerdir. Cinsiyet kontrolü çalışmalarında spesifik olarak kullanılan, eksojen steroid hormonları, kromozom manipülasyonu, çevresel manipülasyonlar ve cinsiyete bağlı genetik materyaller ile cinsiyeti kontrol edilebildiğini bildirmişlerdir [45].



Balıklarda uygulanabilen biyoteknolojik yöntemleri 3 ana başlıkta özetlemiştir. Bunlar sırasıyla cinsiyet kontrolü, kromozom manipülasyonu ve gen manipülasyonudur. Cinsiyet kontrolü yetiştiriciliği yapılacak türün verimi yüksek olan erkek, dişi veya kısır olarak dönüştürülmesidir. Kromozom modülasyonunda üstün özelliklere sahip bireylerin genetik materyalinin sonraki nesilde devam ettirilmesi için ginogenetik, androjenetik gibi biyoteknolojik yöntemler kullanılmaktadır. Gen manipülasyonunda ise bir bireyden diğer bireye gen transferi ile mümkün olabildiğini bildirmişlerdir. Alabalıkların üretiminde genel olarak dişi bireylerin tercih edilmesi ile tamamı dişi bireylerin üretilmesi üzerine çalışmalar yapılmış ve günümüzde başarılı bir şekilde uygulanmaktadır [46].

Monoseks üretim, cinsel olgunlukla ilgili birçok önemli sorunu önlediği halde, eğer elde edilen bütün dişi ve erkek stoklar olgun hale gelmeden önce elden çıkarılmamış ise ilerleyen dönemde cinsi olgunlaşma gelişerek ciddi bir pazarlama sorununu ortaya çıkarır. Bu durumu bertaraf etmek için balıklar ya tamamının kısırlaştırılması gerekmektedir. Monosex üretimi için ya doğrudan ya da dolaylı yoldan cinsiyet dönüşüm uygulamaları gerekmektedir. Eğer cinsiyet değişimi sürecinde erkekleştirmeyi sağlamak için ihtiyaç duyulan miktardaki dozdan daha fazla 17 $\alpha$ -metiltestosteron kullanılırsa balıklarda bir tür kısırlaşma oluşturulur. Örneğin; gökkuşuğu alabalıklarında 1 kg yeme 30 mg 17 $\alpha$ -metiltestosteron absorbe edilerek 110 gün boyunca beslenildiğinde yüksek oranda kısırlaşma sağlandığı görülmüştür (Emre ve ark., 1998). Hormon verilerek kısırlaştırılan balıklarda cinsiyet hormonlarının gelişmediği gözlenmiştir. Böylece gonad gelişiminde kullanılacak enerjinin önemli bir bölümünün büyüme sarf edilmesi hedeflendiği bildirilmektedir [47-48].

Balıklarda monoseks üretimi için yapılan çalışmalar ile doğal yaşam alanlarındaki çevresel şartların da balık cinsiyetlerini etkilediği bilinmektedir. Günümüzde sağlıklı ve birim alandan daha fazla bireylerin eldesi için biyoteknoloji ve genetik mühendislik uygulamalarından yararlanılmaktadır. Biyoteknoloji, su ürünlerinde de birçok farklı amaç için uygulanmaktadır. Bunlar; tamamı monosex balıklar, hızlı büyüyen, yem değerlendirme oranı, yumurta ve et verimi yüksek bireylerin elde edilmesi şeklinde sıralanabilir. Balık yetiştiricileri tarafından bu tekniğin uygulanmasındaki ana amaç, üstün özelliklerin ön plana çıkarıldığı bireylerin üretilmesi olduğu bildirilmiştir [44,49-50].

Erkeklerin heterogametik olduğunu varsayarak, dişileri dönüştürmek için bir sürecin geliştirilmesi üzerine, homogametik bireyleri koşullu olarak çiftleştirerek, tüm dişi somon balığı stokları üretmenin alternatif bir yöntem olarak değerlendirmişler. Bunun için ilk beslemeden 0-90 gün sonra gökkuşuğu alabalığına ve somon balığına 3 mg/kg diyet konsantrasyonunda 17 $\alpha$ -metiltestosteronun oral yoldan verilmesi, genetik dişilerde cinsiyet inversiyonunu indüklediğini ve büyük ölçüde tamamen erkek popülasyonlar elde edilmektedir. Somon balığının 30 mg/kg diyet doz oranında uygulanması sonucunda ise, erkeklerin gonadları karakteristik filiform görünümüne sahip olan ancak spermatogonial gelişimin baskılandığı gözlemlenmiştir [51].

Gökkuşuğu alabalık yetiştiriciliğine Türkiye'de son dönemlerde biyoteknolojik yöntemlerin geliştirilmesi ve kullanılmasına rağmen diğer taraftan geleneksel yöntemlerle üretime devam edildiği görülmektedir. Bu nedenle alabalık kuluçkahanesinin verimi düşük olduğu ve zamanın gerisinde kaldığı görülmektedir. Üretimden verim alınabilmesi için güncel bilimsel çalışmalardan da yararlanılarak üretim yapılması kaçınılmazdır. Balıklar üzerine yapılan bilimsel çalışmalar göstermiştir ki son yıllarda geliştirilen biyoteknolojik yöntemlerle tamamı dişi, tamamı erkek veya steril (kısır) bireylerin eldesi mümkün hale gelmiştir. Bu tür çalışmalar ile dönemsel olarak görülen ve üretimi olumsuz etkileyen bazı gelişimlerin (üreme aktivitesinin, büyüme, yaşama ve et kalitesi vs) önüne geçerek üretim verimini ve kalitesini artırılabilirliğini bildirmişlerdir [52].

Tamamı dişi alabalık popülasyonlarının oluşturulması, ticari su ürünleri yetiştiriciliği açısından önemlidir [53]. Dönüştürülmüş dişiler (fonksiyonel XX erkekleştirilmiş dişiler, neomaller) bir erkek fenotipi görünümüne sahiptir ancak dişi genotipini (XX) devam ettirir. Böylece fonksiyonel erkeklerden üretilen spermiler yalnızca X kromozomu taşır ve elde edilen çaprazlamalar sonucunda oluşacak bireylerin tamamı dişilerden oluşmaktadır [54]. Bu şekilde dönüşümü sağlanan bireyler elde edildiğinde dişi somon balıkları bir erkek fenotipi ifade eder ve spermatozoa üretir. Bunun yanında fonksiyonel (XX) erkek balıklarda genellikle spermatid kanalları yoktur, sperm doğrudan testisten alınır ve bu işlemi gerçekleştirmek için balık disekte edilmesi gereklidir [51]. Testiküler meni, ejakülat sperminden farklıdır. Normal erkekler sperm miktarı az motilitesi yüksek iken dönüştürülmüş erkeklerden alınan sperm miktarı ve sperm konsantrasyonu daha yüksek, ancak sperm motilitesi daha düşüktür [55-56].

Son yıllarda balıkların steroid hormonlarla beslenmesi, birçok araştırmacının ilgi odağı olmuştur. Bu hormonların androjen erkek cinsiyet hormonunu (testosteron), östrojenler ise dişi cinsiyet hormonlarını (oestrodial, oestriol, oestrone) içermekte ve hayvanların cinsiyet oluşumunu etkilemektedir. Gonadal farklılaşmadan önce verilmesi durumunda cinsiyeti tamamen değiştirilebilmektedir [57]. Birçok balık türünde uygulanan biyoteknolojik yöntemler ile cinsiyet kontrolü yapılabilmektedir. Özellikle alabalık yetiştiriciliğinde tamam dişi bireyler tercih edilmektedir. Çünkü erkek bireylerin yaklaşık bir yaşlarında cinsel olgunluğa ulaşmaktadır. Bu durum balıkların büyümelerinin yavaşlaması, et kalitesindeki lezzet kaybı, yem değerlendirme düşüş gibi nedenlerden dolayı üreticiler tamamı dişi bireylerin üretimine yönelmişlerdir [58].

Su ürünleri üretimine gelecek yıllarda besin ihtiyacının karşılanmasında üretim sistemleri içinde en büyük potansiyele sahip olacağı ön görülmektedir [59]. Bu potansiyelin zaman içerisinde ortaya çıkmasında biyoteknolojik yöntemlerin önemli bir yeri olduğunu bildirmiştir [60].

Hızla artan dünya nüfusu, bilim adamlarını yaşam için gerekli kaynaklardan daha verimli yararlanma olanaklarını araştırmaya yöneltmiştir. Hayvancılık sektöründe vazgeçilmez öneme sahip olan reproduksiyon biyoteknolojisi; suni tohumlama, *in-vitro* fertilizasyon, gen transferi ve klonlama gibi birtakım yenilikleri kapsamaktadır. Bu teknikler arasında en etkin ve yaygın olanı, değerli erkek gamet hücrelerinin dondurulması ve dişi hayvanların sun'i yolla tohumlanması esasına dayanan suni tohumlama biyoteknolojisidir [61].

Su ürünleri üretiminde erkek ve dişi gametlerin kalitesi birinci derecede rol oynamaktadır. Doğal ortamda veya kültür şartlarında bulunan balıkların gamet kalitesi birçok çevresel faktör tarafından etkilenmektedir. Biyolojik olarak gametin kalitesi; spermanın dölleyebilme, yumurtanın da döllenebilme ve ardından dölleniş yumurtanın normal bir embriyoya dönüşebilme yeteneği olarak tanımlanmaktadır [31].

Balık spermatozitleri; spermium adı verilen germ hücrelerinden oluşur. Sperma baş bölümü, orta bölüm ve kuyruk bölümü olmak üzere üç bölüme ayrılmıştır. Baş bölümü; karşıdan bakıldığında oval, yandan bakıldığında ise armut şeklinde

görünmektedir. Alabalık spermatozoon'unun boyu 2 mikrondur. Baş kısmı ovoid yapıda olup, akrozom bulunmaktadır. Orta bölüm; baş ve kuyruk arasında kalan bölümdür, spermanın hareketini sağlayan enerji bu bölümden karşılanır. Kuyruk bölümü ise; spermanın ince uzun ve son kısmını oluşturur, bu bölümün yilankavi hareketleri sayesinde spermanın yol almasını sağlar [38].

Sperma ve spermatozoanın plazmasını oluşturan maddeler, balığın türüne, yaşına, ırkına ve çevre koşullarına bağlı olarak değişim göstermektedir. Genellikle hücreden sperma plazmasına magnezyum ve potasyum, sperma plazmasından da hücreye sodyum ve kalsiyum minerallerinin geçtiğini bildirmişlerdir. Seminal plazmanın bileşimi ise türlere göre küçük farklılıklar göstermekle beraber Na, K, Cl, şeker ve protein başlıca komponentleridir. Balık spermasının pH'sı 7.0- 8,3 arasında değişim gösterebilmektedir [27,62]. Spermatozoada ise deoksiribonükleik asit mukopolisakkarid, aldehidrogenik lipid, keratin-protein, enzim ve koenzimler önemli bir yer tutar [38].

Alabalık spermatozoitlerinin en önemli özelliği erkeğin genital kanalında motil olmamasıdır. Bunun başlıca nedeni seminal plazmada bulunan  $K^+$  iyonudur [43]. Spermatozoanın suda aktif olduğu periyot oldukça kısadır ve su sıcaklığına bağlı olup 30 saniye ile 2 dakika arasında değişim göstermektedir. Spermanın motilite süresinin tayininde aktivasyon çözeltisinin ilavesinden sonra ışık mikroskopunda aynı koşullarda ve aynı kişi tarafından bakılarak ölçülmüştür [63].

Biyoteknolojik çalışmalara her gün yenisi eklenmektedir. Balıkçılık açısından gerekli ve önemli konulardan biri de sperm dondurmadır. Bu çalışmaların sonucunda verimli, sağlıklı, et kalitesi yüksek, yem değerlendirme oranı iyi, hastalıklara karşı dirençli ve üstün niteliklere sahip hatların geliştirilmesi ve üretilmesi sağlanacaktır. Bu nedenle biyoteknolojik uygulamalar yapılırken uygulanacak yönteminde zamanlaması önemlidir. Örneğin balık sağlığı açısından aşılamanın, mevsim dışı üretim (yumurta ve sperm alımı) için fotoperiyot döneminin planmalarına dikkat edilmelidir.

Anaç balıklardan yumurta ve sperm alınmadan önce balıkların stres yaşaması ve sağım sırasında zarar görmemesi için anestezi ile sakinleştirilmesi gerekmektedir. Balıkların sakinleştirilmesinde kimyasal ve bitkisel anesteziler kullanılmaktadır. Kimyasal anestezilerin başında yaygın olarak fenoksiethanol tercih edilmektedir. Ancak

kimyasal anestezi kalıntısına neden olması sebebiyle bitkisel kökenli anestezi kalıntısının (lavanta, karanfil yağı) kullanımını tavsiye edilmektedir [64-65].

### 1.6.1 Spermin Dondurulması

Normal şartlarda bir hücrede donma anında gerçekleşen en önemli olay, hücre içi sıvılarda oluşan kristalleşmedir. Bu olay neticesinde hücrelerde önemli pH değişiklikleri, hücre dehidrasyonu ve geniş buz kristallerinin şekillenmesi gerçekleşir. Bu olumsuz durumlar ise hücrede enzimatik reaksiyonların bozulmasına ve hücrenin membransal yapılarında yapısal ve fonksiyonel değişikliklere yol açabildiğine değinmişlerdir [66].

Spermatozoonun plazma membranları, akıcı mozaik tarzında düzenlenmiş protein, glikoprotein ve glikolipitler içeren iki sıralı fosfolipit katmanından oluşmuştur. Bu yapılar termodinamik özellikte ve yaklaşık %65-70 oranında doymamış fosfolipitlerden (yağ asitlerinden) oluşmaktadır. Fosfolipitler tipik olarak alışılagelmiş ester bağlantıları yerine eter bağlantılı yağ asitleri içeren plazmalojenler ile birlikte farklı bir yapılandırma oluştururlar. Fosfolipitlerin büyük bir kısmı, çoklu doymamış bir esansiyel yağ asidi olan dokosaheksaenoik asit (DHA) yan zinciri içerir. Bu da membran akışkanlığını ve yapısal değişkenliğini etkileyebilir [67].

Spermatozoonun membransal yapıları (plazma membranı, dış akrozomal membran ve mitokondriyal membran) dondurma ve çözündürme işlemlerine karşı son derece duyarlıdır. Sperm plazma membranındaki lipitlerin fiziksel faz durumu sıcaklık değişimlerine karşı tepki verir. Önemli sıcaklık düşüşleri, membransal yapıların içeriğinin dönüşümsüz olarak faz değişimine uğramasına, diğer bir ifadeyle sıvı fazdan jel fazına geçmesine neden olmaktadır. Şekillenen faz değişimi ise membran içi enzimlerin kinetiğinin değişmesine sebep olarak hücre membran dengesinin bozulmasına yol açar. Dondurma ve çözündürme işlemleri sırasında ortaya çıkan bu durum, spermatozoon hücresinin membransal yapılarının hasar görmesine ve fonksiyonel yapılarının bozulmasına neden olarak hücrenin ölümüne yol açabilen çeşitli stres unsurları oluşturduğunu bildirmişlerdir [68-69].

Dondurma ve çözündürme işlemleri sırasında ortaya çıkan ani sıcaklık değişikliklerine bağlı olarak spermatozoonlar üzerinde meydana gelen bu zararlı etkileri önlemek

amacıyla sperma sulandırıcılarına bazı kimyasal maddeler ilave edilmektedir. Bu maddelere “Kriyoprotektan Maddeler” adı verilir. Bu alanda yaygın olarak kullanılan ve hücre içerisine girerek etkisini gösteren en önemli madde gliseroldür [70]. Sulandırıcılara katılan gliserol, spermatozoonlar içerisine girmek suretiyle hücre içerisindeki suyun kısmen dışarı çıkmasını sağlar. Bu sayede bulunduğu ortamın donma noktasını düşürerek (antifriz etki oluşturarak) dondurma işlemi sırasında geniş buz kristallerinin şekillenmesini en az düzeye indirgediğini bildirmişlerdir [71]. Bir kriyoprotektan olarak gliserolün keşfedilmesi, spermanın dondurulması alanında bir devrim niteliğinde önem taşımaktadır. Bu keşif sayesinde yapılan başarılı dondurma çalışmaları, suni tohumlamanın saha şartlarında yaygınlaşması alanında oldukça hızlı bir ilerleme kaydedilmesini sağlamıştır [72].

Başka bir çalışmada yine gliserolün hücre içerisine girişi esnasında hücre membranında oluşturduğu yapısal değişiklikler, katılan gliserol oranına bağlı olarak değişen derecelerde hücre membranında hasar oluşabilmekte, ayrıca hücre içi ve hücre dışında oluşan ozmotik stres nedeniyle belli oranlarda membran geçirgenliği bozulabildiği bildirmektedir. Buna ilaveten, spermaya gliserol ilave edilmesinin, birçok hayvan türünde farklı düzeylerde akrozomal bozukluklara neden olduğu ve akrozom reaksiyonunun başlamasını hızlandırması nedeniyle spermatozoonların fertilizasyon kapasitesinin azalmasına yol açtığı bildirilmiştir [73].

Ancak oluşan bu etkinin şiddeti ve zarar derecesi türler arasında önemli farklılıklar göstermektedir. Bu durum, özellikle türler arasında kriyoprezervasyon sonrası gözlenen başarı oranlarını önemli derecede etkilediğini bildirmiştir [66].

Dondurma ve çözme işlemleri yapılırken spermatozoon membranlarının hem soğuma hem de ısınma sırasında faz geçişlerine uğraması olası bir durum olup sonuçta hücrede değişen oranlarda soğuk şoku gelişmektedir. Bu durum, çözme sonrası elde edilen motilite oranlarını negative yönde etkilediği bildirilmiştir [74]. Sperm kriyoprezervasyon yalnız su ürünleri yetiştiriciliği için değil, aynı zamanda doğal kaynakların korunması ve canlıların genetik olarak da geliştirilmesi için çalışılması gereken alanlardan biri olduğunu vurgulamışlardır. Bu bakımdan, öncelikle ticari değeri yüksek türlerden olan alabalık (*Oncorhynchus mykiss*), sazan (*Cyprinus carpio*), zebra (*Danio rerio*) gibi balıklarının sperm dondurma çalışmaları yapılırken, son zamanlarda deniz balıklarında mersin balığı (*Acipenser baerii*), çipura (*Sparus*

*aurata*) gibi balıkların da sperm dondurma çalışmalarını yaptığını bildirmişlerdir [75].

## 1.6.2 Sperm muhafazası

Sperm muhafaza çalışmaları 1945’de bildirildikten sonra birçok memeli türünde başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Spermatozoitlerin sıfırın altındaki sıcaklıklarda dondurulması ve yine sıfırın altında sıvı azot içerisinde saklanması şeklinde yapılmaktadır. Dondurulma ve çözündürme sonrası fertilitésinin en yüksek olması için uygulama koşullarının en iyi şekilde olması gerekmektedir. Dondurma sırasında uygun prosesin uygulanması hücre içi kristalleşme önlenerek çözündürme sırasında hücrenin parçalanmasının önüne geçilmiş olacaktır [76].

Sperm hareketliliği, spermin hücresinin aktif olarak yumurta hücresine ulaşmasını ve nüfuz etmesini sağlayan önemli bir işlevidir. Balıklarda iç ve dış dölleme görülmektedir. Bazı balıkların cinsel aktivitesi genellikle mevsimseldir ve dölleme vücut dışında gerçekleşir. Sperm, gonadlarda bir kez farklılaştıktan sonra, serbest bırakılıncaya kadar orada tamamen hareketsiz kalır. Seminal plazma içerisinde bulunan iyon konsantrasyonları gibi çeşitli parametreler; potasyum (K), sodyum (Na), kalsiyum (Ca), ozmotik basınç, pH ve sıcaklık motiliteyi etkilemektedir. Bu faktörlerin sperm üzerindeki etkilerini incelemek ve yapay döllemeyi sağlamak adına dondurarak saklamayı sağlayacak çalışmaların yararlı olacağını bildirmişlerdir [77].

Gelişen teknoloji sayesinde uzun süreli ve kısa süreli dondurma işlemi yapılarak, elde edilen materyaller istenilen zamanda ve yerde kullanılabilir. Her iki yöntemde de spermanın yaşamsal fonksiyonlarını saklama ısısı, soğutma hızı, sulandırıcının kimyasal bileşenleri ve kullanılan kriyoprotektif maddeler belirler. Kısa süreli saklama yöntemi, spermayı sulandırdıktan sonra 5 °C gibi düşük ısılarda birkaç saatten birkaç güne kadar saklama esasına dayanan bir metottur. Bu yöntem ile sperma yaşamsal aktivitesini ancak 7-8 gün koruyabilmektedir. Sperm dondurma yöntemi ise spermanın daha düşük ısılarda saklanması temeline dayanır. Hücreyi soğuk şokunun etkilerinden koruyan kriyoprotektif maddelerle sulandırılan sperma, uygun saklama koşullarında muhafaza edilirse motilite ve fertilitésini yıllarca korunabildiğini bildirmişlerdir [78-79].

## 1.7 Sperm Dondurmada Kullanılan Kryoprotektanlar

Üreme hücrelerinin dondurulmasında kullanılan hücre koruyucu maddeler (kryoprotektanlar) düşük sıcaklık şoku ve donma sırasında oluşabilecek istenmeyen hasarlara karşı dondurulan hücreyi koruma sağlayacağını bildirmişlerdir. Aynı zamanda kryoprotektanların hücrede oluşturabilecek zararlı etkiye sahip olmaları, kryoprotektan maddeler üzerinde yapılan çalışmaları yoğunlaştırmış, dondurma işlemlerinde kullanılan eksternal kryoprotektanlarla, toksik etkiler azaltılmaya çalışılmıştır. Kryoprotektanların optimum kullanım doz oranları türe özgü olmakta ve bazı hücre membran parametrelerinin bilinmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Dondurulan ve sonrasında çözündürülen hücrelerin fizyolojik ve fonksiyonel özelliklerinin anlaşılması ile kryobiyolojik çalışmalarda gelişme sağlanmıştır [80].

Kısa süreli muhafaza tekniği ile farklı sulandırıcılar (Glukoz, Ringer solusyonu) ile kullanılarak 4°C'de 48 saat süreyle saklanabilmektedir [81]. Uzun süreli saklama işleminde ise önemli katkı maddeleri; albumin, lesitin, yumurta sarısı ve kryoprotektanlar kullanılmaktadır. Bunlardan en fazla tercih edilen DMSO (Dimetilsülfoksit), DMA (Dimetil asetamid), gliserol, glikoz, propilen glikol ve etilen glikol'dür [82-84].

Dimetilsülfoksit, kimyasal olarak bir polar kök etrafında iki apolar baştan oluşan amfipatik bir bileşiktir. Bu özellik DMSO'ya hem sıvı hem de organik medyumlarda çözünme imkânı sağlamaktadır. Yapılan bir çalışmada alabalık spermasında çözüm sonu en yüksek motilite oranı, sulandırıcıya % 10-15 oranında ilave edilen DMSO ile tespit edilmiştir [85]. Yumurta sarısında bulunan düşük yoğunluğa sahip fosfolipitler spermatozoa yüzeyine bağlanmakta ve hücresel adenilat siklazı aktive ederek kriyoprotektif etki göstermektedir. Birçok araştırmada lipozomlardan elde edilen fosfolipitlerin koruyucu etkileri araştırılmış olup, türe göre koruyucu etkili fosfolipit kaynakları olduğu bildirilmiştir [86-87].

Dondurulduktan sonra çözündürme işlemi, sperm hücrelerinin bulunduğu payet veya pelletlerin 5-30 °C sıcaklık aralığındaki su banyosuna farklı sürelerde daldırılması suretiyle uygulanan bir işlemdir [85]. Çözündürme işleminin hızlı yapılması ve kısa süre içerisinde kullanılması önemlidir [88]. Dondurulmuş spermanın aktive edilmesinden 10 sn sonra taze sperma ile dondurulmuş spermanın motilitelerinin bir birine yakın



olduğu ancak motilite süresinin taze spermada 50 sn iken dondurulmuş spermada 40 saniye kadar olduğu bildirilmektedir [89]. 0,5 ml ( $8-9 \times 10^9$  sperma/ml) spermanın dondurulup çözülmesi ile yaklaşık 2400-3200 adet yumurtanın döllenesi ( $1:0,25 \times 10^6$  yumurta: sperma) beklenmektedir.

Uzun süreli muhafazası düşünülen sperm örneklerinin kış mevsiminde (sonbahar sonu ve ilkbahar başlangıcı) alınmasına dikkat edilmelidir. Bu görüş aynı zamanda cinsiyeti dönüştürülmüş fonksiyonel erkekler (XX) için de geçerlidir. Farklı zamanlarda balıklardan alınan ve kriyoprezerve edilmiş spermanın kalitesini karşılaştırmışlar. Cinsiyeti dönüştürülmüş dişilerden kış ve ilbaharda alınmış spermaların kalite parametreleri arasında ciddi farklar gözlemlenmiştir. Çözülme sonrası sperm motilitesi ilbaharda toplanan sperma miktarı son derece düşük (% 1-6) kış dönemi ise (% 18-29) olarak bildirilmiştir. Ayrıca, kışın dondurulan spermaların, ilbahardan gelenlere kıyasla önemli ölçüde daha yüksek dölleme kabiliyeti vardı. Bu sonuçlar, mevsimselliğin kriyoprezervasyon başarısını etkilediğini açıkça göstermiştir. Bu nedenle kriyoprezervasyon işleminin her zaman kış mevsiminde elde edilen sperma ile yapılması gerektiğini bildirmişlerdir [90-91]. Sperm dondurma yaygın olan ve sıklıkla kullanılan kriyoprotektanlar; yumurta sarısı, dimetil sülfoksit, glikoz ve gliserol başlıcalarındandır.

### 1.7.1 Yumurta Sarısı

Spermanın sıfırın altında sıcaklıklarda soğutulması sırasında oluşabilecek soğuk şoku, sperm hareketlilik süresini geri dönülmez bir şekilde kayıplara ve azalmasına, hücre içi enzimlerin hücre dışına sızmasına yol açacağını bildirmişlerdir. Bu nedenle olası soğuk şokunun zararlı etkilerine karşı sperma hücrelerinin korumasın için ve ucuz bir koruyucu olmasından dolayı yumurta sarısı yaygın olarak sperma sulandırıcılarına ilave edilmektedir [92].

### 1.7.2 Dimetil Sülfoksit (DMSO)

Dimetil sülfoksit (DMSO), kimyasal madde olarak amfipatik bir bileşiktir. DMSO'nun bu özelliği hem sıvı hem de organik ajanlarda çözünme imkânı sağladığını bildirmişlerdir. Daha önce yapılan çalışmalardan insan, hayvan ve balık sperm dondurma işlemlerinde başarılı bir şekilde kullanılmış ve olumlu sonuçlar elde

edildiği tespit edilmiştir. Sperm dondurmada kullanılan sulandırıcılara farklı oranlarda ilave edilerek DMSO'nun etkileri araştırılmıştır. Yapılan bir çalışmada ise alabalık spermasında dondurulduktan sonra çözdürülmüş ve en yüksek motilite oranı, seyrelticiye % 10-15 oranında katılan DMSO'da gözlemlendiğini bildirmişlerdir [85,93].

### 1.7.3 Glikoz

Diğer bir kryoprotektan olan glikoz, sakkaritlerden olup sükroz, trehaloz ve raffinöz bu gruba girmektedir. Sakkaritler, hücre sıvısının kristalleşmesini engellemek için hücrede dehidrasyon oluştururlar. Şekerler spermin donma ve çözüm esnasında oluşan hücre membran zararına karşı, membrandaki fosfolipitlerle etkileşime girip subsuratum artışı sağlayarak koruma sağlamakta ve çözüm işlemi sırasında sperm hücrelerinin ozmotik şoka girmesini önlediğini bildirmiştir [85].

### 1.7.4 Gliserol

Hücrenin dondurulması sırasında kristalleşmeyi önlemektedir. Gliserol yüksek oranda hidrofilik yapıya sahip bir poliol bileşiğidir. Hücrenin donma sıcaklığını düşürmesi ve donma esnasında pH değişiklikleri nedeni ile kimyasal yapısındaki C/OH oranının eşit olması gliserolun sperm hürcesi kristalleşmelerini en aza indirerek kırılmaların önüne geçilmesine olanak sağladığını bildirmiştir [85].

Ülkemizde ve dünyada yakın gelecekte su sıkıntılarının olabileceği öngörülerek kaynak sularının daha dikkatli ve verimli kullanılması açısından su ürünleri üretiminin yanında diğer hayvansal ve bitkisel üretim alanlarında da biyoteknolojik çalışmalarla birlikte farklı üretim teknikleri geliştirilmesi gerekmektedir.

## 1.8 Sperm Dondurmada Antioksidanların Önemi

Seminal plazma, içerdiği potasyum (K), kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg), klorür (Cl) gibi antioksidan etkili maddeler ile sperm hücrelerini oksidatif strese karşı korur. Sperm hücrelerinin DNA'sı ise oksidatif strese karşı kendisinin güçlü yapısı ve seminal plazmada bulunan antioksidan maddeler tarafından korunmaktadır [94].

Sıfırın altındaki düşük sıcaklıklarda sperm hücresini koruyan antioksidatif savunma mekanizmaları,  $\beta$ -karoten, indirgenmiş glutatyon [(GSH) glisin, sistein ve glutamik

asit] gibi bazı vitamin ve kimyasal maddeler ile enzimlerden oluştuğunu bildirmişlerdir. Bunların yanında E vitamini, yapısındaki fenolik hidroksil grubundan dolayı güçlü bir antioksidan özellik gösterdiğini ve zincir kırıcı antioksidatif etkinliği ile membran fosfolipitlerinde bulunan PUFA'yı da serbest radikal hasarından koruyan mekanizma olduğunu bildirmişlerdir [95-96].

Balık spermi kriyoprezervasyonu günümüzde başarılı bir şekilde yapılabilmektedir. Uygulama sırasında sperm hücre yapısında oluşabilecek hasarların çözüm sonrasında sperm motilitesini, motilite süresini ve buna dayalı olarak larvaların yumurtadan çıkma oranlarını olumsuz yönde etkiler. Bu çalışmada, propolisin, *Cyprinus carpio* spermının dondurularak muhafaza edilmesi ve çözündürme sonrası dölleme yeteneği üzerine etkisinin olup olmadığını araştırmışlardır. Bugüne kadar balık sperm dondurulması konusunda birçok çalışma yapıldığını ancak daha önce sulandırıcılara propolis ilave edilmediğini bildirmişlerdir. Sulandırıcılar, farklı oranlarda propolis (0,2, 0,4, 0,6, 0,8 ve 1 mg/ml) ve %10 yumurta sarısı (propolissiz kontrol olarak) ile %10 Me<sub>2</sub>SO ilave edilmiş ve yeniden düzenlenmiş Kurokura solüsyonu kullanılarak hazırlamışlardır. Spermier sulandırıcılarla 1:9 oranında seyreltilerek dondurulma işlemi yapılmıştır. Dondurularak muhafaza edilen sperm örneklerinin hareketlilik yüzdesi ve süresi ile dölleme testleri çözündürüldükten sonra yapılarak elde edilen verileri taze sperm sonuçları ile karşılaştırmışlar. Propolis içeren sulandırıcılar, kontrol grubuna göre daha yüksek yüzde hareketlilik ve hareketlilik süresi sergiledi (P < 0.05). Özellikle dördüncü grup olan 0,8 mg/ml ve beşinci grup 1 mg/ml çözündürüldükten sonra hem motilite hem de dölleme oranını olumlu yönde etkilediğini ve propolisin balık spermasında uygun bir kriyoprotektif ajan olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir [97].

Antioksidanlar etki mekanizmasına göre iki türdür. Birinci grupta, otooksidasyon zincirini kırarak oksidasyonu geciktiren antioksidanlar bulunur ki bunlara primer antioksidanlar denir. İkinci gruptakiler ise sekonder antioksidanlar olup oksidasyonun başlamasını engelleyen antioksidanlardır. Kimi antioksidanlar ise birden fazla etki mekanizmasına sahip olduklarından çok fonksiyonlu antioksidanlar olarak adlandırıldığını bildirmiştir [96].

Tüm canlıların temel besinleri içerisinde esansiyel mineraller ve vitaminler vardır. Bor minerali de organizmalar için temel bir besin maddesi olarak gerekliliğini

vurgulamışlardır. Ancak belirli dozların üstünde alınması da toksik olabilir. Yapılan bu çalışmada ilk kez bor'un balık sperm hareketliliği üzerindeki etkileri araştırılmış ve balıklardan alınan sperm örnekleri sıvı azotta dondurularak saklanmıştır. Bor'un sperm yapısını ve kalitesini kriyoprezervasyondan nasıl etkilendiğini tespit etmeye çalışmışlardır. Çalışmada 12 olgun erkek Japon balığı (*Carassius auratus*) kullanılmıştır. Balıklar 45 gün boyunca 1 mg, 5 mg ve 10 mg bor içeren yemlerle beslenmiştir. Diğer taraftan başka bir grupta ise, balıklar 1 mg/L, 10 mg/L ve 20 mg/L bor içeren akvaryumlarda tutulmuştur. Daha sonra taze ve dondurularak saklanan örneklerde, sperm motilite sürelerini belirlemişlerdir. Kriyoprezervasyondan sonra, elde edilen sonuçlara göre 5 mg/kg yem uygulanan gruptan alınan sperm örnekleri bor'un sperm soğuk şoklara karşı korunabileceğini bildirmişlerdir [98].

Yaptıkları bu çalışmada, bütillenmiş hidroksitoluenin (BHT) *Cyprinus carpio* spermelerinin dondurularak muhafaza edilmesi üzerine etkilerini araştırmışlardır. BHT, farklı hayvan türlerinin spermelerinin dondurularak saklanmasında yaygın olarak kullanıldığını bildirmişlerdir. BHT kullanılan spermelerin dondurulurken ve çözülürken spermi koruduğunu belirlemişlerdir. Bu katkı maddesi daha önce balık spermi dondurulmasında kullanılmamıştır. Bu çalışmada sazan (*Cyprinus carpio*) spermeleri modifiye edilmiş Kurokura sulandırıcı, % 10 DMSO ve 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1,0, 2,5, 5,0 ve 10 mM BHT içeren % 10 yumurta sarısından oluşan bir sulandırıcı ile karıştırılmış ve sıvı azot buharı içerisinde dondurulmuştur. Çözdürüldükten sonra motilite oranı, motilite süresi dölleme oranı kontrol grubu ile karşılaştırılmış ve en iyi sonucun 0,1 ve 0,001 mM BHT dozlarında olduğunu gözlemlemişlerdir. BHT'nin sperm balık spermi dondurulmasında ve muhafaza edilmesinde kullanılabileceğini bildirmişlerdir [99].

Reaktif oksijen türleri (ROS), normal hücresel metabolizmanın ve hava kirleticileri veya sigara dumanı gibi çevresel faktörlerin bir sonucu olarak canlı organizmalar tarafından üretildiğini bildirmişlerdir. ROS oldukça reaktif moleküllerdir ve karbonhidratlar, nükleik asitler, lipidler ve proteinler gibi hücre yapılarına zarar verebilir ve işlevlerini değiştirebileceğini bildirmişlerdir. Oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin oksidanlar lehine değişmesine "oksidatif stres" denir. İndirgeme ve oksitleme (redoks) durumunun düzenlenmesi, hücre canlılığı, aktivasyonu, çoğalması ve organ işlevi için kritik öneme sahip olduğuna değinmişlerdir [100].

Yapılan bu çalışmada amino asitlerin, sperm dondurulması sırasında hücrenin zarar görmemesi açısından önemli bir biyolojik işleve sahip olduğunu bildirmişlerdir. Sazan (*Cyprinus carpio*) spermının dondurulduktan sonra, sistenin maddesinin çözülme sonrası sperm hareketliliği, DNA hasarı ve yumurtayı dölleme oranları üzerindeki etkilerini belirlemeye çalışılmışlardır. 10 balıktan alınan spermler, farklı sistein dozları (2,5, 5, 10 ve 20 mM) içeren sulandırıcılarda dondurularak saklanmıştır. Sperm: sulandırıcı 1:9 oranında seyreltikten sonra dondurulmuştur. Sulandırıcı sperm karışımı 0,25 ml'lik payetlere doldurulmuş ve sıvı nitrojen buharında bekletilerek dondurulmuş ve sıvı nitrojende daldırılarak muhafaza etmişlerdir. DNA hasarı, kriyoprezervasyondan sonra kuyruklu yıldız tahlili ile değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar, sistenin adi sazanda (*Cyprinus carpio*) sperm motilite hızı ve süresinde önemli bir artış sağladığını bildirmişlerdir (P < 0.05). Tüm çalışılan doz grupları içerisinde ise en iyi sonucu 20 mM'da olup çözülme sonrası motilite (%76,00± 1,00) ve dölleme (%97.00 ±1.73) oranları tespit etmişlerdir. Aynı zamanda sistein dölleme ve yaşam oranlarını da artırdığını, DNA hasarını da azaltıcı etkisi olduğunu bildirmişlerdir [99].

## 1.9 N-(2-Merkaptopropionil)-Glisin (MPG)

N-(2-Merkaptopropionil)-Glisin (MPG) indirgeyici ve karmaşık bir tiyoldür. MPG serbest bir merkaptto grubu ile birlikte yaygın olarak kullanılan bir antioksidandır. Bazı raporlar, serbest radikallerden hücre zarı hasarını önleyen serbest radikal önleyici olduğunu göstermiştir. MPG, çeşitli hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır [101-102]. MPG, olası bir antidot olarak diğer sülfidril bileşiklerine göre birçok avantaja sahiptir ve çeşitli karaciğer hastalıkları, nefrotoksisite ve sistin ürolitiazisi tedavisinde klinik olarak kullanılmaktadır [103,101-102]. Şimdiye kadar, MPG klinik kullanımda çok az yan etkiye neden olmuştur. Hayvanlarda ve insanda gerçekleştirilen önceki çalışmaların aksine, balıklarda MPG ilavesinin sperm kriyoprezervasyonundan sonra hücreleri nasıl etkilediği ile ilgili herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Şimdiye kadar sadece [104]. Aktivasyon solüsyonuna MPG ilave etmişler, artan MPG konsantrasyonlarının [0 mM (Kontrol), 0,25 mM, 0,5 mM ve 1 mM] gökkuşağı alabalığı (*O. mykiss*) sperm motilitesi ve süresi üzerindeki etkilerini değerlendirmişler ve 0,25 mM'de motilite yüzdesi (%91,80±6,42) ve süresindeki

(29,40±5,86 sn) artışların istatistiksel olarak anlamlı olduğunu bildirmişlerdir (p<0,05). 1 mM konsanrasyonda sperm hücrelerinde hareketlilik belirlenemediğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada, fonksiyonel erkekleştirilmiş gökkuşağı alabalığı (*O. mykiss*) spermasının kriyoprezervasyonunda MPG'nin kullanılmasının ve farklı sulandırma oranlarının sperm kalitesi, dölleme ve açılma oranları üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 1.10 Dondurulmuş Spermin Çözdürülmesi

Sperm dondurma; spermlerin sıvı azot buharında dondurulduktan sonra -196 °C'deki sıvı azot içerisinde plastik payetlerde kullanılacağı zamana kadar muhafaza edilen donmuş spermatozoonların belirli bir süre boyunca 30-50 sn belirli bir sıcaklıkta 30-40 °C'de bekletilerek tekrar canlandırılıp fizyolojik olarak aktif hale gelmesinin sağlanması olarak tanımlanabilir. Buradaki amaç payetlerin iç sıcaklığının mümkün olan en kısa sürede 20 °C'nin üzerine çıkmasını sağlayarak, işlem sonrasında payet içerisinde yeterli miktarda motil spermatozoon bulunmasını temin etmek olduğunu bildirmişlerdir [105-106].

Spermatozoonların çözündürme sonrası canlılığı ve hareketliliği, suni tohumlamının başarısını etkileyen önemli faktörlerden birisi; yumurta döllemeleri sonrası elde edilen gözlenme ve açılma oranları ile arasında pozitif bir ilişki mevcuttur [107]. Payetler içerisinde dondurulmuş spermaların çözülme hızı, spermatozoonların hücre yapısı içerisinde yeniden buz kristallerinin şekillenme olasılığı ve bunun genel anlamda motilite, akrozomal yapı ve membran bütünlüğü yönünden olumsuz etkilere sebep olabilmesi nedeniyle önemli olduğunu belirtmişlerdir [78]. Yapılan bazı çalışmalarda [105]. düşük sıcaklıklarda yavaş çözülmenin hücrelerdeki buz kristalleri oluşumunu artırdığı ifade edilmiştir. Bu nedenle, hücre membranlarına zarar verebilecek su moleküllerinin yeniden kristalleşme olasılığının önlenmesi açısından dondurulmuş sperma içeren payetlerin yüksek sıcaklıklarda hızlı bir şekilde çözündürmesinin gerektiği vurgulanmıştır [108].

Spermatozoonların gerek dondurulması gerekse çözündürülmesi sırasında bazı kritik sıcaklık dereceleri vardır. Bu aralıklar hem dondurma hem de çözündürme işlemi sırasında mümkün olduğunca hızlı geçilmesi gerekmektedir. Bu nedenle çözündürme

işlemi de dondurma işlemi kadar önemli bir aşama olarak kabul edilmektedir. Çözdürülen payetlerde spermatozoonların canlılığı, hareketliliği ve yapısal bütünlüğü üzerindeki olumsuz etkileri azaltmak için çözdürme sırasında özellikle -50 °C ile -5 °C arasındaki sıcaklık aralığının mümkün olduğunca hızlı bir şekilde geçilmesi gereklidir. Bu da ancak yüksek çözülme sıcaklığının sağlanması ile mümkün olduğu bildirmişlerdir [106]. Günümüzde payet üretim merkezleri, dondurulmuş sperma payetlerini sıcak su içerisinde çözdürme yöntemini önermektedirler [109].

Bu konuda yapılan çalışmalarda en iyi çözdürme yönteminin dondurulmuş sperma payetlerinin 75 °C'deki su banyosunda 7 saniye tutulması ile sağlanabileceği belirtilmektedir. Çünkü bu sıcaklık derecesinde kritik sıcaklık aralığı oldukça hızlı bir şekilde geçilmektedir. Ancak bu yöntemin saha şartlarında uygulaması çok da kolay olmayıp dikkatli bir şekilde zamanlanması gerekmektedir. Yüksek su sıcaklığının değişkenlik göstermesi veya çözdürülen payetin suyun içerisinde daha uzun bir süre kalması, payetin dış yüzeyi geniş, iç yüzeyi ise az hacimli olmasına bağlı olarak sıcaklık değişikliğine karşı oldukça duyarlı olması nedeniyle payet iç sıcaklığının 41 °C'nin üzerine çıkma ihtimalini oluşturur. Bu durum ise spermatozoonların ölümüne yol açabileceğini bildirmiştir [105].

Dondurulmuş sperma payetlerinin çözdürülmesi amacıyla pratik olarak kullanılan en iyi sıcaklık derecesi 38 °C olarak belirlenmiştir. Su banyosunun sıcaklığının 38 °C olmasının önemli avantajları kolay ayarlanabilir olması ve payetin bu sıcaklıkta uzun süre tutulması halinde bile spermanın sıcaklığının hayvanın vücut sıcaklığını derecesinin üzerine çıkamamasıdır. Çünkü payet iç sıcaklığının çözülme sonrasında vücut sıcaklığının üzerine çıkması, özellikle fekondasyon oranının azalmasına ve erken embriyonik ölüm riskinin artırmasına yol açabilir. Diğer taraftan, payetin su banyosunda tutulma süresi de oldukça önemlidir. Su banyosunda payetin 38 °C'de 9 saniye süreyle tutulması halinde payetin iç sıcaklığı yaklaşık 5 °C'ye yükselmekte olup bu sıcaklık derecesi motiliteyi olumsuz yönde etkilemektedir. Buna karşılık 25 saniye süreyle tutulması halinde ise payetin iç sıcaklığı 20-22 °C'ye yükselmektedir. Bu yüzden günümüzde 0,25 ml hacmindeki mini payetlerin saha şartlarında çözdürülmesi amacıyla pratik olarak uygulanan en iyi yöntemin 38 °C'deki sıcak su banyosu içerisinde 25 saniye süreyle tutularak çözdürülmesi olarak kabul edildiğini bildirmişlerdir [110-111].

## 1.11 DNA Hasarı

Sperm hücrelerinin kriyoprezervasyonu sırasında düşük ısılarla maruz bırakılarak dondurulup çözdürüldükten sonra, çeşitli iç ve dış nedenlerden dolayı deoksiribo nükleik asit (DNA)'in yapısında farklı oranlarda hasarlar meydana geldiği görülmektedir. Bu uygulamanın spermlerde geri dönüşümsüz hasarlara neden olduğu ve spermlerin hücre bütünlüğü, morfolojisi ve motilitesini olumsuz yönde etkilediğini bildirmişlerdir [112]. Sperm DNA'sında tespit edilen bu hasarlardan bir kaçı; kromatin yapısının bozulması, DNA bazlarının oksidasyonu, yanlış eşleşmesi, bazların kimyasal olarak değişmesi, kromatin yapısındaki anomaliler, DNA zincirinin kırılması, DNA'da mutasyonlar gibi bir takım yapısal bozulmalar örnek olarak gösterilebilir [113]. Bu durum, sperm canlılık ve fertilizasyon kapasitesinin azalmasına ve hareketlilik oranında düşüşe neden olmaktadır [114]. Spermanın DNA yapısında görülen bu hasarların belirlenmesi amacıyla tek hücre jel elektroforezi (Comet Analizi), tunel, spermatozoon kromatin yapısı analizi gibi birçok metot kullanılmaktadır [115-116].

Sperm kriyoprezervasyonu (dondurma) diğer canlı çalışılan tüm alanlar için önemli olduğu gibi hayvansal üretimde de sağlıklı ve üstün özelliklere sahip ırkların sonraki nesillere aktarımı için oldukça önemlidir. Bu çalışma ise mevsim dışı gökkuşuğu alabalığı üretiminde tamamen dişi veya steril (kısır) balıkların üretimini sağlamak için amacı ile yapılmıştır.



## Bölüm 2

### Literatür Özetleri

Günümüzde yapılan çoğu çalışmanın ve üretimin amacı; belirli maliyetle birim alandan en yüksek faydaya ulaşmaktır. Bilim insanları yıllar boyu evcilleştirilmiş veya yabancı bitki ya da hayvan türleri üzerinde farklı biyoteknolojik yöntemler geliştirilerek ve uygulanarak daha fazla bilgi ve kazanım elde etmişlerdir. Yapılan bu çalışmalar içerisinde özellikle balıklarda cinsiyet değiştirme; genetik açıdan cinsiyetin değiştirilmeden fenotipik cinsiyetin değiştirilmesi, kısırlaştırma (steril), sağlıklı ve nitelikli bireylerin sonraki nesillere aktarımı için sperm dondurma gibi bir çok bilimsel ve biyoteknolojik çalışmalar yapılmış ve yeni çalışmalar yapılmaya devam etmektedir.

Balıklara hormonal uygulamalar yoluyla cinsiyet oranlarının kontrolü, triploidi ve tetraploidi gibi poliploidi uyarımı, ginogenez ve androgenez gibi uniparental kromozom kalıtımı için kromozom takımı manipulasyonları ve gen transferi manipulasyonları, balık kültüründe çoğunlukla tatlı su balıkları üzerinde olmak üzere birçok balık türü üzerinde bütün dünyada uygulandığını bildirmiştir. Bu teknikler, cinsiyet kontrolü, gonadal sterilizasyon, klonlama ve kromozom parça transferi için hızlı bir yaklaşım sağlayan, ürün verimliliğini arttırıcı önemli yöntemler olduğunu tespit etmişlerdir [46].

Cinsiyet kontrolü, tek cinsiyetli gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) elde edilmesine su ürünleri endüstrisine oldukça fayda sağladığını belirtmişlerdir. Tamamı dişi alabalık üretiminde, balıklar henüz cinsel olgunluğa ulaşmadan önce pazarlanabilir [90].

Balık yetiştiriciliğinde tek cins veya steril popülasyonlar üretmek için çeşitli teknikler kullanılabilineceğini bildirmiştir. Tek cinsiyetlilik, sterilizasyon, hibridizasyon, gynogenesis, androgenesis, poliploidi, cinsiyet dönüşümü bunlara örnek olarak sıralamıştır [117].

Son 20 yılda genetik alanında yaşanan hızlı ilerlemeler sayesinde, balık kültüründe uygulanan biyoteknolojik yöntemler gelişmiş ve bunlardan bir kısmı pratikte uygulanabilir olmasına karşın, bir kısmı da ancak laboratuvar koşullarında yapılabilecek düzeyde olduğunu bildirmiştir [118].

İnsan tüketimi dışındaki (Cichlidae, Anabantidae, Poeciliidae) balıklarda da benzer birçok çalışmanın yapıldığını bildirmişlerdir. Balıkların doğal yaşam alanı, testis yapısı, spermatogenez, sperm morfolojisi ve sperm fizyolojisi ile ilgili temel biyolojik özellikleri özetlemişlerdir. İkinci olarak, sperm kriyoprezervasyonunun protokol gelişimini karşılaştırıp, üçüncü olarak da çözülmüş sperm canlılığını değerlendirmek için sperm kriyoprezervasyonunda suni döllemenin önemine değinmişlerdir [119].

Hücre ve dokuların dondurularak saklama yöntemi sperma ve embriyo gibi farklı dokuların saklanması sıklıkla kullanılmaktadır. Su ürünleri yetiştiriciliği konusunda yapılan araştırmalarda, özellikle spermanın dondurulması noktasında yoğun çalışmalar yürütülmektedir. Bugüne kadar 200'den fazla tatlı su ve deniz balığı türünün sperması dondurulduğunu bildirmişlerdir [120-122].

Gökkuşığı alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoanın permeable ve non-permeable kriyoprotektanların etkisini motilite, eozin geçirgenliği (spermatozoa) ve laktatdehidrojenaz aktivitesi üzerindeki etkisini inceledikleri çalışmalarında; %7 ve %20 oranında yumurta sarısı ve %0,5 oranında sükröz ilavesinin bu katkı maddeleri içermeyenlere kıyasla gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) spermasının kalitesini önemli ölçüde artırdığını rapor etmişlerdir [123].

Farklı bir balık türü olan Kuzey turna balığı (*Esox lucius* L.) spermasının dondurulması için yumurta sarısı ve sükrözün uygunluklarını belirlemek adına yedi sulandırıcı, üç çözündürme ortamı ve iki çözünme sıcaklığını test etmişlerdir. Çözdürülen spermanın motilite ile fertilizasyon oranı arasındaki ilişkiyi önemli olduğunu bildirmişlerdir [124].

Dondurma işlemi sırasındaki hücresel hasar; ozmotik şok, hücre içi buz oluşumu, artan hücre içi çözünen konsantrasyon ve çözelti etkilerinden kaynaklandığını tespit etmişlerdir. Dondurma solüsyonlarına kriyoprotektanların eklenmesi, hücre membranını daha esnek hale getirerek çözelti etkilerinden kaynaklanan hasarı azalttığını bildirmişlerdir [125,80,126]. Kriyoprotektanların sperma muhafazasındaki

özellikleri, buldukları ortamdaki iyon sayısının azaltılmaları ve donmamış molekülleri artırmaları olarak tanımlamışlardır [127].

Apoptozis veya programlanmış hücre ölümü, hücresel stresin yanı sıra normal gelişimin bir sonucu olarak ortaya çıkan genle aktive olan bir olaydır. Canlı spermalarında ise apoptozun normal spermatogenez sırasında meydana geldiği ve sperm popülasyonunun kontrolünde önemli bir rol oynadığını göstermişlerdir [128]. Öte yandan, apoptoz; ultraviyole (UV) ışınlar, kimyasal maddeler ve sıcaklık değişiklikleri gibi çeşitli çevresel, kimyasal ve fiziksel faktörler tarafından indüklenebileceğini bildirilmiştir [129].

Blaxter'in 1953'teki ilk çalışmasından bu yana, yaklaşık 30 deniz türü üzerinde balık sperminin kriyoprezervasyonu denendiği bildirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada da, kullanılan teknikleri ve bunlardan elde edilen sonuçları gözden geçirmişlerdir. Dondurma öncesi sperm işleme prosedürüne, sperm yaşlanması sorunlarına ve ovaryum sıvısı ile spermaya kontaminasyonuna özellikle dikkat edilmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Dondurulmuş-çözülmüş semenin kalitesi, farklı türler için uyarlanmış iki adımlı hareketlilik aktivasyon tekniği ve ayırt edici bir tohumlama tekniği kullanılarak döllenme deneyleri gibi önceden standartlaştırılmış biyotestler kullanılarak değerlendirilmiştir. Deniz balıklarında kullanılan sulandırıcıların çoğu tuzlu su veya şeker çözeltileridir. İncelenen kriyoprotektanlardan dimetilsülfoksit (DMSO) genellikle en iyi sonuç verdiğini gözlemlemişlerdir. Tatlı su türleri ile karşılaştırıldığında, yüksek oranda spermatozoa kriyoprezervasyonda canlı kaldığını, bu nedenle deniz balığı spermlerinin de kriyoprezervasyonu su ürünleri yetiştiriciliğindeki uygulamalar için uygun olduğunu bildirmişlerdir [130].

Cinsiyeti tersine dönüştürülmüş dişi gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) (XX) ile normal gökkuşağı erkek (*Oncorhynchus mykiss*) (XY) bireylerde sperm motilitesi, yoğunluğu, adenosin trifosfat ATP konsantrasyonu ve döllenme oranları karşılaştırmışlardır. Sperm özellikleri, döllenme oranları ve özellikleri arasındaki ilişkiler, bireysel balık ağırlığının istatistikleri, gonadosomatik indekslerini değerlendirmişlerdir. Döllenme oranını dönmüş erkekler ile normal erkeklerden alınan spermlerde sırasıyla ortalama %81 ve %16 olarak tespit etmişlerdir. Dönüştürülmüş dişilerin spermleri, normal erkeklerden alınan testis spermleri daha kısa süreli motiliteye sahip olduğunu ve dönüştürülmüş balıklardan elde edilen testis

spermelerinden daha düşük dölleme oranlarına sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Dölleme oranlarının yüksek sperm motilitesi ile pozitif korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir [131].

Diğer bir önemli faktör de, sulandırıcıda geçirgen (P-CPA) (Gliserol, DMSO (Dimetilsülfoksit), etilen glikol ve propilen glikol (ProH) ve methanol) ve geçirgen olmayan (NP-CPA) (monosakkaritler (glukoz, hekzoz), disakkaritler (sükroz) ve trisakkaritler (raffinoz)) kriyoprotektanlar kullanarak en iyi sulandırıcı solüsyonu elde edebilmektir. Bunun nedeni, hücre içi ve hücre dışı buz oluşumunun neden olduğu sperm hasarlarının azaltılması ve yumurta dölleme oranının iyileştirdiğini bildirmişlerdir [132-133]. Bu amaçla yapılan çalışmalarda, çeşitli şekerlerin donma-çözülme kaynaklı hasara karşı kriyoprotektif özellikleri çeşitli hücre tiplerinde rapor edilmiştir [134-135].

Dondurma işlemi, soğutmanın bir sonucu olup suyun sıvı halinden katı hale geçmesi olayıdır. Bu durumda tüm moleküllerin hareketi inhibe edildiğinden tüm biyolojik ve biyokimyasal olayların durduğu bildirilmiştir. Sperm dondurma işleminde de yavaşça soğutulan sperma donmuş duruma girmeden önce yeterince dehidre edilebilirse, çözünme sırasında hücre içi donma hasarı en aza indirilmiş olur. Çözünmenin ardından spermatozoon yeniden su alır ve ozmotik stres ile ilişkili spermatozoon plazma membranında hasar meydana gelebilir. Yeniden kristalleşme olaylarıyla ilişkili hücre içi stresin, donma hasarının ana nedeni olduğu düşünülmektedir. Bu hasar donmuş haldeki hızlı çözünme ile en aza indirilebilir [125].

Sazan balığı (*Cyprinus carpio*) spermasının farklı sulandırıcılarla dondurulması üzerine yaptıkları çalışmalarında, beş sulandırıcıdan üçü şekerlerden (300 mM sükroz, 350 mM glukoz, 350 mM fruktoz) ve ikisi hücre içi kriyoprotektandan (dimetil-sülfoksit (DMSO) ve metanol) oluşmuştur. Bu sulandırıcıların sazan spermasının dondurulmasındaki etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda; DMSO- sükrozmotilite oranını %29; fertilizasyon oranını %21 belirlerken yumurta açılım oranını %9 olarak tespit etmişlerdir. Metanol ile kombinasyon halinde sakkaroz, fruktoz ve glukoz sulandırıcılar ile dondurulmuş sperma ile döllemiş yumurtaların kuluçka oranları, DMSO varlığında dondurulmuş eşdeğerlerinden anlamlı derecede farklı bulmuşlardır (tüm sulandırıcılar için  $P < 0.001$ ). Elde ettikleri sonuçlar ışığında;

metanol ile birleştirilmiş şeker esaslı sulandırıcılarda yüksek hareketlilik, dölleme ve yumurta açılma oranları gözlemlenmiştir [136].

Balık sperması gonadlarda hareketsizdir. Tatlısu balıklarındaki spermatozoa hareketini hiperozmotik ortam başlatmaktadır. Ozmotik basınç, pH, sıcaklık ve iyon konsantrasyonu spermatozoa hareketini etkilemektedir. Sulandırıcı, spermatozoonun aktivasyonunu inhibe eder ve hücrel enerjiyi koruyarak canlılığın korunmasını sağlar. İdeal bir sulandırıcı izotoniktir ve iyi bir tamponlama kapasitesine sahiptir. Besin maddeleri, stabilize edici kolloidler ve antioksidanlar içerir. Aynı zamanda antibakteriyeldir ve genellikle iyi kalitede bir korumaya sahip olduğunu bildirmişlerdir [137].

Sperm kriyoprezervasyon işlemi sırasında düşük sıcaklıkların sperm şiddetli ozmotik değişim stresi nedeni ile hücre bütünlüğünü bozabileceğini bildirmiştir. Hücre plazma zarına verilen hasar, bir dizi hücrel yapıda ve ilgili işlevlerde hücre hasarı ile sonuçlanacaktır. Yazarın laboratuvarındaki çalışmalar, plazma zarı lipid yapısı, mitokondriyal zar potansiyeli ve hücre içi sinyalleşme dahil olmak üzere ozmotik ve termal hasarın çeşitli mekanizmaları üzerinde durulmuştur. Somatik hücrelerde olduğu gibi spermde kriyo yaralanmasının çok faktörlü bir olay olduğunu ve bu olayların bazılarının geri dönüşümlü olduğunu, bazılarının ise geri dönülemez hasarlar aldığını tespit etmişlerdir [138].

Spermanın dondurulması sırasında hasar, spermatozoonun plazma zarı üzerindeki, dondurma işleminin zararlı etkileri nedeniyle, motil spermatozoa sayısındaki azalma ile karakterize edildiğinden, çözüm sonu spermatozoa canlılığının artırılması, oksidatif ve osmotik hasarın azaltılması en temel gaye olarak karşımıza çıkmaktadır ([139-140]. Donma ve çözülmenin spermatozoonun plazma zarı üzerindeki zarar verici etkileri, spermatozoonun fertilizasyon yeteneğini düşürebilmektedir. Spermanın dondurma hasarı; spermatozoon motilitesindeki bozulma, spermatozoon morfolojisindeki değişiklikler ve akrozomun hasarı ile de ilişkilendirilmiştir [141-143].

Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) spermasını altı şeker (sükroz, maltoz, trehaloz, galaktoz, fruktoz ve glikoz) ve üç farklı konsantrasyonda (125, 250 ve 500 mM) test ettiğinde ve 125 mM'deki sükrozun en çok faydalı olduğunu rapor etmiştir [144]. Benzer şekilde, sükrozun trehaloz ile beraber sulandırıcı solüsyonunda

kullanılmasının, adi sazan spermatozoasında daha yüksek çözülme sonrası motilite oranları verdiği gösterdiğini bildirmişlerdir [145]. Yapılan başka bir çalışmada ise sükrozun sulandırıcının bir bileşeni olarak kullanılmasının, sazan (*Cyprinus carpio*) spermasında çözülme sonrası motilite oranlarını ve motilite sürelerini iyileştirdiğini bildirilmişlerdir [146].

Yaptıkları çalışmada kemikli balık türlerinden teleost tatlısu gelinciği (*Lota lota*), tatlısu levreği (*Perca fluviatilis*), inci balığı (*Alburnus alburnus*), kahverengi alabalığı (*Salmo trutta*) gibi balıkların sperm dondurma ve muhafazasında antioksidanların ve oksidan savunma enzimlerinin, in vitro deneylerde sperm koruyucu etkileri üzerinde çalışmışlardır. Spermatozoa, antioksidanlar veya enzimler içeren sperm motilitesini inhibe eden tuz solüsyonlarında inkübe edemiş ve ardından spermatozoalar aktive edilerek ölçümlerini yapmışlardır. Bunun sonucunda membran bütünlüğü ve sperm lipid peroksidasyonu belirlenmiştir. Yapılan deneylerde, ürik asidin, sperm motilitesini ve membran bütünlüğünü iyileştirdiği ve sperm lipid peroksidasyonunu azalttığı için araştırılan türlerin sperminin ana antioksidanı olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, sperm kalitesini artırmak için sperm seyrelticilerinin ürik asit ile desteklenmesi önerilebilir, bu sayede incelenen tüm türler için etkin konsantrasyon 0,5 mmol/L'dir. Ayrıca metionin, teleost balık sperminde antioksidan olarak önemlidir, bu sayede oksitlenmiş formun (metiyonin sülfoksit) sperm hareketliliğini ve zar bütünlüğünü arttırmada en etkili olduğunu bildirmişlerdir [147].

Balık spermasının dondurularak saklanması iyi bilinmesi; ani hastalık salgını, doğal afet, aşırı tüketim vb. nedeniyle oluşabilecek kayıplara karşı stokların korunması gibi birçok alanda fayda sunacağı rapor edilmiştir. Tür farklılıkları nedeniyle mevcut teknolojiye, kriyoprotektana ve donmaya karşı verilen tepki hücreye göre değiştiğinden, balık spermatozoa dondurulması için tek bir evrensel protokol önerilememektedir. Bu nedenle, her bir balık türü için bazı genel kurallar uygulanmasına rağmen, her bir tür için dondurma protokolünün optimizasyonun da gerektiğini vurgulanmaktadır [148,126].

Hızlı çözünmede donmuş sperma tamamen çözülmeden önce yeniden kristalleşmenin gerçekleşmesi için kısa bir zaman vardır [72,126]. Çözülme sıcaklığının donma sonrası spermatozoon canlılığı üzerinde derin etkileri vardır. Bazı tatlı su balık

türlerinin donmuş spermalarının çözülmesi 30-80 °C'de su banyosunda yapılır. Ancak, her bir balık grubu için sperm fizyolojisindeki büyük değişkenlik nedeniyle standardize edilmesi gerekir [149]. Uygulamada, sazan (*Cyprinus carpio*) donmuş spermaları genellikle 30-35 °C su banyosunda çözündürülür. Bazı soğuk su balıkları için, doğal üreme ortamı sıcaklığında (20-25 °C) donmuş spermanın çözülmesi avantajlı olduğunu bildirilmiştir [126].

Balık spermalarının da dondurularak muhafaza edilmesi, özellikle gökkuşaiğı alabalığı (*O. mykiss*) yetiştiriciliğinde büyük bir potansiyele sahip olduğunu dondurulan ve çözündürülen sperm hücrelerinin fizyolojik ve fonksiyonel özelliklerinin anlaşılması, kriyoprezervasyonun işleminin sperm hücreleri üzerine olan etkileri olduğunu ve kriyoprezervasyon işleminin genetik kaynakların gelecek nesillere aktarılması önemli bir konu olduğunu bildirmiştir [150].

Yapmış olduğu bu çalışmada, dondurularak saklama ve katkı maddelerinin büyük sarı şarlatan balığı (*Pseudosciaena croce*)'nın spermının plazma zarı stabilitesi, hareketliliği, enzim aktivitesi, zar lipid bileşimi ve ultrastrüktürel hasarı üzerindeki etkisi incelenmiştir. Sonuçlar, trehaloz (TH) ve bovin serum albumin (BSA) ilavesinin sükroza kıyasla motilite testinde önemli ölçüde daha iyi sonuçlar verdiğini göstermiştir [151].

Hayvan türlerinde erkeklerde spermatozoon nükleer DNA'sının donma-çözülme işlemi ile önemli derecede hasar görüldüğünü tespit etmişlerdir [152-153]. Balık spermatozoonundaki dondurma sonucunda kaçınılmaz bir şekilde ortaya çıkabilen hasarları azaltmak ve dolayısıyla sperma dondurulmasının sonuçlarını iyileştirmek için stratejilere ihtiyaç duyulduğunu bildirmişlerdir [116].

Benzer şekilde, farklı bir tür olan dev grami (*Osphronemus goram*)'de farklı oranlarda sükroz konsantrasyonlarını (%0, %0,1, %0,3, %0,5, %0,7 ve %0,9) ilave ettikleri sulandırıcıları kullanarak dondurdukları spermalarda çözüm sonrası etkileri incelemişlerdir. İnceleme sonucunda; spermatozoa motilite oranı, canlılığı ve anormal spermatozoa üzerinde kontrole (sükroz %0,0) kıyasla %0,5'lik sükroz konsantrasyonun önemli etkisi ( $P < 0,05$ ) belirlenirken, sırasıyla çözündürülmüş spermatozoa motilite, canlılığı ve anormal spermatozoa üzerinde önemli bir fark göstermiştir ( $P < 0,01$ ). Yüzde 0,5 oranında katılan sükrozun çözüm sonrası en yüksek

spermatozoa motilite oranı (%81,62±4,19) ve çözüm sonrası spermatozoa canlılığını (%82,17 ± 2,56) ve en düşük çözüm sonrası anormal spermatozoa (%12,50±1,52) tespit edilerek, bu orandaki sükrözün, çalışmadaki optimum sükröz konsantrasyonunu olarak ortaya çıktığı rapor edildiğini bildirmişlerdir [154].

Cinsiyeti dönüştürülmüş dişi gökkuşacağı alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) sperminin biyokimyasal (protein konsantrasyonu, ozmolalite, antitripsin aktivitesi, laktat dehidrojenaz aktivitesi) ve fizyolojik özellikleri ile sperm motilite özelliklerini incelemiştir. Cinsiyeti tersine (dişiden erkeğe) dönüştürmek için 11-hidroksiyandrostendion uygulaması yapmışlardır. Çalışma sonunda elde edilen spermlerin konsantrasyonunun yanı sıra protein konsantrasyonu, ozmolalite, antitripsin aktivitesi ve laktat dehidrojenaz cinsiyeti dönüştürülmüş dişilerin seminal plazmasındaki aktivite normal erkek gökkuşacağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) için elde edilen değerler aktivitesine göre daha yüksek olduğunu gözlemlemiştir. Bu parametrelerin değerleri, dönüşmüş dişilerin (XX) döllenme oranlarının daha yüksek (% 90'ın üzerinde) olduğunu bildirmişlerdir. Gözli embriyoların ve yumurtadan çıkan larvaların yüzdesi ve sperm motilitesi ile doğrudan ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Kalite arasındaki korelasyonlar dönüştürülmüş dişi bireylerin sperm parametreleri, normal erkek gökkuşacağının spermi kadar başarılı olduğunu bildirmişlerdir [55].

Cinsiyeti tersine dönüştürülmüş gökkuşacağı alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoası üzerinde vitrifikasyon yöntemini uygulamışlar ve sakaroz, dimetil sülfoksit (DMSO), sığır serum albümini (SSA) ve seminal plazma kullanmışlardır. Hücreleri soğuk şoku hasarından korumak için seminal plazma (SP) hazırlamışlardır. Vitrifikasyon ortamını balıklar için standart bir tampondan (Cortland) +% 10 DMSO +% 2 BSA + 0.13 M sukroz + SP konsantrasyonlarda %30 (grup 1), % 40 (grup 2) ve %50 (grup 3) gruplar oluşturmuşlardır. Kontrol olarak taze sperm kullanmışlardır. Kriyoprezervasyon işleminden sonra sıvı nitrojen içerisinde muhafaza etmişlerdir. Çözüm için, vitrifiye spermatozoa ile kriyotüpleri 37 °C'de 60 saniye boyunca su banyosunda tutmuşlardır. Spermatozoa kalite parametreleri, en yüksek konsantrasyon (%50) kullanıldığında en iyi sonuçların elde edildiğini belirlemişler, canlılık oranını ise %97,3 olarak tespit etmişlerdir [155].

Sperm kriyoprezervasyonu için bir seyreltici olarak %9 metanol ve 0,18 M glikozun etkisini araştırmışlardır. Cinsiyet dönüşümü için gökkuşacağı alabalığı dişileri



kullanmışlardır. Kriyoprezervasyon işlemi sonrası, motilite oranı ve canlılık parametrelerinin yanı sıra gözlenme, kuluçkadaki dölleme oranı, çözülme sonrası sperm için değerlendirmişlerdir. Kriyoprezervasyon işleminden sonra dölleme başarısını yaklaşık %80 olarak tespit etmişlerdir [156].

Yapmış oldukları bir çalışmada farklı antioksidanların [katalaz (250 U / l), süperoksit dismutaz (250 U / l), peroksidaz (250 U / l), oksitlenmiş glutatyon (1.5 mmol / l), indirgenmiş glutatyon (1.5 mmol / l), l-metiyonin (1.5 mmol / l), ürik asit (0.25 mmol / l), l-askorbik asit (0.5 mmol / l),  $\alpha$ -tokoferol (2.0 mmol / l),  $\beta$ -karoten (0.5 mmol / l) ve karnitin (0.5 mmol / l)] sulandırıcılara eklenmesinin gökkuşığı alabalığında (*O. mykiss*) sperm kriyoprezervasyonu ve çözüm sonrası dölleme oranı ve motilite üzerine etkisi olup olmadığını araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada, ürik asit, l-metiyonin, SOD, L- karnitin,  $\alpha$ -tokoferol ve L-indirgenmiş glutatyon ( $p<0.05$ ) ile desteklenen sulandırıcılarda çözüm sonrası motilite oranının arttığını belirlemişler ve gökkuşığı alabalığının sperm hücrelerinin uzun süreli muhafazasında antioksidanların kullanımını önermişlerdir [157].

Cinsiyeti dönüştürülmüş gökkuşığı alabalığının gonadlarından elde edilen sperm kriyoprezervasyonu üzerinde çalışmışlar ve dölleme oranını belirlemişlerdir. Çözüm sonrası sperm motilite yüzdesi %56 olarak belirlemişlerdir. Yumurtaların açılma oranlarını ise %83-93 oranında bildirmişlerdir. Çalışmanın amacına uygun olumlu sonuçlar alındığını ve çalışmaların devam etmesi gerektiğini belirtmişlerdir [89].

Sulandırıcıların sperm hareketliliği üzerindeki potansiyelini değerlendirmek ve gökkuşığı alabalığı (*O. mykiss*) sperminde sitoiluent bileşiminin çözülme sonrası motilite, dölleme ve kuluçka yüzdesi üzerindeki etkisini belirlemiştir. Çalışmalarında ortalama ağırlığı  $340\pm 15$  gr ve ortalama boyu  $28,8\pm 0,6$  cm olan gökkuşığı alabalığının olgun erkekleri kullanmışlardır. Kriyoprotektanların uygunluğunu test etmek için yapılan denemelerde, DMSO, Zhang ve Liu ve 0,6 M Sükroz sulandırıcılar ile daha yüksek motilite yüzdesi elde etmişlerdir. Genel olarak, sonuçlar (%8 DMSO + Zhang ve Liu) kombinasyonunun çözülme sonrası hareketlilik, dölleme ve çıkış yüzdesi açısından en iyi sonuçları verdiğini bildirmişlerdir [158].

Yapmış oldukları bu çalışmada, kriyoprotektanların ve sulandırıcıların çözülme sonrası sperm kalitesi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Üç farklı kriyoprotektan

(DMSO, metanol ve metil glikol) ve iki genişleticinin (BTS ve glukoz) kombinasyonunu içeren altı dondurma ortamı oluşturmuşlar. Sperm seyreltikten sonra 0.5 mL'lik payetlere çekilerek sıvı nitrojen buhar kabında dondurulmuş ve -196 °C'de sıvı nitrojen içinde muhafaza edilmiştir. Çözülme sonrası sperm motilite oranı ve hızları (eğrisel = VCL; düz çizgi = VSL; ortalama yol = VAP) bilgisayar destekli bir sperm analizörü kullanılarak değerlendirilmiştir. Çözülme sonrası elde edilen veriler; motilite %60 hareketli sperm, dikey katedilen yol; 140 µm/sn VCL, %50 sağlam sperm zarı ve %50 mitokondriyal fonksiyon bütünlüğü olduğunu tespit etmişlerdir. BTS-metil glikolde dondurulan *B. orbignyanus* spermünde ve BTS-metil glikol, glikoz-metil glikol ve glikoz-metanolda dondurulan *P. lineatus* spermünde yüksek çözülme sonrası kalite gözlenirken, DMSO içinde dondurulan tüm numuneler düşük kalite olduğunu bildirmişlerdir [159].

Tatlı su balıklarından adi sazan balığının (*Cyprinus carpio*) spermasının dondurulmasında farklı şeker türlerini kullanmışlar ve spermatozoa motilite, canlılığı ve fertilizasyon kabiliyeti üzerine etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda farklı şeker türlerinin; spermatozoada hareketlilik, hareketlilik süresi ve canlılık oranlarını önemli ölçüde etkilediğini ifade etmişlerdir ( $P < 0,05$ ). Glikoz, maltoz, sakaroz ve trehaloz, dondurulan spermatozoalarda çözüm sonrası şekersiz kontrole oranla daha yüksek hareketlilik sağlamıştır. Trehaloz, en yüksek progresif motilite süresini sağlarken, ksiloz dışındaki tüm şeker türleri ile daha yüksek canlı sperm oranları elde edildiğini bildirmiştir [160].

Farklı şeker türleri ile dondurularak saklanan sazan spermatozoalarının ortalama en yüksek dölllenme ( $78,20 \pm 1,40$ ) ve gözlü yumurta oranları ( $94,30 \pm 1,50$ ) sulandırıcıda trehaloz kullanıldığında elde edilmiştir ( $P < 0,05$ ). 8-OHdG ve COMET testi, oksidatif DNA hasarının güvenilir belirteci olarak kabul edilen yaygın yöntemlerden biri olduğunu bildirmişlerdir (Shigenaga ve ark., 1994; Sandoval-Vargas ve ark., 2021). Levrek (*Dicentrarchus labrax*) sperması kuyruklu yıldız tahlili, taze spermle karşılaştırıldığında donmuş çözülmüş sperma örneklerinde önemli bir DNA parçalanmasının gerçekleştiğini açıkça görüldüğünü tespit etmişlerdir [161]. Ayrıca, önceki çalışma sonuçları, akrilamid iyileştirmesinin, melatonin ilave edildiğinde yüksek bir plazma 8-OHdG düzeyi ile sonuçlandığını bildirmişlerdir [162].

Sperm sulandırıcısına katkı maddesi olarak metanol kullanan bir kriyoprezervasyon prosedürünün olup olmadığını belirlemeye çalışmışlar ve gökkuşuğu alabalığı spermine (*O. mykiss*) eksternal bir kriyoprotektan olarak trehaloz uygulanabileceğini bildirmişlerdir. Başlangıçta, potasyum iyonlarının ve Tris-HCl'nin çözülme sonrası sperm motilitesi, canlılığı ve dölleme kapasitesi üzerindeki etkileri analiz etmişlerdir. Bu çalışmada ilk kez trehaloz ve metanol bazlı bir seyreltici kullanılmışlardır. Trehalozun, % 10 metanol (v/v) ile ilave edildiğinde 175 ila 200 mM arasında değişen konsantrasyonlarda gökkuşuğu alabalığı sperm muhafazasında etkili olduğu göstermişlerdir. En etkili seyreltme oranını 1:11.5 olarak belirlemişler ve bu da 0,8 ila 0,10 arasında değişen nihai bir sperm konsantrasyonu ile sonuçlandığını bildirmişlerdir. Trehaloz bazlı bir extender uygulaması ile başarılı bir şekilde kriyoprezervasyona tabi tutulabileceğini belirtmişlerdir. Benzer çalışmaların artan balıkçılık uygulamaları için spermin zaman içinde uzun süre kullanılmasına olanak sağlayacağı bildirmişlerdir [163].

Kriyoprezervasyon işleminin dönüştürülmüş dişilerin sperm kalitesinde çözüm sonrası farklı muhafaza sürelerinin (0, 15, 60 ve 120 dk) sperm kalitesi üzerindeki etkilerini çalışmışlardır. Kriyoprezervasyon işleminden sonra sperm motilitesini yaklaşık %57 olarak tespit etmişlerdir ve sonuçların taze spermden farklı olmadığını bildirmişlerdir. Beklenmedik bir şekilde, seyreltmeden hemen sonra sperm aktivasyon kapasitesinin azalttığını ancak sperm hareketliliği zaman içinde arttığını gözlemlemişlerdir. Donmuş-çözülmüş spermin dölleme oranlarının (%71-87) yüksek olduğunu ve denemesi yapılan örneklerin depolama sürelerinden herhangi birinde deneysel varyantlar arasında anlamlı farklılık gösterdiğini belirlemişlerdir. Olgunlaşma ortamının donmuş-çözülmüş sperm üzerindeki etkisinin, taze spermadan farklı olduğunu bildirmişlerdir [164].

Yapılan bu çalışmada, son yıllarda nesli tükenmekte olan canlılar arasında olan Anadolu alabalığı (*Salmo rizeensis*) spermi için borik asidin yararlılığını araştırmışlardır. Aktivasyon ortamı borik asit (0,5, 1, 2, 3, 4 ve 5 mM) ile desteklenmiştir. Sperm örneklerinde sperm motilitesi ve süresi belirlemişlerdir. Ayrıca balıkların doğurganlık ve kuluçka oranları incelenmiştir. Veriler, aktivasyon ortamına borik asit (3 mM) ilavesinin nesli tükenmekte olan Anadolu alabalığında hareketli sperm yüzdesini ve süresini, doğurganlığı ve kuluçka oranını arttırdığını göstermiştir.

Öte yandan, borik asit konsantrasyonunun artmasıyla motilite hızı azalmıştır ( $p<0.05$ ). Özellikle, 3 mM konsantrasyondan sonra dikkate değer bir artış gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Sonuç olarak çalışmada, sperm kalitesi, farklı borik asit konsantrasyonlarındaki kantitatif değişikliklerden etkilenmiş ve en iyi sonuçlar 3 mM konsantrasyonda tespit etmişlerdir [165].

Sperm kriyoprezervasyonunda uygulanan dondurma ve çözündürme işleminin spermelere çeşitli zararlar vermesi muhtemel bir işlem olarak kabul edildiğini bildirmiş ve bu işlemin spermelerde geri dönüşümsüz hasarlara yol açtığı ve spermelerin membran bütünlüğü, morfolojisi ve hareketliliğini de etkilediğini bildirmişlerdir [112].

Molise nehirlerinde yaşayan yerli Akdeniz kahverengi alabalığının (*Salmo trutta*) sperminin dondurma protokolünü iki deney optimizasyonu ile ilgili yaptıkları çalışmada sperminin çözüm sonrası kalitesi, motilitesi, motilite süresi, DNA bütünlüğü dikkate alınarak değerlendirme yapmışlardır. Bazik sulandırıcı ve kriyoprotektanın bu değişkenler üzerinde önemli etkilere sahip olduğunu bildirmişlerdir. Çalışma sonuçlarına göre en iyi sonuçları, dimetilsülfoksit (DMSO) ile kombine edilmiş sulandırıcı kullanılarak elde edilmiştir ( $P<0.05$ ). Taze sperminin dölleme ve yumurtadan çıkım oranları, dondurulup çözülen spermaya göre önemli ölçüde daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Çalışma sonucunda DMSO ile kombine edilmiş sulandırıcı alabalık sperması için etkili bir saklama solusyonu kombinasyonu olduğunu göstermişlerdir [166].

Cinsiyet dönüşümü (XX) yapılmış dişi gökkuşaağı alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) ve dere alabalığının (*Salmo trutta fario*), taze ve dondurulmuş sperm kalitesini karşılaştırmışlardır. Taze spermalarda dişi dere alabalıklarının spermelerinin hareketliliği ile dönüştürülmüş gökkuşaağı alabalığının sperm hareketliliği ile benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Ancak dondurulduktan sonra çözdürülen dönüştürülmüş dişi gökkuşaağı alabalığı ve dişi dere alabalığı spermeleri arasındaki dondurulabilirlik açısından farklılıklar gösterdiğini bildirmişlerdir. Buna göre, sperm kriyoprezervasyon prosedürünü standartlaştırmak ve tekrarlanabilir prosedürlerin geliştirilmesi, gelecekte dondurulmuş spermin kuluçkahanelerde uygulamasına katkı sağlayacağını bildirmişlerdir [167].

Reaktif oksijen türleri (ROS) tarafından spermatozoaya verilen hasarın spermilerin dölleme yeteneklerini olumsuz etkilediği birçok bilimsel çalışmada bildirilmektedir. Seminal plazma içeriğinde, spermleri oksidatif strese karşı koruyan birçok enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan barındırmaktadır. Bu çalışma, sazan (*Cyprinus carpio*) seminal plazmanın ayrılmış protein fraksiyonlarında süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon peroksidaz (GPx) seviyelerini karşılaştırmak için yapılmıştır. Altı erkek sazan balığından alınan seminal plazma, dört fraksiyona ayırmışlardır. Fraksiyonlar, toplam seminal plazma protein içeriği ve antioksidan durumu bakımından birbirinden farklı olduğunu bildirmişlerdir. Farklı seminal plazma fraksiyonlarının antioksidan kapasitede farklılık gösterdiği sonucuna vardıklarını, yüksek SOD, GR ve GPx seviyelerine sahip fraksiyonların ise sperm dondurma ve muhafazaya dahil edilmesi, oksidatif strese karşı korumayı artırabileceğini ve in vitro muhafaza sırasında spermin hayatta kalmasını sağlayabileceğini bildirmişlerdir [168].

Farklı zamanlarda dondurularak saklanan, dönüştürülmüş dişi ve normal erkek gökkuşuğu alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) sperm kalitesini karşılaştırmışlardır. Bu tür bir yaklaşım, normal erkeklerin spermatozoalarının ve dönüştürülmüş dişilerin, oksidatif stres mekanizmasının daha iyi anlaşılması için ön koşul olan oksidatif strese tepkisinin özelliklerini tanımlamaya çalışmışlardır. Glikoz konsantrasyonu, çözüm sonrası sperm hareketliliğini, eğrisel hızı ve canlılığı önemli ölçüde etkilediğini bildirmişlerdir. Sulandırıcının osmolalitesinin artırılmasının, dönüştürülmüş dişi ve normal erkek gökkuşuğu alabalığının spermatozoasında oksidatif strese neden olduğunu göstermiştir. Değişikliklerin çoğu donma ve çözülme ile ilgili olduğunu, ancak dengeleme sırasında bazı değişiklikler meydana gelebileceğini bildirmişlerdir. Dönüştürülmüş dişi ve normal erkek gökkuşuğu alabalığından spermalarında oksidatif stres düzeylerinde farklılıklara yol açan mekanizmaları aydınlatmak için daha ileri çalışmalar gerekli olduğunu bildirmişlerdir [169].

Gökkuşuğu alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) dönüştürülmüş dişilerinde spermatik bir kanalın olmaması nedeniyle, sperm doğrudan testislerden diseksiyon yöntemi ile elde etmişlerdir. Hem dönüştürülmüş hem de normal gökkuşuğu alabalığı erkekleri için sperm kalitesi parametreleri belirlemişlerdir. Sperm kalitesindeki önemli değişikliklerin flagella ve hücre hareketi ile ilgili olduğunu ve metabolik proteinler

yapay in vitro olgunlaşmanın kısa döneminde sperm motilitesi, proteine benzerlikler gösterdiğini doğal sperm olgunlaşmasının daha uzun sürecinde meydana gelen değişiklikler olduğunu bildirmişlerdir. Sperm kalitesindeki farklılıkların olmaması ve inkübasyondan sonra dönüştürülmüş ve normal erkekler arasında benzer sperm motilite kazanım modları göstermişlerdir. Bu in vitro olgunlaşmadan sonra proteinlerdeki değişiklikler, alabalık sperminden sonra fark edilen değişikliklerle kısmen örtüştüğünü bildirmişlerdir [170].

Yapılan çalışmalara bakıldığında, kriyoprezervasyonun sperm hücrelerinde apoptotik belirtiler üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalar oldukça sınırlıdır. Kriyoprezervasyonun insan [128,171], yaban domuzu [172], boğa [173-175] ve balık [176] spermatozoa hücrelerinde membran indüklenmesi ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

Bu çalışmada reaktif oksijen türleri (ROS)'nin, kriyoprezervasyon sırasında balık sperm yapısının bütünlüğünün ve işlevselliğinin bozulmasının ana nedenlerinden biri olduğu öne sürülmüştür. Sperm hücrelerindeki yüksek doymamış yağ asitleri içeriği ve seyreltilmiş spermanın düşük antioksidan kapasitesi, sperm hücrelerini ROS saldırılarına duyarlı hale getirmede anahtar rol oynamaktadır. Bu nedenle, son zamanlarda yapılan bazı araştırmalar, balık türlerinin seminal plazma ve spermatozoalarının antioksidan durumunu belirlemişlerdir. Buna ek olarak, bazı çalışmalar antioksidanların çözülme sonrası sperm kalitesi üzerindeki etkilerini değerlendirmiştir. ROS kesinlikle sperm hasarına dahil olsa da, buz kristali oluşumu gibi diğer faktörlerin kriyo hasarda çok önemli bir rol oynadığı gözlemlenmiştir [177]. Dondurma sırasında oluşabilecek hasarın henüz çözülmediğini çünkü hem spermin endojen antioksidan kapasitesi hem de farklı takviye uygulamalarına verdiği yanıt, türler arası ve türler arası spesifik özellikler ve etkiler olduğu düşünülmektedir. Bu derleme, gelecekteki çalışmalar için bakış açıları oluşturmak için balık sperminde antioksidan savunma ve oksidatif stresin yanı sıra kriyoprezervasyon ortamında antioksidan takviyesi hakkındaki bilgileri özetlemektedir [178].

Sperm aktivasyon solüsyonuna sistein ilavesinin Çoruh alabalığının (*Salmo coruhensis*) sperm hareketliliği üzerindeki etkisini değerlendirmek için farklı konsantrasyonları [0 mM (Kontrol), 1 mM, 2 mM ve 4 mM] test etmişlerdir. Çalışma ile; sperm motilite özellikleri ve motilite süresini belirlemişler, sistein varlığının sperm

hareketliliğinde bir artışa neden olduğunu tespit etmişlerdir. 2 mM'de süre ( $39,00 \pm 6,98$  sn) ve motilite oranındaki ( $96,67 \pm 5,77$ ) artışlar istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0.05$ ) olduğunu bildirmişlerdir. Genel olarak, aktivasyon solüsyonuna sistein eklenmesinin, Çoruh alabalığının sperm hareketliliğini artırabileceğini ve yüksek dozda sisteinin, sperm hareketliliğinde azalmaya neden olabileceğini bildirmiştir [179].

## Bölüm 3

### Materyal ve Metod

#### 3.1 Denemenin Yapıldığı Yer

Deneme, ülkemizde alabalığın kara tabanlı balık çiftliklerinde yetiştiriciliğinin en yoğun olarak yapıldığı Muğla ili Seydikemer ilçesi Ören mahallesinde faaliyet gösteren ve Türkiye'nin proje kapasitesi en büyük (2500 ton/yıl) kara tabanlı balık çiftliğinin kuluçkahanesinde yürütülmüştür (Şekil 3.1).



Şekil 3. 1: Denemenin yapıldığı Abalıoğlu Balık ve Gıda Ürünleri A.Ş. Alabalık üretim tesisi görünümü / Fethiye

#### 3.2 Hormonlu Yemin Hazırlanması

Bu çalışmaya 2019 yılı kasım ayında başlanmıştır. Denemede kullanılmak üzere fonksiyonel erkek (XX) elde edilmesi için 17 $\alpha$ -metiltestosteron (MT) CPA0225D



Sartorius marka  $d=0,001$  mg hassas terazide tartımı yapılmıştır. Hem işletmenin ihtiyacının karşılanması hem de denemede kullanılacağı planlanarak 5000 adet lavra ayrı bir besleme tankına alınmıştır. Bu programa göre yeterli miktarda ve farklı boyutlardaki (0,3  $\mu\text{m}$ , 0,5  $\mu\text{m}$  ve 0,7  $\mu\text{m}$ ) Nutra Sprint-Skretting marka yemler kullanılarak hazırlanmıştır. Larvalara 600 gün/derece olacak şekilde uygulama yapılacağından (2 mg/kg MT/yem) 5 kg yem için toplamda 10 mg tartım yapılarak 50 ml %96'lık saflıkta ethanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) içerisinde çözdürülerek stok solüsyon oluşturulmuştur. Daha sonra bu stok solüsyondan 1 kg yem için 10 ml çekilip tekrar 200 ml alkolde seyreltilerek yeme püskürtme işlemi ile homojen bir şekilde absorbe edilmesi sağlanmıştır (Şekil 3.2). Çözeltileri absorbe edilen yemler, doğrudan güneş ışığı almayan bir yerde yaklaşık 24 saat boyunca kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra bu yemlerin balıklara uygulama süresince serin yerde muhafaza edilmiştir.



Şekil 3. 2: Hormonun yeme absorbe edilmesi (a) ve kurutulması (b)

Tablo 3. 1: Denemede kullanılan ticari yemin besin içeriği

Temel Besin Değerleri		Mikro Elementler	
Protein	55%	Demir	60 mg/kg
Ham Yağ	15%	İyot	3 mg/kg
Ham Selüloz	0,5%	Bakır	7 mg/kg
Ham Kül	12%	Manganez	22 mg/kg
Vitaminler		Çinko	150 mg/kg
Vit A	4500 IU/kg	Selenyum	0,15 mg/kg
Vit D3	1125 IU/kg	M. Elementler	
Vit E	225 mg/kg	Kalsiyum	2,26%
Aminoasitler		Toplam Fosfor	1,76%
Lizin	4,09%	Sodyum	0,65%
Metiyonin	1,35%		

### 3.3 Fonksiyonel Erkek (XX) Balığın Elde Edilmesi

Bu çalışmada hormon uygulaması sırasında kullanılan ticari bir firmadan temin edilen yemin içeriği Tablo 3. 1’de gösterilmiştir. İçeriği verilen yemlerin balığın büyümesine müteakip yemlerin granül boyutunun da (300 mikron, 500 mikron ve 800 mikron) değişimine dikkat edilmiştir. Hazırlanmış olan hormonlu yemleri, yavru balıkların besin keseleri çekilip dışardan yem almaya başladığı günden itibaren 600 gün/derece olarak uygulanmıştır. Daha sonra işletmede kullanılan yemlerle beslenmeye devam edilmiştir.

Fonksiyonel olarak dönüştürülmüş dişi erkeklerden yaklaşık 1,5-2 yaşlarında olgun sperm alınabilmektedir. Dondurmak için kullanacağımız spermalar, 2019 yılında cinsiyetini tersine dönüştürülmüş (XX) fonksiyonel erkeklerden 2<sup>+</sup> yaş, 6 adet erkek balıkların spermaları kullanılmıştır. Balıkların gonadları çıkarılmadan önce

fenoksiethanol (30 ml/L) ile su karışımı solüsyonda sakınleştirilmiş, boy ve ağırlık ölçümleri Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner Fakültesi Suni Tohumlama Laboratuvarında yapılmıştır. Ölçümler sonucunda balık boyları 52-62±5 cm (ortalama 56 cm) ve ağırlıkları 1510-2175±220 gr olup ortalama ağırlık 1780 gr olarak kaydedilmiştir (Şekil 3. 3).



Şekil 3. 3: Fonksiyonel erkek (XX) damızlık gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)

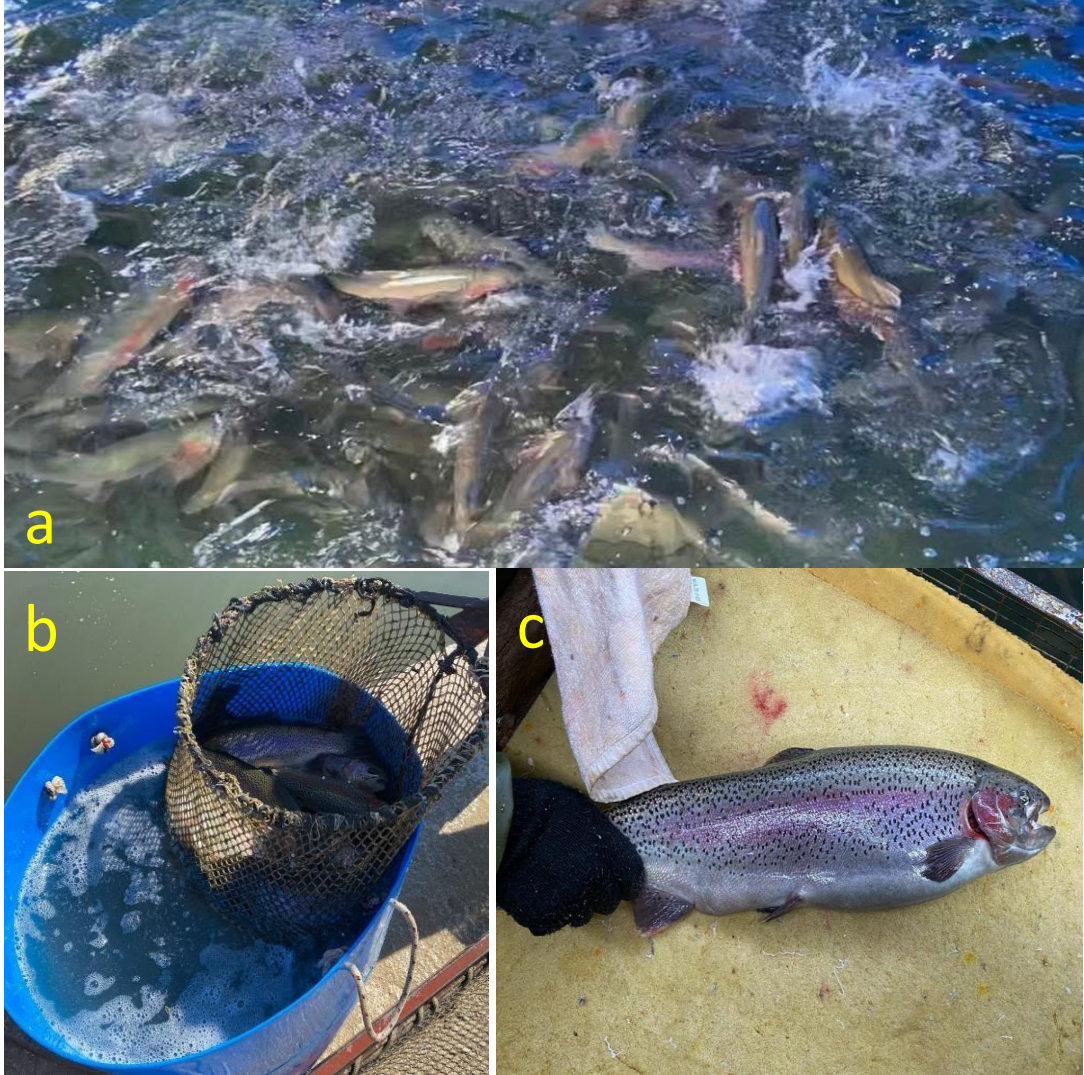
### 3.4 Gonadların Çıkarılması

Cinsiyeti tersine dönüştürülmüş (XX) fonksiyonel erkek balıklar 60 ml/L fenoksiethanol/su karışımı solüsyonunda 15 sn bekletilerek ötenazi uygulanmıştır (Şekil 3. 4). Öldürülen balıkların yaşam ortamındaki su, idrar ve kimyasal gibi parametrelerin spermaya karışması önlenmelidir. Bu belirtilen parametreler spermin motilitesini, motilite süresini, dölleme kabiliyetine olumsuz etkilemektedir [28].

Balıklar çalışma (disekte veya sağım) öncesinde mutlaka en az 2 gün önceden aç bırakılması gereklidir. Açlık süresi sıcaklığına bağlı olarak 3-4 gün kadar uzatılabilir. Aç bırakılmasındaki amaç balıkların sürütme ağına alındığında sıkışmasını önlemek ve ayrıca sağım sırasında metabolik atıklarının yumurtaya karışmasını önlemektir.



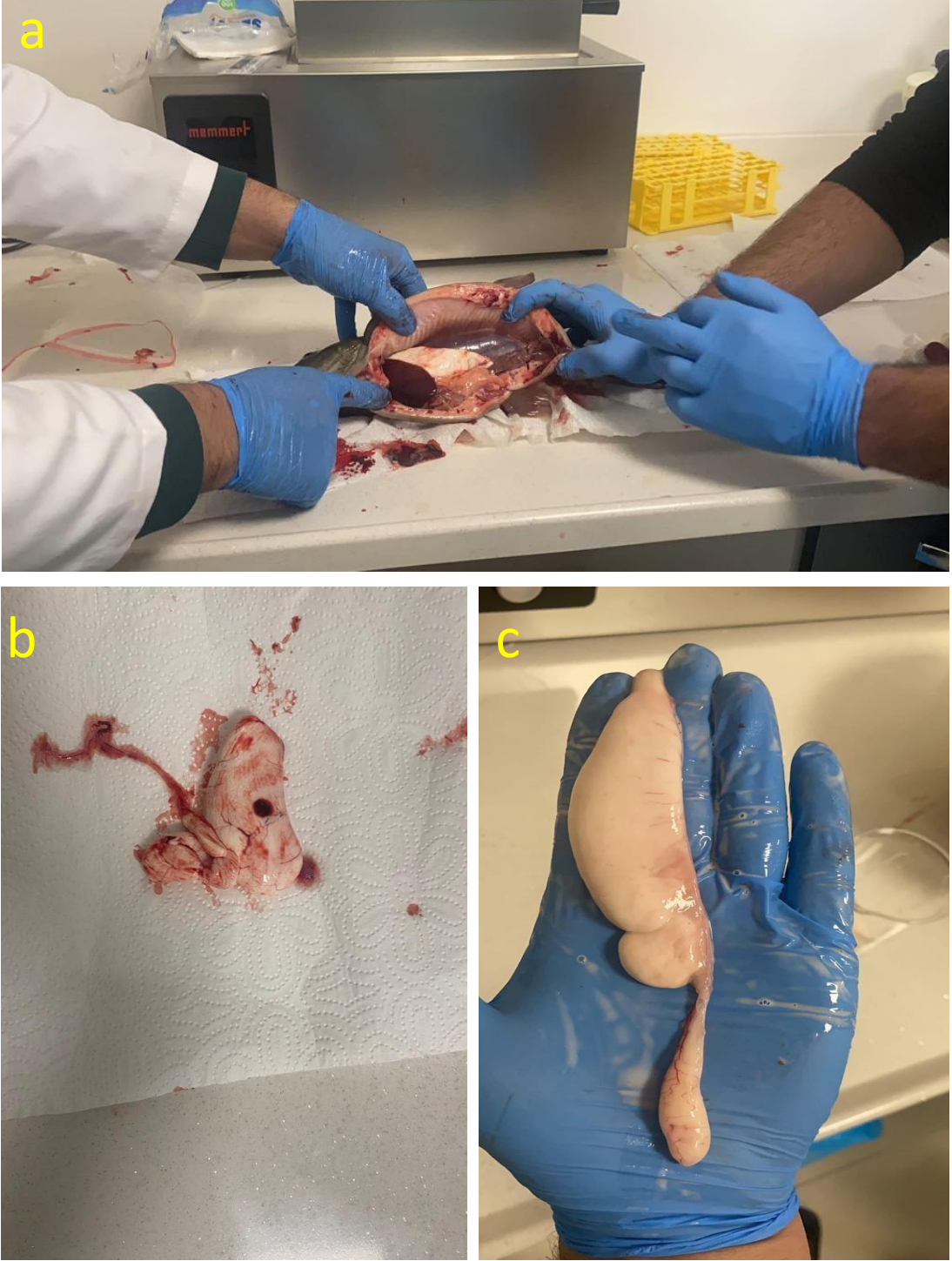
Balıklar havuzdan sürütme ağı ile yakalandıktan sonra yumurta kontrolü ve sağımı için önce anestetik bir madde olan fenoksietanol ile 0,6 ppm solüsyonda 10-15 saniye bekletilerek sakinleştirilmiş ve daha sonra balık vücudunda kalan solüsyon kalıntıları temiz bir bezle kurularak kontrol edilir (Şekil 3.4). Bu uygulama dişi balıklarda olduğu gibi erkek balıklardan sperm alınma öncesinde de aynı işlem uygulanmıştır.



Şekil 3.4: Anaç balıkların fenoksietanolde sakinleştirilmesi (a, b, c),

Anestezi ile sakinleştirildikten sonra temiz bir bezle balık kurularak sperm alınmak üzere abdominal bölgeden distekte edilmiştir (Şekil 3.5). Gonadlar balıktan alındıktan sonra kan, doku ve diğer parametrelerden arındırılarak temizlenmiştir. Bu balıklarda sperm kanalı gelişmediğinden gonadlar balıklar distekte edilerek çıkarılmıştır. Şekil 3.5'de görülen gonad olgunluğu ve büyüklüğü mevsime ve su sıcaklığına bağlı

olarak değişebilir. Örneğin su sıcaklığı 10-13 °C olan sulardaki balıkların gonad ağırlığı 40-50 gr ve 30-40±5 ml sperm alınırken, su sıcaklığı 7-8 °C olan hatta kar suları ile birlikte zaman zaman 5-6 °C'ye kadar düşen sularda bu değerler 10-15 gr gonad ağırlığı ve 8-12±1 ml sperm olarak tespit edildiği gözlenmiştir.



Şekil 3. 5: Gonadların çıkarılması (a, b, c)

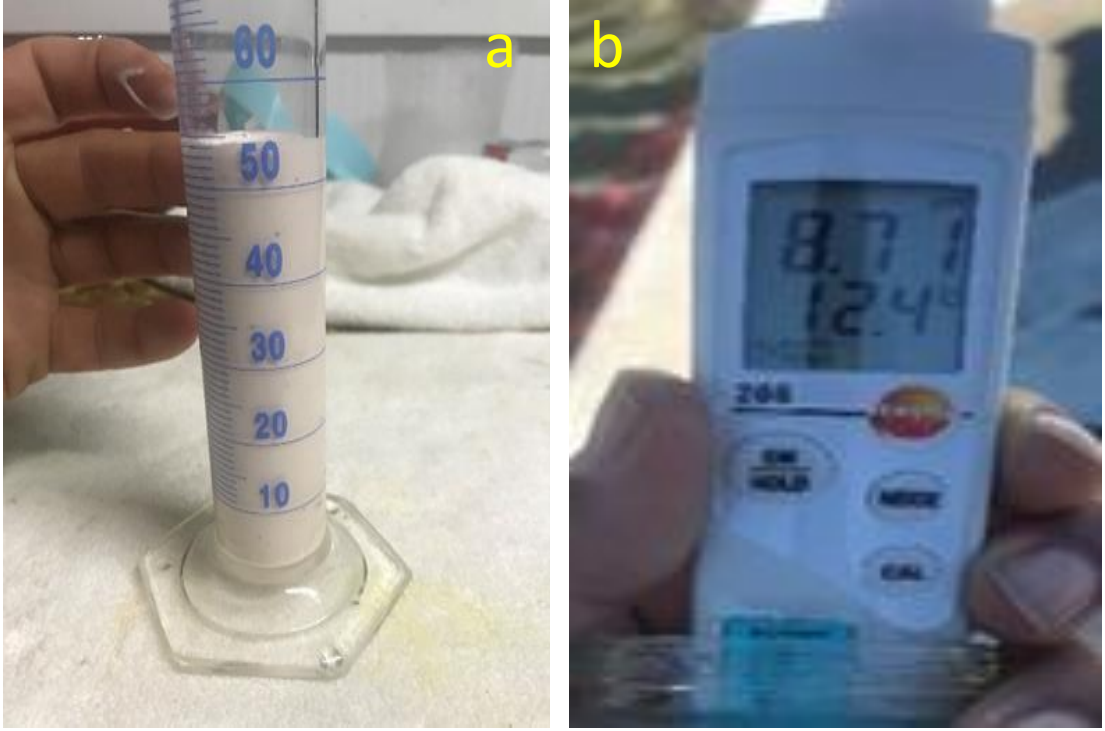


Gonadlar temizlendikten sonra bisturi ile bir kaç yerinden dikey olarak kesilerek olgunlaşmış spermlerin temiz bir kaba alınması sağlanmıştır. Toplam 5 adet balıktan alınan spermalar homojenize olması açısından karıştırılmıştır (Şekil 3. 6).



Şekil 3. 6: Gonad kesimi ve spermanın çıkarılması (a, b, c)

Cinsiyeti dönüştürülmüş erkek balıklarda testis kanalı bulunmamaktadır. Spermatozoa testisler ve sperm kanal sisteminde motil değildir. Bunun nedeni seminal plazma bileşiminde bulunan potasyum (K) iyonlarıdır. Ancak spermatozoa suda aktif olduğu için dondurma işlemine kadar su ile temasından kaçınılmıştır [27,28].



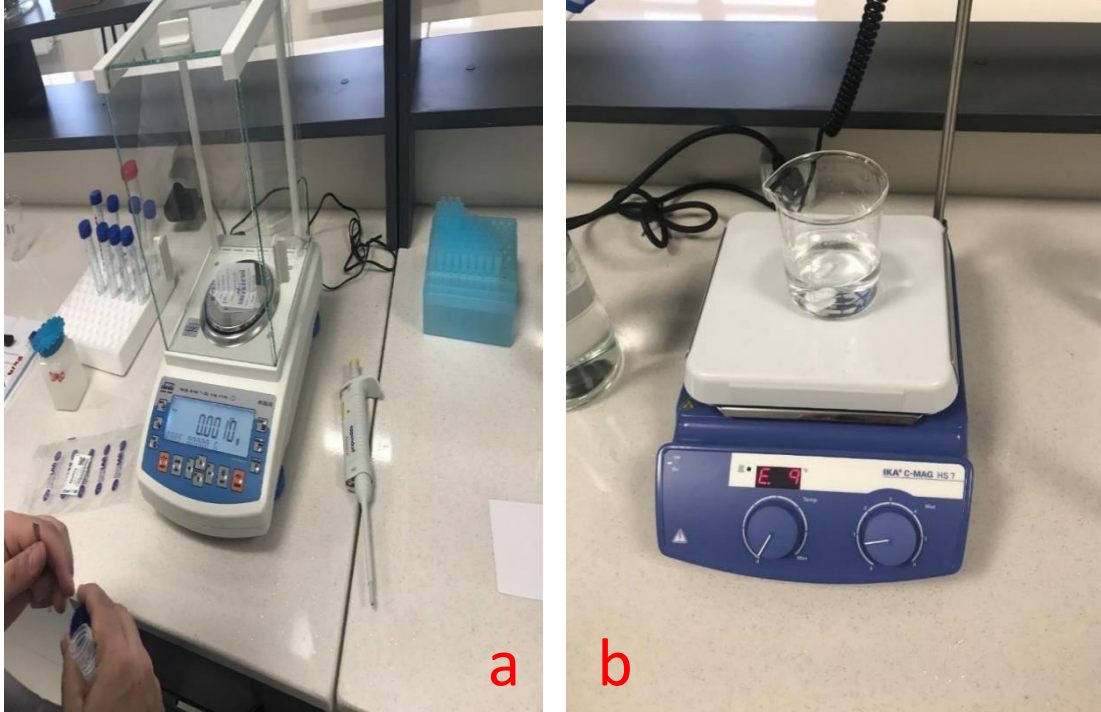
Şekil 3.7: Spermin hacmi ve pH'ın ölçülmesi (a, b)

Dondurma için kullanılacak olan spermaların homojenize edilmiş sperma kabından alınarak gruplarda kullanılacak miktarları dereceli mezürlerle ölçümü yapılarak ayrılmıştır. Spermilerin Testo-206 marka pH metre ile pH ölçümü yapılmıştır. Sperm pH'sı 8,7 olarak Şekil 3. 7'de görülmektedir.

### 3.5 Sulandırıcıların Hazırlanması

Bu çalışmada fonksiyonel (cinsiyeti dönüştürülmüş) erkekleştirilmiş dişi (XX) balıkların spermasının dondurulması, saklanması ve çözündürme sonrası sperm kalitesini olumlu katkısı olması açısından da farklı sulandırma oranlarıyla (1:9, 1:15, 1:25 sperm:sulandırıcı) birlikte farklı dozlarda [0 Mm (Kontrol), 1 mM, 2 mM ve 4 mM)

antioksidan (N-(2-Merkaptopropionil)-Glisin) ana sulandırıcıya [Glukoz (0,3 M), DMSO (% 10), yumurta sarısı (%11), Penicilin/Streptomycin (%0,3)] ilave edilmiş ve etkileri araştırılmıştır.



Şekil 3.8: Antioksidan tartımı ve sulandırıcının santrifüj edilmesi (a, b)

Sulandırıcılar, her gruptan (1:9, 1:15, 1:25) bir kontrol grubu ve 3 tekerrürlü olarak sınıflandırılmıştır. Antioksidan (MPG) tartımları (1 mM, 2mM, 3mM) olacak şekilde RADWAG AS 200.R2 marka 0,1 mg hassaiyette analitik terazi de yapıldıktan sonra sulandırıcılara katılmıştır. Sulandırıcıya DMSO, yumurta sarısı, glikoz ve antoksidan ilave edildikten sonra IKA® C-MAG HS 7 marka 100-1500 devir/dak karıştırıcı ile homojen bir şekilde karışımı sağlanmıştır (Şekil 3.8). Şekil 3.9'da görüldüğü gibi sulandırıcıların tartımı ve karışımı tamamlandıktan sonra payetlere çekilmeye hazır hale getirilmiştir [28].





Şekil 3.9: Sperm, antoksidan ve sulandırıcının karışımı (a, b, c)

Çalışmanın yapıldığı laboratuvar ortamının serin ve hijyenik olması nedeni ile ekilibrasyon yapılmadan dondurulmaya hazırlanmış spermelerin kısa sürede payetlere çekilerek ve dondurulması sağlanmıştır.

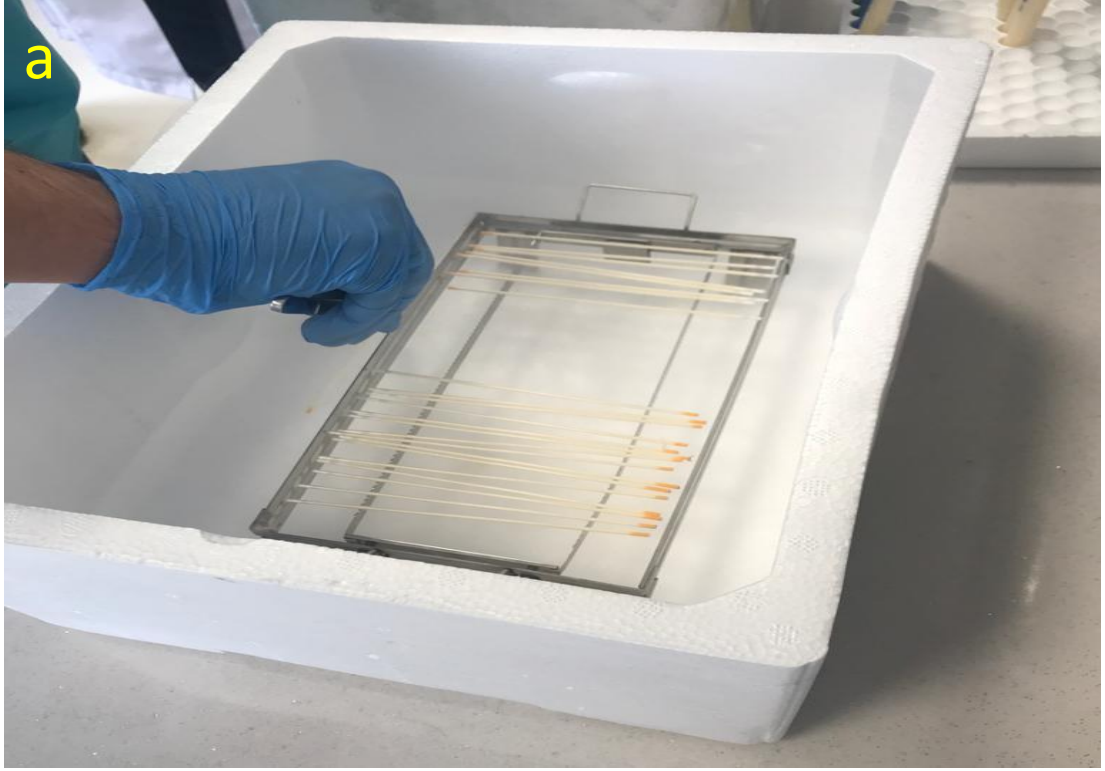
### 3.6 Spermin Payetlere Çekilmesi ve Dondurulması

Hazırlanmış olan her bir sperma çözelti grupları kısa bir ekilibirasyondan sonra 0,5 ml'lik payetlere çelişme işlemine başlanılmıştır. Payetlerin doldurulması işleminde Pipet4u® PRO markalı ve 100-1000 µl hacimli otomatik pipet kullanılarak Şekil 3.10'da görüldüğü gibi payetlere çekilmesi sağlanmıştır.



Şekil 3. 10: Sperm ve sulandırıcı karışımının payetlere çekilmesi

Spermalar dondurulmak üzere her gruptan en az 15 payet olacak şekilde doldurulmuştur. Farklı grupların payetlere (0,5 ml) çekilme işlemi tamamlandıktan sonra payetlerin açık uçları polivinil alkol (payet ucu kapama tozu) ile kapatılmıştır (Şekil 3.10). Dolumu tamamlanan payetler Şekil 3.11'de görüldüğü gibi sıvı azotun 10 cm üzerinde taraklara yerleştirilerek azot buharında 10 dk bekletilerek spermaların dondurulması sağlanmıştır. Spermaların azot buharında bekletilme (dondurulması) işlemi tamamlanica dondurulmuş sperma payetleri -196 °C azot tankına alınmış ve ileriki tarihlerde kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir [180].



Şekil 3. 11: Sperm dondurma (a) ve muhafaza tankına azot ilave edilmesi (b, c)

Tüm işlemler tamamlandıktan sonra dondurulmuş spermelerin canlılık ve canlılık sürelerinin ilk kontrolleri yapılmak üzere laboratuvarında çözündürme işlemi yapılmıştır. Bu işlem sırasında dondurulmuş payetler azot tankından çıkarılarak daha önceden



hazırlanmış termostatlı su ısıtıcısında bulunan 37 °C sıcaklıkta suya daldırılıp 40 sn bekletilerek çözdürülmesi sağlanmıştır. Çözdürülmüş spermatozoaların motilitesinin belirlenmesinde 0,09 M NaCl içeren aktivasyon solusyonu kullanılmış ve spermanın canlılık süresi 10x40 ışık mikroskopunda bakılarak üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.12).

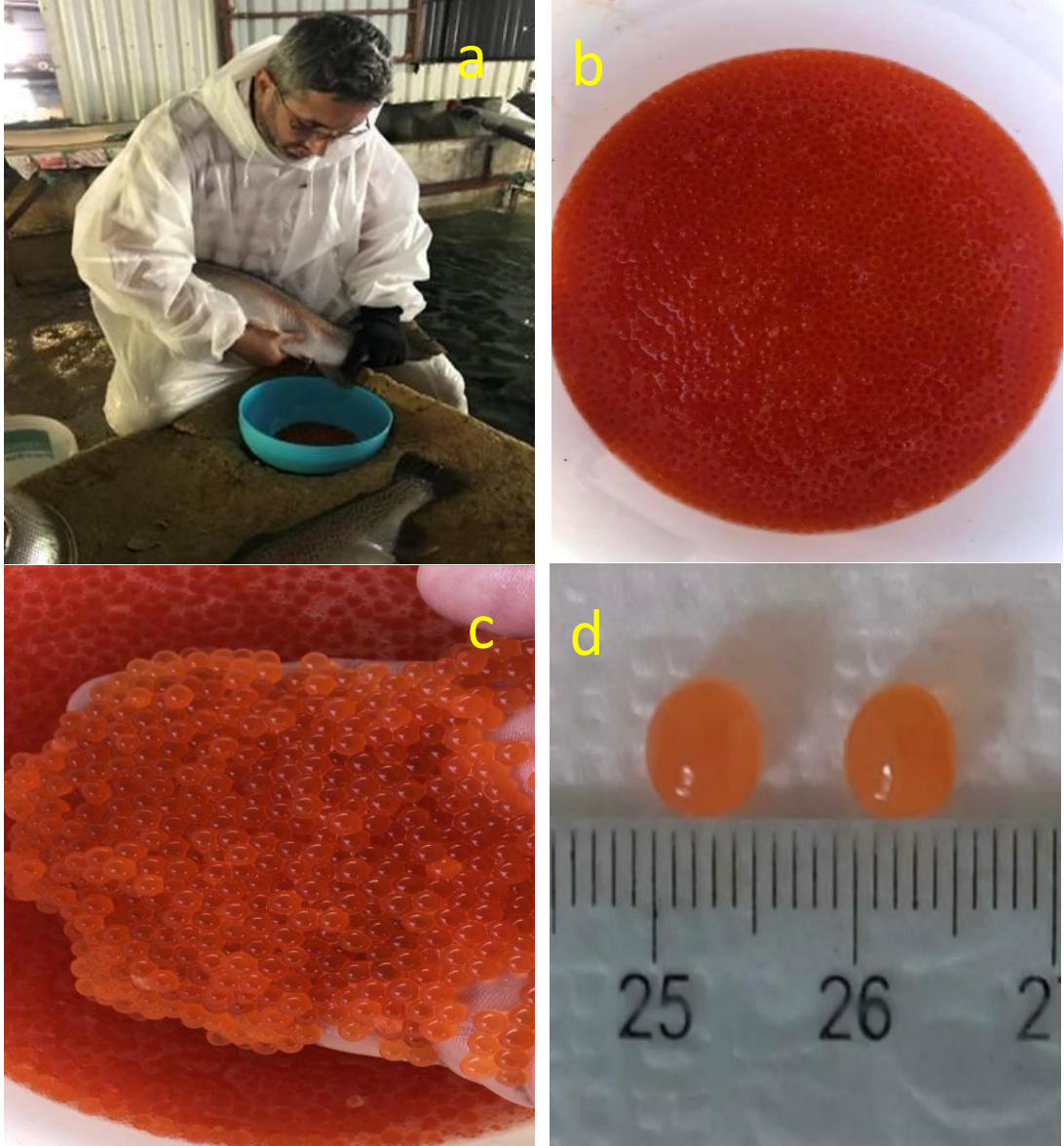


Şekil 3. 12: Çözdürme sonrası sperm hareketliliğinin incelenmesi (a, b)

### 3.7 Anaç Sağımı ve Yumurta Alımı

Çalışmada kullanılacak olan yumurtalar, işletmede bulunan yaklaşık 2150-3620±150 gr arasında değişen ve ortalama 2790 gr ağırlık, 46-65±5 cm ve 3<sup>+</sup> yaşındaki 6 adet anaç balıktan alınmıştır. Anaç başı yumurta verimliliği ortalama 4865±203 adet olarak belirlenmiştir. Yumurta alımı yapılmak için ayrılan anaçların zarar görmemesi açısından önce anestezi bir madde olan phenoxyethanol ile işletme suyu (30 ml/L oranında) ile çözelti hazırlanmış ve anaç balıklar bu suya 10-15±2 sn daldırılarak sakınleştirilmiştir. Sperm alımı sırasında olduğu gibi yumurta alımı sırasında da

balıklar sakinleştirildikten sonra balıklardan gelebilecek idrar, yem ve işletme suyunun yumurtaya karışmaması sağlanmıştır. Daha sonra Şekil 3.13'te de görüldüğü gibi masaj yolu ile yumurta alımı gerçekleştirilmiştir. Kuru bir kaba sağımı yapılan yumurtalar ovaryum suyundan arındırılarak tekrar kuru ve temiz bir kaba alınmıştır.



Şekil 3. 13: Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)yumurtası sağımı (a, b, c) ve yumurta çapı (d)

Döllenmeye hazır olan bu yumurtalar kontrol grubu ve her bir sulandırıcı gruplarından dölleme işlemi yapılmak üzere yumurtalar eşit bir şekilde ayrılmıştır. Şekil 3.14'te olduğu gibi önce ölçülenmiştir, ardından dondurulmuş olan payetler + 37 °C su sıcaklığında 40 sn bekletilerek spermaların çözülmesi sağlanmıştır.

Çözdürüldükten hemen sonra spermler yumurtaların üzerlerine sperm dökülerek yavaşça karıştırılarak tüm yumurtaya spermaların ulaşması sağlanmıştır (Şekil 3,14). Dölleme yapıldıktan 10 dk sonra yumurtalar temiz su ile yıkanarak sertleşmeye bırakılmıştır [46].

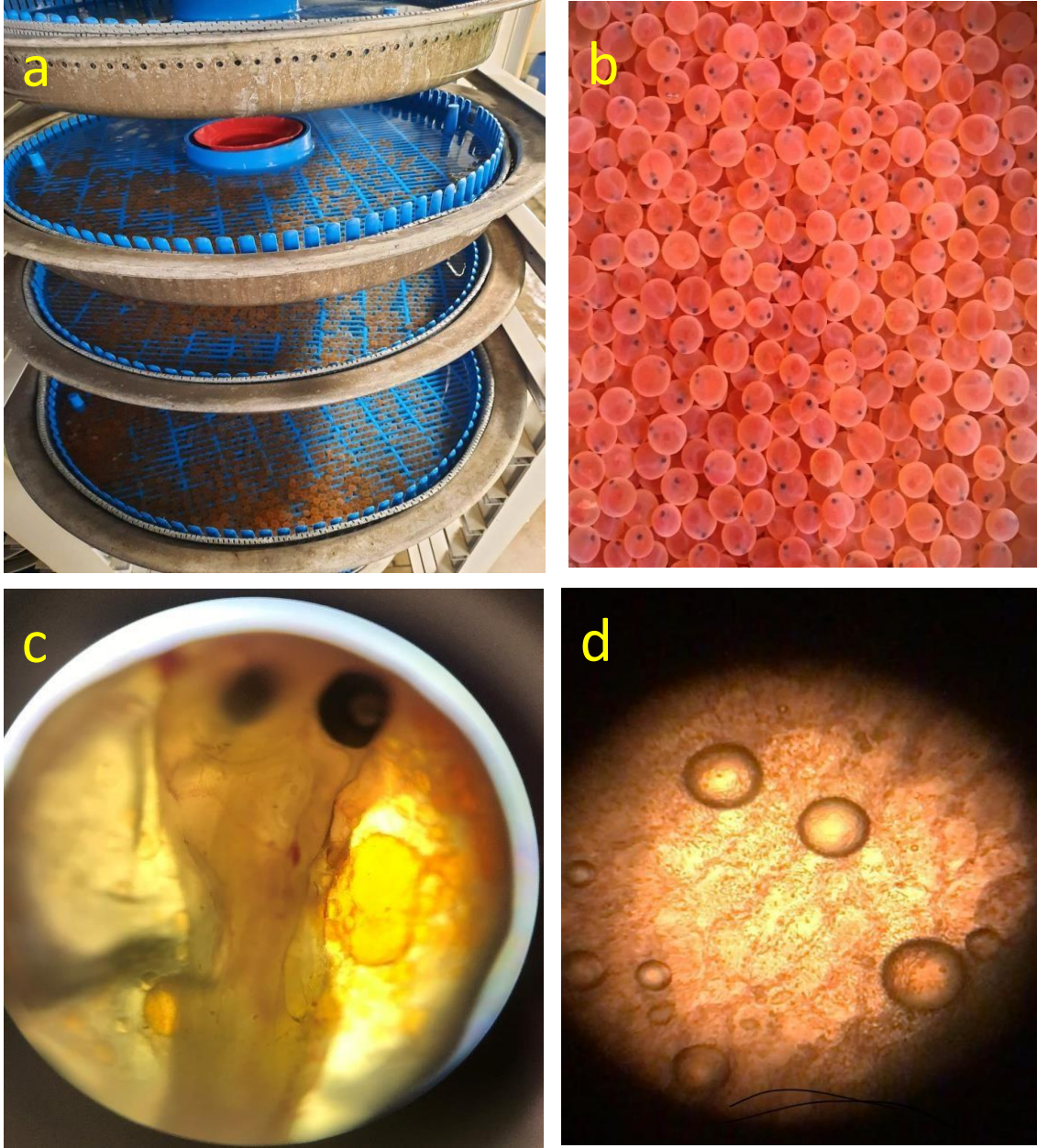


Şekil 3.14: Spermin çözdürülmesi (a, b), yumurtaların döllemesi (c, d)

Döllendikten yaklaşık 15-20 dk sonra setleşen yumurtalar inkübasyon dolablarına gruplara ayrılarak 3 tekrarlı olacak yerleştirilmiştir (Şekil 3.15). Yumurtalar su sıcaklığına bağlı olarak göz lekeleri oluşum süreleri değişmekle beraber, denemenin yapıldığı su sıcaklığı ortalama 9,5-10 °C olup yumurtalarda 16-17 gün sonunda göz

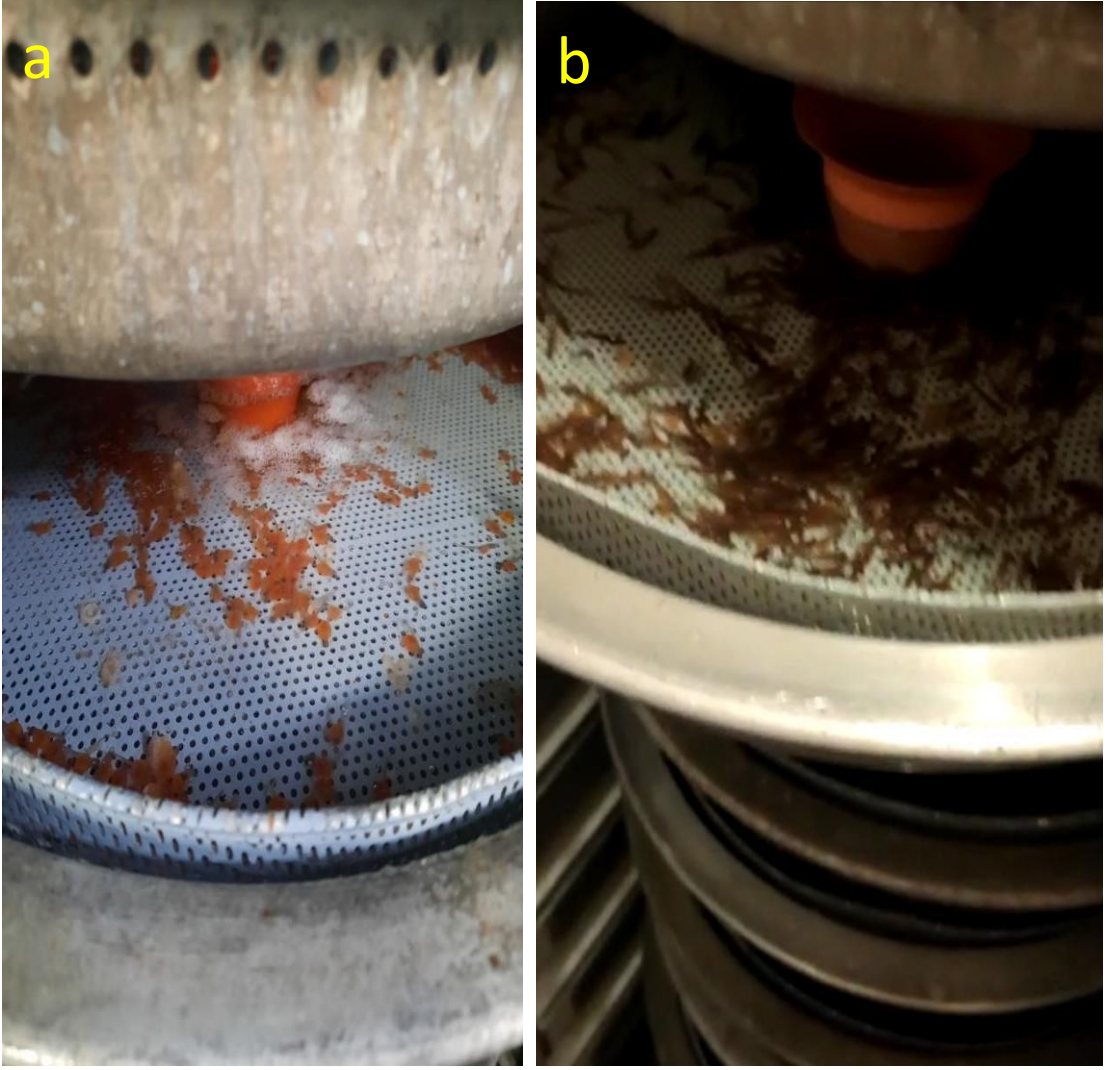


lekeleri gözölmeye başlamıştır. Yumurtalar gözlenene kadar işletmede normal zamanlarda rutin olarak kullanılan dezenfektan maddeleri bu gruplar için de kullanılarak takibi sağlanmıştır.



Şekil 3.15: Dikey inkübasyon dolabı ve gözlenmiş yumurta (a, b, c, d)

Göz lekeleri oluştuktan sonra açılmaya yakın yumurtaların turuncu renkten biraz daha koyu bir renk almış ve 295-300 gün/derece sonunda yumurtalar açılmaya başlamıştır Şekil 3.16.



Şekil 3. 16: Yumurtadan yeni çıkmış alabalık yavrusu (a), ve besin keseli alabalık yavrusu (b),

Yumurtalar açıldıktan yaklaşık 10-15 gün içinde besin keseleri çelismeye başlamıştır. Açılan tüm larvaların %15-20 kadarı yüzemeye başlayınca dışardan yem verilmiştir. Şekil 3.17’de görüldüğü gibi stoklandığı ön büyütme alanlarında (polyester tank veya beton havuzlarda) balık yüzmeye başladığı andan itibaren dışardan beslenmeye başlanılmıştır. Balıklar karma yeme alıştırdıktan sonra yaklaşık 0,3- 0,5 gr oluncaya kadar yaklaşık 30 günlük bir süre bu havuzlarda beslenmeye devam edilmiştir.





Şekil 3.17: Dikey kuluçka dolapları ve ön büyütme tankları (a, b), besin kesesi çekilmiş yavru balıklar (c), yüzmeye başlamış balıklar (d)

### 3.8 DNA Hasarı Tespit Yöntemi

Bu çalışmada DNA hasarının tespiti için, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Suni Tohumlama Anabilim Dalı laboratuvarında Comet Assay yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem, tek hücre Jel elektroforezi (Comet assay) sucul organizmalardaki DNA hasarını tespit etmek için yaygın olarak kullanıldığını bildirmişlerdir. Balıklarda birçok doku analizinin Comet Assay yöntemi ile analize uygun olduğu ancak mitotik olarak dokuların canlı olmaması gerektiği belirtilmiştir. Çözdürülen sperm hücrelerin izolasyonu, slaytların hazırlanması, lizis, DNA sarmalının çözülmesi, elektroforez, nötralizasyon, boyama ve değerlendirme aşamaları olmak üzere 8 basamakta yapıldığını bildirmişlerdir [181-182].

### 3.9 İstatiksel Analizler

Deneme sonucu elde edilen veriler SPSS 16 paket programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Tüm verilere Kruskal Wallis varyans analizi uygulanmıştır ve gruplar arasında zamana bağlı farklılıkların belirlenmesinde Duncan çoklu karşılaştırma testi yapılmıştır. Önem seviyesi  $p < 0.05$  olarak gösterilmiştir.

## Bölüm 4

# Sperm, Antioksidan ve DNA Hasarı

### 4.1 Spermatolojik Muayene Bulguları

Yapılan çalışmada fonksiyonel gökkuşağı alabalıklarından elde edilen ejakulatlarda başlıca spermatolojik özelliklerden sperma miktarı, spermatozoa motilitesi, sperma pH'sı ve sperma rengi tespit edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan fonksiyonel erkek balıklardan alınan tüm sperma örneklerinde, doğal erkeklerde olduğu gibi renk beyaz-krem olarak gözlenmiştir. Fonksiyonel erkek balık sperm pH'sı ortalama  $8,4\pm 0,13$  (XX) iken normal erkek balık spermasında  $7,9\pm 0,2$  olarak ölçülmüştür. Spermatokrit oranı %40 (XX) doğal erkekte (XY) %43, sperm hacmi  $35\pm 5$  ml (XX erkek),  $7-12\pm 3$  ml (XY erkek), sperm yoğunluğu Thoma Lamı'nda hemositometrik pencereleme yöntemi ile  $12,5\times 10^9$ /ml (XX) olarak belirlenmiştir ve doğal gökkuşağı alabalıklarında ise ortalama  $9\times 10^9$ /ml (XY) olduğu tespit edilmiştir. Taze sperm örneklerindeki sperm motilite oranı  $97,67\pm 0,58$ , motilite süresi  $159,67\pm 21,73$  sn olarak belirlenmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1 Normal ve fonksiyonel erkek gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nın taze sperm parametreleri

Parametre	Fonksiyonel erkek XX (♂)	Normal erkek XY (♂)
Sperm Rengi	Beyaz-Krem	Beyaz-Krem
Sperm Miktarı	$35\pm 5$ ml	$7-12\pm 2$ ml
Motilitesi Oranı	97%	98%
Motilite Süresi	$159\pm 16$	$80-90\pm 20$
Sperm pH	$8,4\pm 0,7$	$7,9\pm 0,5$
Spermatokrit Oranı	40%	33%
Sperm Yoğunluğu	$12,5*10^9$ /ml	$8-17*10^9$ /ml

### 4.2 N-(2-Merkaptopropionil)-Glisin Etkileri

Elde edilen sperm örneklerinin spermatolojik muayeneleri yapıldıktan sonra N-(2-Merkaptopropionil)-Glisin ilavesi ile farklı sulandırma oranlarının sperma kalite

parametreleri (motilite yüzdesi ve süresi) üzerindeki etkileri Tablo 4.2’de verilmiştir. Sulandırıcılara N-(2-Merkaptopropionil)-Glisin ilave edildiğinde, fonksiyonel gökkuşağı alabalığının motilite oranı ve süreleri karşılaştırıldığında en iyi sonuçlar 2 mM konsantrasyondan elde edilmiştir ( $p<0.05$ ). Sulandırma oranları karşılaştırıldığında ise en iyi sonuçlar 25:1 oranından elde edilmiştir ( $p<0.05$ ). Veriler değerlendirildiğinde, 2 mM konsantrasyondan sonra motilite süresi ve yüzdesinde düşme meydana gelmiştir.

Tablo 4. 2 N-(2-Merkaptopropionil)-Glisin ve farklı sulandırma oranlarının motilite oranı ve süresi üzerindeki etkileri

Gruplar	Sulandırma oranı					
	9:1		15:1		25:1	
	Motilite oranı (%)	Motilite süresi (s)	Motilite oranı (%)	Motilite süresi (s)	Motilite oranı (%)	Motilite süresi (s)
<b>Taze sperm</b>	97,67±0,58 <sup>a*</sup>	159,67±21,73 <sup>a</sup>	97,67±0,58 <sup>a</sup>	159,67±21,73 <sup>a</sup>	97,67±0,58 <sup>a</sup>	159,67±21,73 <sup>a</sup>
<b>Kontrol (0 mM)</b>	60,00±2,54 <sup>b</sup>	98,67±3,21 <sup>bc</sup>	65,00±6,56 <sup>b</sup>	97,00±2,78 <sup>b</sup>	73,00±5,45 <sup>bc</sup>	92,00±1,89 <sup>b</sup>
<b>1 mM</b>	29,33±4,04 <sup>c</sup>	63,33±6,35 <sup>d</sup>	39,33±3,06 <sup>c</sup>	69,00±4,00 <sup>c</sup>	53,33±18,93 <sup>c</sup>	94,33±17,93 <sup>b</sup>
<b>2 mM</b>	<b>70,33±5,51<sup>d</sup></b>	<b>112,33±4,04<sup>b</sup></b>	<b>75,33±5,51<sup>d</sup></b>	<b>120,67±9,07<sup>d</sup></b>	<b>76,33±3,21<sup>b</sup></b>	<b>118,67±3,21<sup>b</sup></b>
<b>4 mM</b>	54,33±5,86 <sup>b</sup>	91,00±3,00 <sup>c</sup>	68,67±4,04 <sup>bd</sup>	97,33±5,51 <sup>b</sup>	70,33±5,51 <sup>bc</sup>	105,33±5,03 <sup>b</sup>
<b><math>\chi^2</math> değeri</b>	12,654	13,257	12,165	12,879	9,769	11,379
<b>P değeri</b>	0,013	0,010	0,016	0,012	0,045	0,023

\*: (a, b, c, d) sonuçlar arasındaki farklılığın önem değerini göstermektedir ( $P < 0,05$ ).

Elde edilen sperm örneklerinin spermatolojik muayeneleri yapıldıktan sonra N-(2-Merkaptopropionil)-Glisin ilavesi ile farklı sulandırma oranlarının dölleme ve açılma oranı üzerindeki etkileri Tablo 4.3'te verilmiştir. Sulandırıcılara N-(2-Merkaptopropionil)-Glisin ilave edildiğinde, fonksiyonel gökkuşağı alabalığının dölleme ve açılma oranları tüm gruplar karşılaştırıldığında en iyi sonuçlar 2 mM konsantrasyondan elde edilmiştir ( $p < 0.05$ ). Sulandırma oranları karşılaştırıldığında ise en iyi sonuçlar 25:1 oranından elde edilmiştir ( $p < 0.05$ ). Veriler değerlendirildiğinde, 2 mM konsantrasyondan sonra dölleme ve açılma oranında düşme meydana gelmiştir.

Tablo 4.3 N-(2-Merkaptopropionil)-Glisin ve farklı sulandırma oranlarının dölleme ve açılma oranları üzerindeki etkileri

Gruplar	Sulandırma oranı					
	9:1		15:1		25:1	
	Dölleme oranı (%)	Açılma oranı (%)	Dölleme oranı (%)	Açılma oranı (%)	Dölleme oranı (%)	Açılma oranı (%)
<b>Taze sperm</b>	92,00±2,00 <sup>a*</sup>	88,67±1,20 <sup>a</sup>	92,00±2,00 <sup>a</sup>	88,67±1,20 <sup>a</sup>	92,00±2,00 <sup>a</sup>	88,67±1,20 <sup>a</sup>
<b>Kontrol (0 mM)</b>	57,67±2,50 <sup>b</sup>	35,67±2,10 <sup>b</sup>	57,67±2,50 <sup>b</sup>	35,67±2,10 <sup>b</sup>	57,67±2,50 <sup>b</sup>	35,67±2,10 <sup>b</sup>
<b>1 mM</b>	24,00±3,60 <sup>c</sup>	16,00±3,00 <sup>c</sup>	35,33±3,80 <sup>c</sup>	25,67±3,10 <sup>b</sup>	36,67±3,10 <sup>b</sup>	28,00±3,60 <sup>c</sup>
<b>2 mM</b>	<b>51,00±2,00<sup>d</sup></b>	<b>37,67±2,50<sup>d</sup></b>	<b>62,67±3,10<sup>d</sup></b>	<b>54,33±3,10<sup>c</sup></b>	<b>63,33±2,10<sup>c</sup></b>	<b>53,33±2,90<sup>b</sup></b>
<b>4 mM</b>	45,00±2,60 <sup>d</sup>	29,67±3,80 <sup>d</sup>	56,67±1,50 <sup>d</sup>	41,00±1,00 <sup>c</sup>	58,67±5,10 <sup>c</sup>	44,00±5,30 <sup>b</sup>
<b><math>\chi^2</math> değeri</b>	12,833	13,099	12,648	12,870	11,118	13,016
<b>P değeri</b>	0,012	0,011	0,013	0,012	0,025	0,011

\*: (a, b, c, d) sonuçlar arasındaki farklılığın önem değerini göstermektedir ( $P < 0,05$ ).

### 4.3 Dondurulmuş Spermada DNA Hasar Tespiti

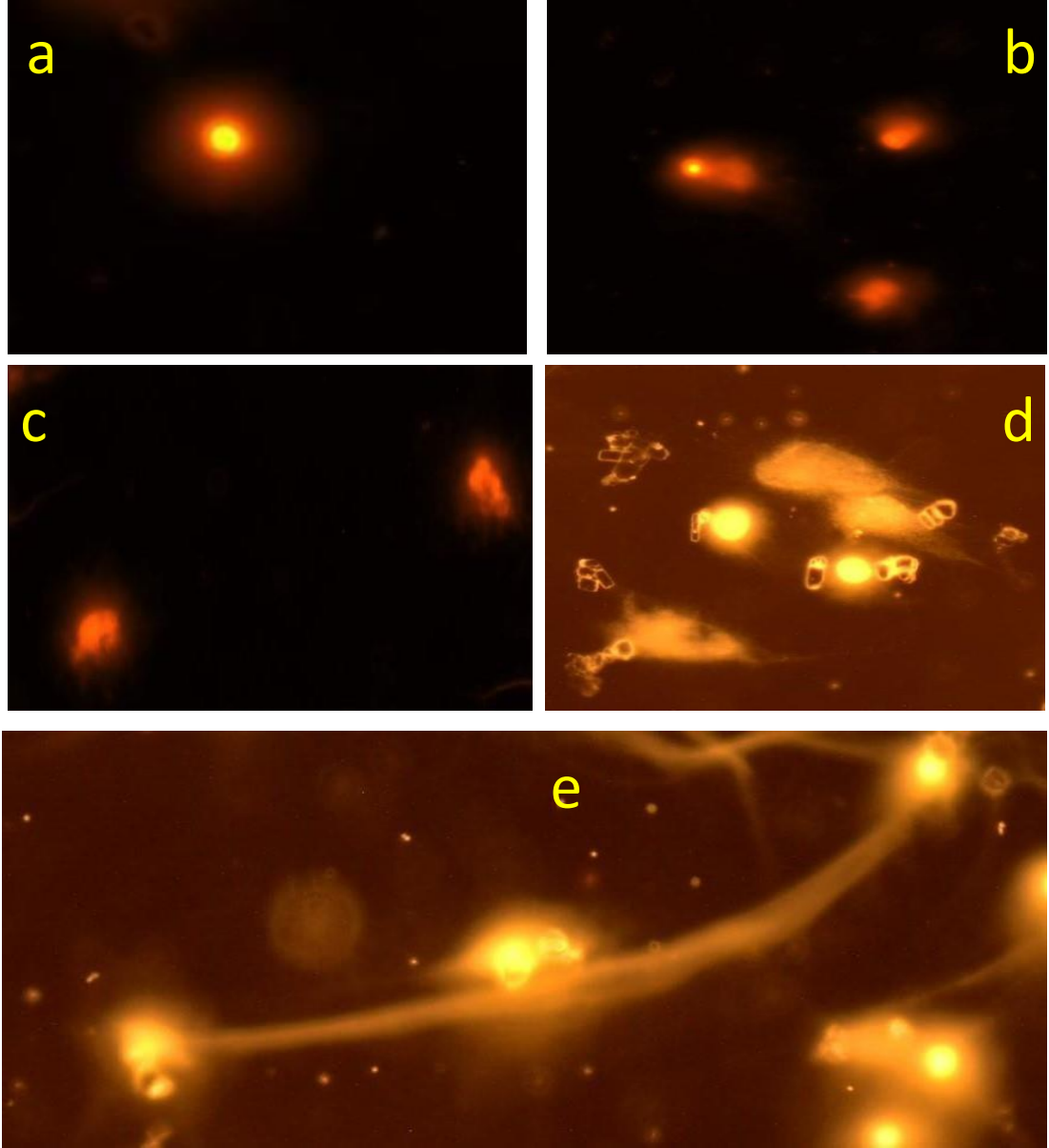
DNA hasarı, kriyoprezervasyon sonucunda oluşan DNA sarmalında bulunan genetik materyalin bütünlüğünde iç ve dış faktörlerin etkisi ile kırılma ve bozulma olarak bilinmektedir [183,98]. Spermatozoa DNA hasarı nedeniyle sonraki nesillere aktarılacak genetik bilgilerin olumsuz yönde değişime neden olacağı bildirmişlerdir [184]. Bu çalışmada, DNA hasarının belirlenmesi için Comet analiz metodu uygulanmıştır. Kontrol grubu (0) ve farklı oranlarda (1:9, 1:15, 1: 25) seyreltilmiş ve farklı dozlarda (1 mM, 2 mM, 4mM) MPG ilave edilerek dondurulmuş sperm örnekleri incelenmiştir. Analiz sonuçlarını sperm hücrelerinin yapısının bozulma durumuna göre her hücre DNA'sının bozulma sonucu oluşturduğu kuyruk uzunluğu floresan mikroskop altında incelenerek görsel olarak 1. 2. 3. ve 4. dereceden hasarlı ve 0 (hasarsız) olarak ölçeklendirilen veriler Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4. 4 Gruplar arasında hasar durumuna göre DNA hasar değerleri

Grup	Hasar Durumu	Kon	9:1			15:1			25:1		
			1 mM	2 mM	4 mM	1 mM	2 mM	4 mM	1 mM	2 mM	4 mM
Hasarsız	0	427	515		490	370	697	469		283	488
Az hasarlı	1	15	27	Tespit edilemedi	14	8	12	7	Tespit edilemedi	11	18
Orta hasarlı	2	15	5		6	2	4	3		6	10
Hasarlı	3	13	6		2	1	5	3		2	4
Çok Hasarlı	4	9	8		4	2	4	4		2	3
Topl. Sperm Sayısı		479	561		516	383	722	486		304	523
Topl. Hasarlı S. Sayısı		52	46		26	13	25	17		21	35
Hasar %		10,86	8,2		5,04	<b>3,39</b>	<b>3,46</b>	<b>3,5</b>		6,91	6,69

Tablo 4.4'te analiz sonuçları incelendiğinde gruplar arasındaki hasar yüzdeleri farklı oranlarda seyrelticiler arasında ve farklı dozlarda kullanılan antioksidanlar karşılaştırıldığında en iyi sonuçların 1:15 seyrelticide olduğu görülmüştür. Tüm seyreltici gruplarında ise antioksidan dozlar arasındaki değerler bir birine yakın olduğu gözlemlenmiştir. Buna rağmen tüm gruplarda elde edilen hasar yüzde

değerleri antioksidan kullanılmayan kontrol grubuna göre daha düşük oranlarda olduğu görülmüştür.



Şekil 4.1 DNA hasarlarının fleuresan mikroskop altında 50  $\mu\text{m}$  boyutunda görüntüleri, a; hasarsız, b; az hasarlı, c; orta hasarlı, d; hasarlı, e; çok hasarlı

Şekil 4.1’de görüldüğü gibi, comet assay analiz sonucuna göre DNA hasarlarının floresan mikroskop altında 50  $\mu\text{m}$  boyutunda görüntüleri hasarsız, az hasarlı, orta hasarlı, hasarlı ve çok hasarlı olarak tespit edilmiştir. Genel olarak DNA çift

sarmalından çok DNA tek sarmalında hasar meydana getirmektedir, DNA, çekirdekten anoda doğru göç ederek kuyruklu yıldız görünümünü vermiş, bu nedenle hasarlı hücreler COMET olarak adlandırılmıştır [115].



# Bölüm 5

## Tartışma

Alabalıklarda sperm miktarı balığın yaşına ve büyüklüğüne göre değişim göstermekle birlikte yaşam alanının su sıcaklığına bağlı olarak da farklılıklar görülmektedir. Sperma miktarı genel olarak alabalıklarda 4-6 ml, yoğunluk ise  $10-20 \times 10^9$  ml'dir [27]. Balık spermasının pH'sı 7,0 osmotik basıncı ise 306 mOsm 1/L bildirilmiştir [27,185]. Gökkuşığı alabalığının fonksiyonel erkeklerin de kanal seminal plazmadan elde edilen pH'ı  $7,78 \pm 0,02$ , testiküler seminal plazma pH'ını  $7,50 \pm 0,10$  olarak elde etmişlerdir. Bu çalışmada, önceki çalışmalardan farklı olarak pH 8.4 elde edilmiştir [186].

Özel bir işletmede incelemeler sonucunda tespit edilen farklı yaşlarda ve farklı büyüklüklerdeki balıklardan alınan sperm miktarının da farklılık gösterdiği gözlemlenmiştir. Buna göre genç erkek balıklardan (250-350 gr) alınan sperm miktarı ortalama 3,0-7,0 ml iken; yetişkin erkek balıklardan (1500-2500 gr) alınan sperm miktarı ortalama 9,0-15,0 ml olarak tespit edilmiştir. Diğer taraftan fonksiyonel balıklardan alınan sperm sıvısı miktarı 50-70 ml kadar ölçülmüştür.

Alabalıklarda yumurta büyüklüğü balığın sağlığına, yaşına, yaşadığı adet başına birim alanına, havuza giren su miktarına ve su kalitesine bağlı olarak değişebilmektedir [31]. Alabalıklarda genel olarak yumurtanın büyüklüğü, 1,5-2 yaşındaki genç bireylerde  $2,5-3,5 \pm 0,5$  mm çapında ve yaklaşık  $65-70 \pm 15$  mg ağırlındayken, 3 ve üzeri yaşlarındaki alabalıklarda  $4-6 \pm 1$  mm çapında ve  $90-100 \pm 20$  mg ağırlığında değişebilmektedir. Ergin bir dişi anaç alabalık yaklaşık 1500-2500 adet yumurta /kg canlı ağırlık başına yumurta verdiği gözlemlenmiştir.

Tümü dişi olan salmonid popülasyonlarının oluşturulması, ticari su ürünleri yetiştiriciliği için istenmektedir [53]. Fonksiyonel dişiler (erkekleştirilmiş dişiler, neomaller) bir erkek fenotipine sahip olsalar bile halen daha dişi genotipine (XX) sahiptirler. Bu nedenle, fonksiyonel dişiler tarafından üretilen spermatozoa sadece X kromozomu taşır ve elde edilen çaprazlamalar sadece dişilerden kaynaklanır. Bu şekilde dişi salmonidler bir erkek fenotipi ifade eder ve spermatozoa üretir [131].

Dönüştürülmüş dişilerde genellikle spermatid kanalları bulunmadığından, semen doğrudan testisten toplanır ve hayvanların acı çektilmeden öldürülmesi gerektiğini bildirmişlerdir [51]. Testiküler semen, normal erkeklerin ejakulat sperminden farklıdır, değişken spermatozoa olgunluğu, daha yüksek sperm konsantrasyonu, daha düşük sperm motilitesi ve kriyoprezervasyondan sonra oldukça azalmış dölleme başarısı ile karakterizedir [55-56]. Kriyoprezervasyondan sonra dönüştürülmüş dişilerin sperminin zayıf özelliklerinin nedenleri tam olarak anlaşılammıştır. Bu nedenle, kriyoinjury ile ilgili olarak dönüştürülmüş dişilerden elde edilen sperm kriyoprezervasyonunda antioksidan ilavesinin etkilerinin belirlenmesi önemlidir [98,91].

Sperm dondurma sırasında amino asitler, genel olarak seminal plazmada yüksek konsantrasyonda bulunan ve antioksidan özelliği nedeniyle kriyoprezervasyon sırasında spermleri hücre hasarına karşı korur [187]. Aromatik amino asitlerde L-triptofan, Taurin ve L-metiyonin çok yönlü bir molekül olup proteinlerin biosentezi için gereklidir. Hücrelerin metabolik fonksiyonları nedeniyle bilimsel araştırma ve diğer klinik çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır [188-189]. L-triptofan katkılı sulandırıcılar, kısa süreli sperm dondurma uygulamalarında sperm kalitesini korumak için yararlı sonuçlarının olduğu belirlenmiştir. Benzer çalışmanın sonuçları, uzun süreli sperm dondurma, muhafaza, üretimde kullanılabilirliğini göstermişlerdir [190].

Düşük sıcaklıklarda sazan (*Cyprinus carpio*) spermi muhafazası sırasında seminal plazmasındaki amino asit (yani sistein) seviyesinin büyük ölçüde azaldığını belirlemişler; bu düşük sıcaklıktaki sazan spermindeki spesifik amino asidin, reaktif oksijen türleri (ROS)'inden kaynaklanan zararlı etkiyi bertaraf etmek için sazan spermatozoası tarafından kullanıldığını, sıcaklığı düşürülmüş sazan sperminin, belirli ROS'un etkisini en aza indirmek için bir miktar L-sistein gerektirdiği varsayılabilirliğini bildirmişlerdir. Ancak, antioksidan (yani L-sistein) eklenmesinin sazan spermi nitelikleri üzerindeki etkisi hakkında daha önce hiçbir çalışmada kullanılmadığını bilgisini paylaşmışlardır. Bu nedenle, yapılan bu çalışma elde edilen sonuçların sazan spermi motilitesini, motilite süresini olumlu yönde etkilediğini ve bu amaçla kurokura sulandıcısına 1 mMol L-sistein ilave edilmesini önermişlerdir [191].

Sperm kalitesinde iyi sonuçlar elde edilmesi için en iyi konsantrasyonun ve amino asitlerin kombinasyonunun belirlenmesi önemlidir. Önceki çalışmalarda, çok yüksek

amino asit konsantrasyonunun ozmotik toksisite ve hipertonsite nedeniyle sperm kalitesini olumsuz etkilediği bildirilmiştir [192-196]. L-sisteinin sazan (*C. carpio*) spermi kryoprezervasyonu sonucunda sperm özellikleri üzerindeki etkisi üzerine bir çalışmada, farklı konsantrasyonlarda L-sistein (0, 0,5, 1, 1,5 ve 2 mM) kullanmışlar ve L-sistein konsantrasyonundaki artışın toksik etkisi nedeniyle düşük semen özelliklerine neden olduğunu bildirmişlerdir [191]. Bu sonucun aksine, Öğretmen ve ark. (2015) 20 mM konsantrasyonda daha yüksek çözüm sonrası yüzdesi ve hareketlilik süresi, dölleme ve kuluçka oranı elde etmişler ve konsantrasyon artışı sazan (*C. carpio*) sperminin DNA hasarını azalttığını belirlemişlerdir. Bu çalışmada da önceki çalışmalara benzer olarak, konsantrasyon artışıyla sperm motilite yüzdesi ve süresi azalmıştır.

Antioksidanlar ROS oluşumunun inhibisyonu için yararlıdır [197]. N-(2-Merkaptopropionil)-Glisin (MPG) indirgeyici ve karmaşık bir tiyoldür. MPG serbest bir merkaptto grubu ile birlikte yaygın olarak kullanılan bir antioksidandır. Bazı raporlar, serbest radikallerden hücre zarı hasarını önleyen serbest radikal önleyici olduğunu göstermiştir. MPG, çeşitli hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır [198,100-101]. MPG, olası bir antidot olarak diğer sülfidril bileşiklerine göre birçok avantaja sahiptir ve çeşitli karaciğer hastalıkları, nefrotoksisite ve sistin ürolitiazisi tedavisinde klinik olarak kullanılmaktadır [102,100-101]. Bu, koruyucu bir ilaç olarak kullanılmasını büyük ölçüde kolaylaştırır. Şimdiye kadar, MPG klinik kullanımda çok az yan etkiye neden olmuştur. Hayvanlarda ve insanda gerçekleştirilen önceki çalışmaların aksine, balıklarda MPG ilavesinin sperm kryoprezervasyonundan sonra hücreleri nasıl etkilediği ile ilgili herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Şimdiye kadar sadece aktivasyon solüsyonuna MPG ilave etmişler, artan MPG konsantrasyonlarının [0 mM (Kontrol), 0,25 mM, 0,5 mM ve 1 mM] gökkuşuğu alabalığı (*O. mykiss*) sperm motilitesi ve süresi üzerindeki etkilerini değerlendirmiş ve 0,25 mM'de motilite yüzdesi (%91,80±6,42) ve süresindeki (29,40±5,86 s) artışların istatistiksel olarak anlamlı olduğunu belirlemişlerdir (p<0,05). 1 mM konsantrasyonda sperm hücrelerinde hareketlilik belirlenemediğini bildirmişlerdir [103]. Önceki çalışmaların aksine, bu çalışmada sperm kriyoprezrvasyonunda en iyi sonuçlar 2 mM konsantrasyondan elde edilmiştir. Sperm motilite yüzdesi ve süresi, dölleme ve açılma oranı kontrol grubu ile

karşılaştırıldığında bir artış göstermiştir. Bu durum, MPG'nin antioksidan özelliğinden dolayı hücreyi koruması ile açıklanabilir.

Günümüze kadar, Salmonidlerin dönüştürülmüş dişilerinin sperm kalitesinin analizine ilişkin gökkuşağı alabalığında çalışmalar gerçekleştirilmiştir [90,101,102, 200, 170,155-157,164,167,169]. Önceki çalışmalarda, dönüştürülmüş bireyler ile normal gökkuşağı alabalığından elde edilen spermanın sperm motilitesi, sperm konsantrasyonu ve seminal plazma ozmolalitesi değerlerini benzer olarak bildirmişlerdir [157,164,167,102]. Sperm konsantrasyonu açısından, dönüştürülmüş dişilerde sperm kanalları bulunmadığından ve semen doğrudan testislerden ekstrakte edildiğinden, test edilen iki tür için değerler 2-3 kat daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir [164,167]. Bu çalışmada, sperm konsantrasyonu  $12,5 \times 10^9$  ml olarak belirlenmiştir.

Sperma dondurmanın temel amacı, çözündürme sonrası yaşayan normal spermatozoa sayısının yüksek tutarak dondurularak uzun süre (20-30 yıl) saklamaktır. Dondurma önce mevcut bulunan spermatozoa motilitesi, yapısal bütünlük, canlılık, DNA ve dölleme potansiyelinin çözüm sonrası spermada da devam ettirilmesi temel olarak gereklidir. Önceki literatürlerde, sperma dondurma için dondurma öncesi sperma kalitesi, dondurma ve çözündürme yöntemleri, sperma sulandırıcıları gibi önemli faktörler çözüm sonrası sperma kalite özellikleri üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Bunların üzerinde hassasiyetle durulması gerektiği anlaşılmaktadır. Nitekim dondurma-çözündürme teknikleri ve sperma sulandırıcılarını iyileştirmek adına yapılan birçok çalışma, balık sperma dondurma yönteminin ilerlemesini sağlamıştır. Önceki çalışmalarda, sperma sulandırıcısına katılan değişik antioksidanlar, spermatozoa motilitesini devam ettirdiği, spermatozoa bütünlüğünü koruduğu ve DNA hasarını en aza indirdiği gösterilmiş olmasına rağmen bu maddelerin yararı hala tartışmalıdır.

Spermanın dondurulması, spermanın çözüm sonrası motilitesini belirli bir oranda koruyan bir yöntemdir. Spermanın dondurulması başarısı, sperma parametrelerine ve sulandırıcının bileşimi, sulandırma, dondurma ve çözme işlemleri gibi çevresel faktörlere bağlıdır [200]. Kriyoprezervasyon işlemlerinin sperma kalitesini bozduğu ve spermatozoa motilitesine bağlı fertilizasyonu azalttığı bilinmektedir [201-202]. Ayrıca kriyoprezervasyon çoğu durumda membran bütünlüğünün kaybına,

mitokondriyal hasara, metabolik ve fonksiyonel durum değişikliklerine [202], lipid peroksidasyonuna ve sitoplazmik reaktif oksijen türlerinin artışına (ROS) vedolayısıyla DNA hasarının artmasına neden olduğunu bildirmişleridir [203-205].

Sperma kalitesini değerlendirmek için yeni testler, sperm kalitesini ve sperma dondurma protokollerinin optimizasyonuna katkılar sunar. Çok sayıda sperma dondurma yöntemi mevcuttur, ancak hepsi soğutma, dondurma ve çözmeyi içerir. Çözöldükten sonra, spermatozoa DNA bütönlüğünün çeşitli kriyoprezervasyon yöntemlerinden nasıl etkilendiğine dair tartışmalar devam etmektedir. Birçok çalışma, bu süreçlerin sperm fonksiyonuna zarar verebileceğini bildirmişlerdir [206]. Oksidatif stresin olumsuz sonuçları nükleer ve mitokondriyal DNA hasara yol açmasıdır. Bu nedenle reaktif oksijen türlerinin azaltılması DNA hasarını da azaltabileceğini belirlemişlerdir [207]. Daha önceki çalışma bulguları dondurma çözöndürme işlemi sırasında oluşan serbest radikaller ve Caspase 3 gibi enzimlerin aktivasyonu hücresele apoptoza ve DNA hasarına neden olduğunu bildirmişlerdir [208-200].

Oksidatif DNA hasarını saptamaya yönelik testlerden biri olan 8-OHdG analizi sonuçlarına bakıldığında, yalnızca Methanol ve Sükroz'un birlikte kullanıldığı sulandırıcıda ve Methilglükole Sükroz ilave edilen sulandırıcıda hasar yükselmiştir. Aynı şekilde, Comet analizinde de Methanol'e Sükroz, Methilglükol'e Sükroz ilavesinde DNA hasarında anlamlı derecede artış gözlemlenmiştir. Buna karşılık, Comet analizi sonucunda DMSO'ya Sükroz ve Methilglükol'e Sükroz ilavesinde önemli azalma tespit edilmiştir. 8-OHdG ve Comet analizi, oksidatif DNA hasarının güvenilir belirteci olarak kabul edilen yaygın yöntemlerden biridir [211-212]. Levrek sperm Comet analizi, taze sperm ile karşılaştırıldığında, dondurulmuş çözönmüş sperm örneklerinde önemli bir DNA parçalanması meydana geldiğini açıkça göstermiştir [161].

Hücre içine giremeyen sükrozun [127,213]. DNA hasarını azalttığı söylenebilir. Buna karşılık, DMSO ve metilglükol'ün comet assay analizinde yüksek DNA hasarına yol açtığı belirlenirken, 8-OHdG testinde, alkol ve şekerlerin [213,127,214] DNA hasarına yol açması, bunların karışımının DNA hasarını yükseltmesi, her iki test ile daha çok çalışmalar yapılması gerektiği düşöncesindeyiz.

Bu çalışma sonuçları ile diğer çalışma sonuçları arasındaki farklılık, her testteki sperm konsantrasyonundaki ve sperm sayılarındaki değişiklikten kaynaklanıyor olabilir. Yumurta ve spermatozoon oranı fertilizasyonu etkileyen önemli bir faktördür [215]. Diğer yandan, çözündürülmüş sperma ile ilgili olarak, spermatozoa-yumurta oranı daha yüksek olmalıdır çünkü dondurma-çözülme spermatozoların hücre yapılarına (DNA, hücre zarı, orta kısım ve flagellum) zarar vermenin yanı sıra büyük ölümlere neden olabilmekte ve böylece onları döllenme için devre dışı bırakabilmektedir [216].

Tablo 5.1’de birçok araştırmacı tarafından önceki yıllarda farklı türlerde ve aynı türden olup cinsiyeti dönüştürülmüş olan balıkların spermalarının uzun süreli dondurma ve muhafaza çalışmalarından elde edilen motilite oranı, motilite süresi ve döllenme oranları görülmektedir. Bu çalışmada ise cinsiyet dönüşümü yapılmış gökkuşuğu alabalığı sperması dondurulması sırasında sulandırıcıya ilk defa katılan MPG ile elde edilen veriler geçmişte yapılan çalışmalarla karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçların diğer sonuçlara yakın değerlerde olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 5.1 Geçmişte yapılan benzer çalışmaların sonuçlarının karşılaştırılması

Tür	Muhafaza şekli	XX/XY	Motilite Oranı (%)	Motilite Süresi (sn)	Döllenme Oranı (%)	Araştırmacı
Gökkuşığı alabalığı ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	Uzun süreli muhafaza	XX	92,7		60	Geffen ve ark., 2000
Gökkuşığı alabalığı ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	Uzun süreli muhafaza	XX	88		74	Robles ve ark., 2003
Gökkuşığı alabalığı ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	Uzun süreli muhafaza	XY	77,08		56,08	Çevik ve ark., 2003
Gökkuşığı alabalığı ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	Uzun süreli muhafaza	XY	57	96	68	Bozkurt ve ark., 2005
Sazan balığı ( <i>Cyprinus carpio</i> )	Uzun süreli muhafaza	XY	64	218	35	Bozkurt ve ark., 2005
Abant alabalığı <i>Salmo trutta abanticus</i>	Uzun süreli muhafaza	XY	67		61	Hatipoğlu ve ark., 2010
Gökkuşığı alabalığı ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	Uzun süreli muhafaza	XY	94,3		64,4	Şahin ve ark., 2013
Gökkuşığı alabalığı ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	Uzun süreli muhafaza	XX	55		80	Dietrich ve ark., 2014
Gökkuşığı alabalığı ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	Uzun süreli muhafaza	XX	56	91	83	Ciereszko ve ark., 2015
Japon havuz balığı <i>Carassius auratus</i>	Uzun süreli muhafaza	XY	45		17	Kutluyer ve ark., 2015
Gökkuşığı alabalığı ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	Uzun süreli muhafaza	XY	78		78	Judycka ve ark., 2016
Gökkuşığı alabalığı ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	Uzun süreli muhafaza	XX	59		81	Judycka ve ark., 2019
Gökkuşığı alabalığı ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	Uzun süreli muhafaza	XX	76	120	63	Bu çalışma

# Bölüm 6

## Sonuçlar ve Öneriler

Sonuç olarak, sperm kriyoprezervasyonun işleminden sonra N-(2-Merkaptopropionil)-Glisin (MPG) ilavesinin sperm kalitesi üzerinde pozitif etkileri olduğu belirlenmiş ve döllenme, gözlenme ve açılma oranlarında en iyi sonuçlar 2 mM konsantrasyonu ve 25:1 seyreltme oranında elde edilirken, DNA hasarı en az olduğu 1 ve 2 mM konsantrasyonu ve 15:1 seyreltme oranından elde edilmiştir. Ayrıca, fonksiyonel erkek bireylerdeki sperm yoğunluğunun fazla olmasından dolayı uzun süreli sperm muhafazasında sperm yoğunluğunun sonuçları önemli derecede etkilediği, en iyi sonuçların 25:1 sulandırma oranında olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada, sperm kalitesi MPG'nin farklı konsantrasyonlarındaki değişikliklerden etkilenmiş ve en iyi sonuçlar 2 mM konsantrasyondan elde edilmiştir. Bu çalışma ileride sperm ile ilgili yapılacak çalışmalara ışık tutacak ve ticari üretim için faydalı olacaktır.

Sperm kalitesinin üretim aşamasındaki önemini ortaya koyarak yıl boyu kaliteli sperm bulundurabilecek yöntemlerin belirlenmesi ve uygulaması gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler ileride yapılacak çalışmalara ışık tutacaktır. XX erkeklerle sperm kriyoprezervasyonu ve fertilizasyon çalışmalarıyla desteklenmesi önerilmektedir. Kriyoprezervasyon yoluyla genetik materyalin kolayca taşınması ve saklanması, hastalıklara ve ortam koşullarına dayanıklı stoklar elde edilmesi, stokların daha ekonomik olarak tutulması, elektrik, su filtrasyonu, tank temizliği, bakım-onarım, yem ve personel giderleri en aza indirilmesi, işletmelerde kullanılması gereken damızlık ve stok havuzlarının sayısının azaltılması üretim tesisleri açısından büyük önem taşımaktadır. Bu yönüyle üreticiye dolayısıyla ülke ekonomisine katkı sağlayacaktır. Gökkuşluğu alabalığı tatlı sular ve deniz ortamında üretim havuzları, kanallar ve kafes sistemlerinde yapılmaktadır. Bu balığın ulusal ve uluslararası pazar payı yüksektir ve talebi de gün be gün de artmaktadır. Bu balıklarda semen alımında ve kalitesinde karşılaşılabilecek olumsuzluklar üretici ekonomisini menfi olarak etkileyecektir.



Dolayısıyla üreticiye bu anlamda daha verimli yöntem sağlanmış olacaktır. Bir kaç cümlede özetleyecek olursa aşağıdaki gibi sıralayabiliriz; damızlık popülasyonların azaltılması, üstün özelliklere sahip bireylerin elde edilmesi, spermlerden daha uzun süre yararlanılması, yumurta kayıplarının minimize edilmesi, üreme sezonu dışında sperm tedarikinin sağlanması, anaç yetiştiriciliğinde sadece dişi popülasyonların yer alması ve genetik materyalin kolayca muhafaza ve taşınması sağlanacaktır.

# Kaynaklar

- [1] Seyis T. Türkiye’de su ürünleri pazarlama sistemi ve balık hallerinin fonksiyonel durumu (doktora tezi). İzmir: Ege Üniversitesi; 2003.
- [2] Thong NT. Solgaard HS. Consumer’s food motives and seafood consumption. *Food Quality and Preference*, 2016; 56, 181-188
- [3] Froehlich HE. Runge CA. Gentry RR. Gaines SD. Halpern BS. Comparative terrestrial feed and land use of an aquaculture-dominant world PNAS, 2018; 115, 5295-5300.
- [4] Özgür ME. Balıklarda Gamet Hücreleri, Kaliteleri ve Üretim Etkileri, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 2011; 4(2),17-24.
- [5] Abdulselam GÜN. Kızak V. Dünyada ve Türkiye’de su ürünleri üretiminde istatistiki durum. *Menba Kastamonu Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 2019; 5(2), 25-36. 2019.
- [6] FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture Sustainability in Action. 2020a. [erişim tarihi 03.10.2022]. <http://www.fao.org/3/ca9229en/ca9229en.pdf>.
- [7] FAO. World Food and Agriculture Statistical Year Book. 2020b. [erişim tarihi 03.10.2022]. <http://www.fao.org/documents/card/en/c/cb1329en>.
- [8] FAO. Food Supply – Livestock and Fish Primary Equivalent. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/CL> . FAO, 2013; Rome. Erişim tarihi: 03.10.2022.
- [9] TÜİK. Dış Ticaret İstatistikleri <https://biruni.tuik.gov.tr/disticaretapp/menu.zul>. Tepge Yayın No: 355 ISBN: 978-625-8451-46-7. 2022.
- [10] Candemir S. Dağtekin M. Türkiye Su Ürünleri Üretimi ve Yeterlilik Endekslerinin Tahmini. *Acta Aquatica Turcica*. 2020; 16(3), 409-415.

- [11] TUİK. Türkiye İstatistik Kurumu, Su Ürünleri İstatistikleri Haber Bülteni. [erişim tarihi 04.10.2022]. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Su-Urunleri-2020-37252,2021>.
- [12] Tokatlı C. Savaşer S. Öztürk GN. Köse E. Bulut C. Akçimen U. ve diğ. Kestel deresi (Burdur) su kalitesinin belirlenmesi ve alabalık yetiştiriciliği açısından değerlendirilmesi. Journal of Science and Technology of Dumlupınar University, 2012; (028), 1-10. doi:10.26650/ASE2020768078
- [13] Sirkecioğlu AN. Bayır A. Aras N. Haliloğlu HI. Türkiye'deki Doğal ve Kültür Balıkçılığının Mevcut Durumu (1990-2000), Dünyadaki Yeri, Problemleri ve Çözüm Önerileri. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 2002; 33(3), 337-343.
- [14] Yıldırım Ş. Alpbaz A. Türkiye Denizlerinde 100 Ton/Yıl ve Üstü Üretim Kapasitesi Olan Balık Çiftliklerinin Bazı Üretim Saha Özellikleri Üzerine Bir Çalışma. Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2005; 22(1), 53-58.
- [15] FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018-Meeting the sustainable development goals. Rome. Licence: 2018; CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- [16] Eschmeyer WN. Fong JD. Species of Fishes by Family/Subfamily. <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>. 2010.
- [17] Polat N. Uğurlu S. Kandemir G. Türkiye'nin Endemik ve Egzotik Alabalıkları. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 2011; 4(1), 1-9.
- [18] Korkmaz AŞ. Kırkağaç M. Tatlı Suda Beton Havuzlarda ve Denizde Ağ Kafeslerde Yetiştirilen Gökkuşuğu Alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*) Et Verimi, Vücut Kompozisyonu ve Enerji Kapsamı. Tarım Bilimleri Dergisi, 2008; 14(4), 409-410.
- [19] Aydın F. Alabalık biyolojisi ve yetiştirme teknikleri. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümü, Ankara, Turkey. 2009; 30p.

- [20] Çelikkale MS. Atay D. Büyükhatipoğlu Ş. Konuklar Beşgöz Gölünde Ağ Kafeslerde Alabalık Yetiştiriciliğinde Farklı Stok Oranlarının Gelişme ve Yem Değerlendirme Üzerine Etkisi. Doğa Bilim Dergisi, 1982; 5, 147-157.
- [21] Çelikkale MS. İçsu Balıkları ve Yetiştiriciliği. Karadeniz Teknik Üniversitesi Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi, Cilt 1, Birinci Baskı, Basımevi, Trabzon. 1994.
- [22] Akbulut B. Şahin T. Erteken A. Aksungur M. Gündoğan N. Deniz Kafeslerinde Yetiştirilen Alabalıklarda Ekonomik Başlangıç Ağırlığının Tespiti Projesi. 1999; 1(4), 1-50.
- [23] Uğurlu S. Polat N. Samsun Gli Tatlı Su Kaynaklarında Yaşayan Egzotik Balık Türleri. Balıkçılık Bilimleri Dergisi, 2007; 1(3), 139-151. doi: 10.3153/jfscom.2007017.
- [24] Çetinkaya, M. Farklı Oranlarda Gnülin İçeren Yemlerle Beslenen Alabalık (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792)'ların Büyüme Parametreleri ve Sindirim Enzimlerinin Güncellenmesi (yüksek lisans tezi). Mersin: Mersin Üniversitesi; 2017. <https://tez.yok.gov.tr/>
- [25] Yılmaz E. Sayın C. Kıştın F. Nesrin E. Türkiye'de ağ kafeste alabalık yetiştiriciliği, karşılaşılan sorunlar ve çözüm önerileri. Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi, 2008; 4(1), 65-73.
- [26] Emre Y. Kürüm V. Havuz ve kafeslerde alabalık yetiştiriciliği teknikleri. Minpa Matbaa. Tic Ltd Şti, Ankara, 1998; 232.
- [27] Billard R. Cosson MP. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. Journal of Experimental Zoology, 1992; 261(2), 122-131.
- [28] Akçay E. Tekin N. Seçer S. Balık spermasının prezervasyonu. Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1995; 12, 367-373.
- [29] Tyler CR. Sumpter JP. Oocyte growth and development in teleosts. Reviews in fish biology and fisheries, 1996; 6(3): 287-318.

- [30] Von Schalburg KR. Warby CM. Sherwood NM. Evidence for gonadotropin-releasing hormone peptides in the ovary and testis of rainbow trout. *Biology of reproduction*, 1999; 60(6): 1338-1344.
- [31] Köprücü K. Balık Gametlerinin Moleküler ve Hücresel Özellikleri, Kalite Kriterleri ve Ölçüm Teknikleri. *Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2018; 30(1), 7-14.
- [32] Wallace RA. Selman K. Major Protein Changes During Vitellogenesis And Maturation Of *Fundulus* Oocytes. *Developmental Biology*, 1985; 110(2), 492–498. doi:10.1016/0012-1606(85)90106-x.
- [33] Patino R. Sulliva CV. Ovarian Follicle Growth, Maturation, and Ovulation in Teleost Fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2002; 26, 57–70.
- [34] Tagawa M. Hirano T. Presence of Thyroxine in Eggs and Changes in Gts Content During Early Development of Chum Salmon, *Oncorhynchus keta*. *General and Comparative Endocrinology*, 1987; 68(1), 129–135. doi:10.1016/0016-6480(87)90068-2.
- [35] Feist G. Yeoh CG. Fitzpatrick MS. Schreck CB. The Production of Functional Sex-Reversed Male Rainbow Trout With 17.-methyltestosterone and 11  $\beta$ -hydroxyandrostenedione. *Aquaculture*, 1995; 131(1-2), 145–152. doi:10.1016/0044-8486(94)00336-m.
- [36] Hwang PP. Wu SM. Lin JH. Wu LS. Cortisol Content of Eggs and Larvae of Teleosts. *General and Comparative Endocrinology*, 1992; 86(2), 189–196. doi:10.1016/0016-6480(92)90101-o.
- [37] Pelegri F. Maternal Factors in Zebrafish Development. *Developmental Dynamics*, 2003; 228(3), 535–554. doi:10.1002/dvdy.10390.
- [38] Yavuz, H. Balıklarda Sperm ve Yumurta Kalitesini Değerlendirme Kriterleri. *Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 2013; 9(2), 22-36.

- [39] Büyükhatipoğu S. Holtz W. Sperm output in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) effect of age, timing and frequency of stripping and presence of females. *Aquaculture*, 1987; 37(1), 63-71.
- [40] Davies B. Bromage N. The effects of fluctuating seasonal and constant water temperatures on the photoperiodic advancement of reproduction in female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 2002; 205(1-2), 183-200.
- [41] Yavuz, H. Balıklarda sperm ve yumurta kalitesini değerlendirme kriterleri. Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi, 2006; 9(2), 22-36.
- [42] Delihasan Sonay, F. Triploid Karadeniz Alabalığı (*Salmo trutta labrax* Pallas, 1811) Üretimi ve Büyüme Potansiyeli ve Et Kalitesinin Belirlenmesi (doktora tezi). Trabzon: Karadeniz Teknik Üniversitesi; 2013.
- [43] Çevik M. Daşkın A. Alabalık (gökkuşaağı alabalığı) spermasının dondurulması ve değerlendirilmesi. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 2000; 43(2), 23-34.
- [44] Altunok M. Kızak V. Özden O. Türel M. Çevresel Faktörlerin Balıklarda Cinsiyet Dönüşümüne Etkisi. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2008; 25(3), 247-251.
- [45] Budd AM. Banh QQ. Domingos JA. Jerry DR. Sex control in fish: approaches, challenges and opportunities for aquaculture. *Journal of Marine Science and Engineering*, 2015; 3(2), 329-355.
- [46] Özden O. Güner Y. Kızak V. Tatlısu Balık Kültüründe Uygulanan Bazı Biyoteknolojik Yöntemler. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2003; 20(3).
- [47] Zohar Y. Goren A. Tosky M. Pagelson G. Leibovitz D. Koch Y. The bioactivity of gonadotropin releasing hormones and its regulation in the gilthead seabream, *Sparus aurata*: in vivo andin vitro studies. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1989; 7(1), 59-67.

- [48] Yanık T. Kocaman EM. Ayık Ö. Atamanalp M. Evaluation of Transparency, Temperature, Dissolved Oxygen Content and pH Level of Erzurum Porsuk Puddle Water in Terms of Fish Culture. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 2003; 34(2); 151-155.
- [49] Başçınar N. Sonay FD. Biotechnological applications and hybridization in fish. Natural Trout Workshop: Sustainable Farming, Conservation and Fishing, October, Trabzon, Workshop Proceedings, 2009; 67-76.
- [50] Kayış Ş. Altınok İ. Balta F. First reported case of Chironomid midge larva infestations in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) eggs. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 2010; 34(2), 215-218.
- [51] Johnstone R. Simpson TH. Youngson AF. Whitehead C. Sex reversal in salmonid culture: Part II. The progeny of sex-reversed rainbow trout. Aquaculture 1979; 18 (1): 13–19.
- [52] Salioglu H. Melek H. Baycelebi H. Aksungur M. Çakmak E. Başçınar N. ve diğ. Doğu Karadeniz Bölgesi alabalık işletmelerinde anaç stok yönetim sistemi oluşturulması. Aquaculture Studies, 2013; (2).
- [53] Donaldson EM. Manipulation of reproduction in farmed fish. Animal Reproduction Science, 1996; 42(1-4), 381-392.
- [54] Geffen AJ. Evans JP. Sperm traits and fertilization success of male and sex reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 2002; 182, 61–72.
- [55] Nynca J. Kuźmiński H. Dietrich GJ. Hliwa P. Dobosz S. Liszewska E. ve diğ. Changes in sperm parameters of sex-reversed female rainbow trout during spawning season in relation to sperm parameters of normal males. Theriogenology. 2012 a; 77:1381–1389. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.11.001.
- [56] Nynca J. Kuźmiński H. Dietrich GJ. Hliwa P. Dobosz S. Liszewska E. ve diğ. Biochemical and physiological characteristics of semen of sexreversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Theriogenology. 2012b; 77: 174–183. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.07.039.

- [57] Sezgi HB. Bekcan S. Farklı periyotlarda 17 $\alpha$ -metilttestosteron ile beslemenin tilapya balıklarının (*Oreochromis niloticus* L.) cinsiyet dönüşümü üzerine etkileri. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi, 2008; 14(3), 222-229.
- [58] Teskeredžić E. Donaldson EM. Teskeredžić Z. Solar II. McLean E. Comparison of hydrostatic pressure and thermal shocks to induce triploidy in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Aquaculture, 1993; 117(1-2), 47-55.
- [59] Lymbery AJ. Genetic improvement in the Australian aquaculture industry. Aquaculture Research, 2000; 31(1), 145-149.
- [60] Turan C. Applications of Biotechnology in Aquaculture, (in Turkish). IV. Fisheries Symposium, 28-30 June 2000, Erzurum
- [61] Gökdağ M. Alabalık seminal plazmasının koç spermasının spermatolojik özellikleri ve viabilitesi üzerine etkisi (doktora tezi). Bursa: Uludag Üniversitesi; 2006.
- [62] Tekin N. Secer S. Akcay E. Bozkurt Y. Kayam M. The effect of age on spermatological properties in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W., 1792). Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 2003; 27(1), 37-44.
- [63] Şahin T. Köse Ö. Kurtoğlu İZ. Gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nın spermatolojik özellikleri ve spermının kısa süreli muhafazası. 2013.
- [64] Metin S. Diler Ö. Didinen H. Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Tıbbi Bitkilerin Anestezik Olarak Kullanımı. Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi, 2018; 14(4); 351-356.
- [65] Koçak V. Can E. 2-Fenoksietanol ve karanfil esansiyel yağının sarı prenses (*Labidochromis caeruleus*) ve ahli (*Sciaenochromis fryeri*) balıkları üzerine anestetik etkileri. Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi, 2019; 12(2); 13-21.
- [66] Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. Animal reproduction science, 2000a; 62:3-22.



- [67] Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, 1995; 7:871–891.
- [68] Drobnis EZ. Crowe LM. Berger T. Anchordoguy TJ. Overstreet JW. Crowe JH. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: A demonstration using sperm as a model. *Journal of Experimental Zoology*, 1993; 265:432–437.
- [69] Holt WV. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual Differences. *Theriogenology* 2000b; 53:47–58.
- [70] Sieme H. Oldenhof H. Wolkers WF. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Animal reproduction science*, 2016; 169:2–5.
- [71] Parks JE. Graham JK. Effects of Cryopreservation Procedures on Sperm Membranes. *Theriogenology*. 1992; 209–222.
- [72] Pegg DE. The history and principles of cryopreservation. *Seminars in reproductive medicine*, 2002; 20: 5-13.
- [73] Barbas JP. Mascarenhas RD. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank* 2009; 10:49–62.
- [74] Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal reproduction science*. 2000; 60–61:481–492.
- [75] Cabrita E, Sarasquete C, Martinez-Paramo S, Robles V, Beirao J, Perez-Cerezales S. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *Journal of Applied Ichthyology*, 2010;26:623–635. doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01556.x.
- [76] Binder TR. Riley SC. Holbrook CM. Hansen MJ. Bergstedt RA. Bronte CR. ve diğ. Spawning site fidelity of wild and hatchery lake trout (*Salvelinus namaycush*) in northern Lake Huron. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2016; 73(1), 18-34.
- [77] Islam SM. Akhter T. Tale of fish sperm and factors affecting sperm motility: a review. *Advances in Life Sciences*, 2011; 1:11–19.

- [78] Nur Z. Dogan I. Soylu MK. Ak K. Effect of Different Thawing Procedures on The Quality of Bull Semen. *Revue de médecine vétérinaire*, 2003; 154:487–490.
- [79] Gallego V. Pérez L. Asturiano JF. Yoshida M. Relationship between spermatozoa motility parameters, sperm/egg ratio, and fertilization and hatching rates in pufferfish (*Takifugu niphobles*). *Aquaculture*, 2013; 416, 238-243.
- [80] Bucak MN. Tekin N. Kryoprotektanlar ve gamet hücrelerinin dondurulmasında kryoprotektif etki, *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* 2007; 54: 67-72.
- [81] Hatipoğlu T. Akcay E. Fertilizing ability of short-term preserved spermatozoa Abant trout (*Salmo trutta abanticus* T, 1954). *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2010; 57(1), 33-38.
- [82] Çevik M. Daskin A. (2003). Freezing and Evaluation of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen. *Lalahan Hayvancılık ve Araştırma Enstitüsü Dergisi*. 2003; 43(2), 23-34.
- [83] Tekin N. Sece S. Akcay E. Bozkurt Y. Kayam S. Effects of glycerol additions on post-thaw fertility of frozen rainbow trout sperm, with an emphasis on interaction between extender and cryoprotectant. *Journal of Applied Ichthyology*. 2007; 23 (1): 60-63.
- [84] Özgöray ED. Akçay E. Freezing Protocol Optimization for Gilthead Seabream Sperm, *Sparus aurata* L. *Acta Veterinaria Eurasia*, 2020; 46(2), 54-62.
- [85] Bozkurt Y. Akcay E. Tekin N. Secer S. Effect of freezing techniques, extenders and cryoprotectants on the fertilization rate of frozen rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm. 2005; 57:1-4.
- [86] Bozkurt Y. Yavas I. Karaca F. Cryopreservation of brown trout (*Salmo trutta macrostigma*) and ornamental koi carp (*Cyprinus carpio*) sperm. *Current Frontiers in Cryopreservation*, Edited by: Katkov, I. Section IV, 2012; 293-304.
- [87] Ustuner B. Alcay S. Toker MB. Nur Z. Gokce E. Sonat FA. ve diğ. Effect of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) seminal plasma on the post-thaw quality of ram

semen cryopreserved in a soybean lecithin-based or egg yolk-based extender. *Animal reproduction science*, 2016; 164: 97-104.

[88] Özgörey ED. Akçay E. Deniz Balıklarında Sperma, Yumurta ve Embriyo dondurulması (Derleme). *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 2010; 50(1), 53-64.

[89] Bozkurt Y. Yavaş İ. Yıldız C. Effect of extender supplemented with different sugar types on post-thaw motility, viability and fertilizing ability of cryopreserved common carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa. *The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgah*, 2016; 68, 1334.

[90] Robles V. Cabrita E. Cuñado S. Herráez MP. Sperm cryopreservation of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): parameters that affect its ability for freezing. *Aquaculture*, 2003; 224(1-4), 203-212.

[91] Bozkurt Y. Yavaş İ. Bucak MN. Kıran TR. Gül A. Cryoprotective effect of vitamin E supplementation of different extenders on quality and fertilizing ability of frozen-thawed brown trout sperm. *Biopreservation and Biobanking*, 2021; 19(3), 171-177.

[92] Kulaksız R. Çebi Ç. Akçay E. Daşkın A. The protective effect of egg yolk from different avian species during the cryopreservation of Karayaka ram semen. *Small ruminant research*, 2010; 88(1), 12-15.

[93] Bozkurt Y. Yavas I. Karaca F. Cryopreservation of brown trout (*Salmo trutta macrostigma*) and ornamental koi carp (*Cyprinus carpio*) sperm. *Current Frontiers in Cryopreservation*, Edited by: Katkov, I. Section IV, 2012; 293-304.

[94] Saleh RA. Agarwal A. Sharma RK. Nelson DR. Thomas Jr AJ. Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. *Fertility and sterility*, 2002; 78(3), 491-499.

[95] Aydılek N. Aksakal M. Testosteronun tavşanlarda karaciğer antioksidan sistemi üzerine etkisi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2013; 14(2), 22-25.

- [96] Ali DÖ. Koç Spermasının Dondurulmasında Antioksidanların Etkisi. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi, 2015; 10(1).
- [97] Öğretmen F. Inanan BE. Öztürk M. Protective effects of propolis on cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. Cryobiology, 2014; 68(1), 107-112.
- [98] Inanan BE. Öğretmen F. Inanan T. Yılmaz F. Total antioxidant capacity, catalase activity, and lipid peroxidation changes in seminal plasma of sex-reversed female and male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during spawning season. Theriogenology. 2016; 86, 1975–1982.
- [99] Öğretmen F. Inanan BE. Kutluyer F. Kayim M. Effect of semen extender supplementation with cysteine on postthaw sperm quality, DNA damage, and fertilizing ability in the common carp (*Cyprinus carpio*). Theriogenology, 2015; 83(9), 1548-1552.
- [100] Birben E. Sahiner UM. Sackesen C. Erzurum S. Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. World allergy organization journal, 2012; 5(1), 9-19.
- [101] Li J. Qiu X, Guo W. Prospective analysis of tiopronin in prevention of sorafenib and antiviral therapy inducing liver toxicity in advanced hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. Medical Oncology, 2015; 32(10), 238.
- [102] Li P. Xi MD. Du H. Qiao XM. Liu ZG. Wei QW. Antioxidant supplementation, effect on post-thaw spermatozoan function in three sturgeon species. Reproduction in Domestic Animals, 2018; 53:287–295. doi.org/10.1111/rda.13103.
- [103] Fetoni AR. Sergi B. Ferraresi A, Paludetti G, Troiani D. Protective effects of alpha-tocopherol and tiopronin against cisplatin-induced ototoxicity. Acta otolaryngologica, 2004; 124, 421–426.
- [104] Çakır Sahilli Y. Kutluyer F. Kocabaş M. Evaluation of The Efficacy of N-(2-Mercaptopropionyl)-Glycine on Motility And Longevity of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Spermatozoa. Research Journal of Biology Sciences, 2019; 12(2): 04-06.

- [105] Al-Badry KI. Effect of Various Thawing Times and Temperatures on Frozen Semen Quality in Plastic Straws of Artificial Insemination of Bulls in Iraq. *International Journal of animal and veterinary advances*, 2012; 4:384–388.
- [106] Borah BKD. Deka BC. Biswas RK. Chakravarty P. Deori S. Sinha S. Effect of thawing methods on frozen semen quality of yak (*Poephagus grunniens* L.) bulls. *Veterinary World*. 2015; 8:831–834.
- [107] Hayashi Y. Isobe N. Characteristics of Cryopreserved Spermatozoa from a Holstein-Friesian Bull Thawed at Different Temperature. *Journal of International Development and Cooperation*, 2005; 12:107–110.
- [108] Jotanović S. Jovičić M. Savić Đ. Vekić M. Bosančić B. Stančić I. Impact of thawing temperature on quality parameters of bull's semen. In VII International Scientific Agriculture Symposium, "Agrosym 2016", 6-9 October 2016, Jahorina, Bosnia and Herzegovina. Proceedings (pp. 2467-2471). University of East Sarajevo, Faculty of Agriculture. 2016.
- [109] Dolezalová M. Ptáček M. Stádník L. Ducháček J. Effect of different thawing methods on bull's semen characteristics. *Acta Univ Agric Silvicae Mendelianae Brun* 2017; 65:815–822.
- [110] Chaiprasat S. Benjakul W. Chartchue A. Effect Of Bull Semen Thawing Methods On Sperm Progressive Motility. *Chiang Mai Veterinary Journal*, 2006; 4:25–29.
- [111] Muiño R. Tamargo C. Hidalgo CO. Peña AI. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. *Animal reproduction science*, 2008; 109:27–39.
- [112] İli P. Sarı F. Sperm kriyoprezervasyonunda DNA fragmentasyonunun araştırılması. *Türkiye Klinikleri J Reprod Artif Insemin-Special Topics*. 2017; 3(2):96-104.
- [113] Türk G. Aksu EH. Bozkurt T. Spermatozoon DNA'sı hasarı. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2006; 20(1): 85-95.

- [114] Özsait B. Özcan AGT. Köksal UBG. Ünaltuna NE. Sperm kriyoprezervasyonu: Kriyo-hasar ve DNA fragmantasyonu ilişkisi. *Androloji Bülteni*, 2014; 16(58), 264-68.
- [115] Fidan AF. DNA hasar tespitinde tek hücre jel elektroforezi. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 2005; 8(1), 41-52.
- [116] Gökçe, E. (2019). Sistein ile kombine edilen alabalık seminal plazmasının koç spermasının dondurulabilirliği üzerine etkisi (doktora tezi). Bursa. Uludağ Üniversitesi. <http://hdl.handle.net/11452/10548>
- [117] Dunham RA, Gynogenesis, androgenesis, cloned populations and nuclear transplantation. *Aquaculture and fisheries biotechnology: Genetic Approaches*, 2004; 54-64.
- [118] Turan C. Applications of Biotechnology in Aquaculture, (in Turkish). IV. Fisheries Symposium, 28-30 June 2000, Erzurum
- [119] Pandian TJ. Sheela SG. Hormonal induction of sex reversal in fish. *Aquaculture*, 1995; 138(1-4), 1-22.
- [120] Lakra WS. Cryogenic preservation of fish spermatozoa and its application to aquaculture, *Indian Journal of Cryogenics*. 1993; 18 (1-4): 171-176.
- [121] Linhart U. Billard R. Proteau JP. Cryopreservation of European catfish (*S. glanis* L.) spermatozoa, *Aquaculture*. 2013; 115:347-359.
- [122] Lahnsteiner F. Berger B. Horvath A. Urbanyi B. Weismann T. Cryopreservation of spermatozoa in Cyprinid fishes, *Theriogenology*. 2000; 54: 1477-1498.
- [123] Lahnsteiner F. Berge B. Weismann T. Patzner RA. Changes in morphology, physiology, metabolism and fertilization capacity of rainbow trout semen following cryopreservation. *The Progressive Fish-Culturist*, 1996; 58: 149-159.
- [124] Babiak I. Glogowski J. Luczynski MJ. Kucharczyk D. Luczynski M. Cryopreservation of the milt of the northern pike. *Journal of Fish Biology*, 1995; 46(5), 819-828.

- [125] Bailey JL. Morrie A. Cormier N. Semen cryopreservation success and persistent in farm species. Canadian journal of animal science, 2003; 83: 393- 401.
- [126] Agarwal NK. Cryopreservation of fish semen. Himalayan Aquatic Biodiversity Conservation and New Tools in Biotechnology. 1st ed. Transmedia Publication, Uttarakhand, 2011;104-127.
- [127] Palasz AT. Mapletoft RJ. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: Recent advances. Biotechnology Advances, 1996; 14: 127-149.
- [128] Duru NK. Morshedi M. Schuffner A. Oehninger S. Cryopreservation-thawing of fractionated human spermatozoa and plasma membrane translocation of phosphatidylserine. Fertility and sterility, 2001; 75: 263-268.
- [129] Nagata S. Apoptosis by death factor. cell, 1997; 88(3), 355-365.
- [130] Suquet M. Dreanno C. Fauvel C. Cosson J. Billard R. Cryopreservation of sperm in marine fish. Aquaculture Research: Original Articles. 2000; 31:231–243.
- [131] Geffen G. Rosa V. Luciano M. Sex differences in the perception of tactile simultaneity. Cortex, 2000;36(3); 323-335.
- [132] Fowler A. Toner M. Cryo-injury and biopreservation. Annals of the New York Academy of Sciences, 2006; 1066: 119–135.
- [133] Kopeika J. Kopeika E. Zhang T. Rawson DM. Studies on the Toxicity of Dimethyl Sulfoxide, Ethylene Glycol, Methanol and Glycerol to Loach (*Misgurnus fossilis*) Sperm and the Effect on Subsequent Embryo Development. CryoLetters, 2003; 24: 365–374.
- [134] Yıldız C. Kaya A. Aksoy M. Tekeli T. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. Theriogenology, 2000; 54: 579-585.

- [135] Storey BT. Noiles EE. Thompson KA. Comparison of glycerol, other polyols, trehalose and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*, 1998; 37: 46-58.
- [136] Horvath A. Miskolczi E. Urbanyi B. Cryopreservation of common carp sperm. *Aquatic Living Resources*, 2003; 16(5), 457-460..
- [137] Alavi SMH. Cosson J. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality, *Cell Biol. Int.* 2006; 30: 1–14.
- [138] Meyers SA. Spermatozoal response to osmotic stress. *Animal reproduction science*, 2005; 89: 57–64.
- [139] Curry MR. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of reproduction*, 2000; 5: 46-52.
- [140] Purdy PH. Barbosa EA. Praamsma CJ. Schisler GJ. Modification of trout sperm membranes associated with activation and cryopreservation. Implications for fertilizing potential. *Cryobiology*. 2016; 73:73–79.
- [141] De Leeuw FE. Chen HC. Colenbrander B. Verkleij AJ. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes, *Cryobiology*. 1990; 27(2): 171-83.
- [142] Check ML. Check JH. Long R. Detrimental effects of cryopreservation on the structural and functional integrity of the sperm membrane, *Archives of andrology*, 1991; 27(3): 155-60.
- [143] Varner DD. Johnson L. From a sperm's eyeview revisiting our perception of this intriguing cell, *AAEP Proceedings*. 2007; 53: 104-177.
- [144] Maise G. Comparison de l'effet cryoprotecteur de différents glucides sur le sperme de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Living Resources*, 1994; 7: 217–219.
- [145] Warnecke D. Pluta HJ. Motility and fertilizing capacity of frozen/thawed common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm using dimethyl acetamide as the main cryoprotectant. *Aquaculture*, 2003; 215: 167-185.



- [146] Irawan H. Vuthiphandchai V. Nimrat S. The effect of extenders, cryoprotectants and cryopreservation methods on common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. *Animal reproduction science*, 2010; 122: 236-243.
- [147] Lahnsteiner F. Mansour NA. Comparative study on antioxidant systems in semen of species of the Percidae, Salmonidae, Cyprinidae, and Lotidae for improving semen storage techniques. *Aquaculture*. 2010; 307:130–140.
- [148] De Leeuw AM. Den Daas JHG. Woelders H. The fix vital stain method: simultaneous determination of viability and acrosomal status of bovine spermatozoa. *Journal of andrology*, 1991; 12(2); 112-118.
- [149] Rana KJ. Cryopreservation of fish spermatozoa. In *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols* (pp. 151-165). Humana Press, Totowa, NJ. 1995.
- [150] Bozkurt Y. Alabalık spermasının kriyobiyolojik muhafazasının mekanizması. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 2011; (1), 19-24.
- [151] Cheng S. Sheng Z. Zhu J-Q. Wu XF. Effects of trehalose, bovine serum albumin, and sucrose, on the integrity of the plasma membrane of *Pseudosciaena crocea* semen after cryopreservation. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 2016; 68. 1219.12 pages.
- [152] Amann RP. Weaknesses in reports of fertility for horses and other species, *Theriogenology*. 2005; 63(3): 698-715.
- [153] Rodriguez-Martinez H. Wallgren M. Advances in boar semen cryopreservation review article, *Veterinary medicine international*, 2011; 1-5.
- [154] Abinawanto A. Nurman K. Lestari R. The Effect of Sucrose on Sperm Quality of *Osphronemus goramy* Two Days Post-cryopreservation. *Journal of Agricultural Science and Technology B*, 2012; 2(B): 204-207.
- [155] Figueroa E. Risopatrón J. Sánchez R. Isachenko E. Merino O. Isachenko V. ve diğ. Spermatozoa vitrification of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effect of seminal plasma on physiological parameters. *Aquaculture*, 2013; 372, 119-126. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.10.019>.

- [156] Dietrich GJ. Nynca J. Dobosz S. Zalewski T. Ciereszko A. Application of glucose–methanol extender to cryopreservation of semen of sex-reversed female’s rainbow trout results in high post-thaw sperm motility and fertilizing ability. *Aquaculture*, 2014; 434, 27-32.
- [157] Kutluyer F. Kayim M. Öğretmen F. Büyükleblebici S. Tuncer PB. Cryopreservation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spermatozoa: effects of extender supplemented with different antioxidants on sperm motility, velocity and fertility. *Cryobiology*, 2014; 69(3), 462-466.
- [158] Ciereszko A. Dietrich GJ. Nynca J. Krom J. Dobosz S. Semen from sex-reversed rainbow trout of spring strain can be successfully cryopreserved and used for fertilization of elevated number of eggs. *Aquaculture*, 2015; 448, 564-568.
- [159] Nayan PM. Gupta SK. Srivastva SK. Krishna G. Cryopreservation of Rainbow Trout Spermatozoa (*Oncorhynchus mykiss*) Using Different Cryodiluents. *CryoLetters*, 2015; 36(2), 137-147.
- [160] Viveiros A. Nascimento AF. Leal MC. Gonçalves A Orfao LH. Cosson J. Methyl glycol, methanol and DMSO effects on post-thaw motility, velocities, membrane integrity and mitochondrial function of *Brycon orbignyanus* and *Prochilodus lineatus* (Characiformes) sperm. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2015; 41(1), 193-201. doi.org/10.1007/s10695-014-0016-7
- [161] Zilli L. Schiavone R. Zonno V. Storelli C. Vilella S. Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation. *Cryobiology*, 2003; 47(3), 227-235.
- [162] Tozan-Beceran A. Şehirli AÖ. Eksioğlu-Demiralp E. Şener G. Omurtag GZ. Melatonin protects against acrylamide induced oxidative tissue damage in rats, *Marmara Pharmaceutical Journal*, 2012; 16: 213-221. <http://dSPACE.marmara.edu.tr/bitstream/handle/11424/1478/5000010736-000016782-1-sm.pdf?sequence=1>.
- [163] Judycka S. Cejko BI. Dryl K. Dobosz S. Grudniewska J. Kowalski RK. The effect of supplementation of a trehalose-based extender with KCl on rainbow trout

(*Oncorhynchus mykiss*) sperm freezability and post-thaw motility. *Aquaculture*, 2016; 465 (1); 303-310. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.09.029

[164] Judycka S. Ciereszko A. Dobosz S. Zalewski T. Dietrich GJ. Effect of dilution in sperm maturation media and time of storage on sperm motility and fertilizing capacity of cryopreserved semen of sex-reversed female rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology*, 2017; 245, 89-93.

[165] Kutluyer F. Kocabaş M. Dose Dependent Treatment with Boric Acid Induces More Changes in the Sperm Cells of Endangered Anatolian Trout *Salmo rizeensis*. *International journal of aquaculture and fishery sciences*, 2017; 3(2): 042-045.

[166] Di Iorio M. Esposito S. Rusco G. Roncarati A. Miranda M. Gibertoni PP. ve diğ. Semen cryopreservation for the Mediterranean brown trout of the Biferno River (Molise-Italy): Comparative study on the effects of basic extenders and cryoprotectants. *Scientific Reports*, 2019; 9(1), 1-9.

[167] Judycka S. Nynca J. Liszewska E. Mostek A. Ciereszko A. Comparative analysis of sperm freezability of sex-reversed female brook trout and sex-reversed female rainbow trout semen. *Aquaculture*, 2019; 498: 201-207.

[168] Gazo I. Shaliutina-Kolešová A. Dietrich MA. Linhartová P. Shaliutina O. Cosson J. The effect of reactive oxygen species on motility parameters, DNA integrity, tyrosine phosphorylation and phosphatase activity of common carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, 2015; 82(1), 48-57.

[169] Judycka S. Słowińska M. Nynca J. Liszewska E. Dobosz S. Ciereszko A. Oxidative stress in cryopreserved semen of sex-reversed female and normal male rainbow trout. *Aquaculture*, 2020; 528, 735531. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735531.

[170] Nynca J. Słowińska M. Judycka S. Dobosz S. Ciereszko A. Acquiring the potential for motility is accompanied by profound changes in the testicular sperm proteome of sex-reversed female and normal male rainbow trout. *Aquaculture*, 2020; 521, 735033.

- [171] Glander HJ Schaller J. Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *Basic science of reproductive medicine*, 1999; 5: 109–115.15.
- [172] Pena FJ. Johannisson A. Wallgren M. Rodriguez- Martinez H. Assessment of fresh and frozen-thawed boar semen using an annexin-V as-say: a new method of evaluating sperm membrane integrity. *Theriogenology*, 2003; 60: 677–689.
- [173] Anzar M. He L. Buhr MM. Kroetsch TG. Pauls KP. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flowcytometry and its relationship with fertility. *Biology of reproduction*, 2002; 66: 354–360.17.
- [174] Januskauskas A. Johannisson A. Rodriguez-Martinez H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology*, 2003; 60: 743–758.
- [175] Martin G. Sabido O. Durand P. Levy R. Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biology of Reproduction*, 2004; 71, 28–37. DOI 10.1095/biolreprod.103.024281.
- [176] Şahinöz E. Aral F. Doğu Z. Koyuncu İ. Yüksekdağ Ö. Cryopreservation of Mesopotamian catfish (*S. triostegus* H., 1843) spermatozoa: Effects of diluents and osmotic pressure on spermatozoa DNA damage, rate and duration of motility. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 2020; 19(5): 2293-2307. DOI: 10.22092/ijfs.2018.119818.
- [177] Sandoval-Vargas L. Silva Jiménez M. Risopatrón González J. Villalobos EF. Cabrita E. Valdebenito Isler I. Oxidative stress and use of antioxidants in fish semen cryopreservation. *Rev Aquacult*. 2021; 13:365-387. doi.org/10.1111/raq.12479.
- [178] Shaliutina-Kolesova A. Xian M. Nian R. Antioxidant defence system in protein fractions of common carp (*Cyprinus carpio*) seminal plasma. *Czech Journal of Animal Science*, 2019; 64:265–271.
- [179] Kocabaş FK. Evaluation of the in vitro effect of cystein on sperm quality of Çoruh trout (*Salmo coruhensis*). *Sustainable Aquatic Research*, 2022; 1(1).

- [180] Dziewulska K. Rzemieniecki A. Czerniawski R. Domagala J. Post-thawed motility and fertility from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) sperm frozen with four cryodiluents in straws or pellets. *Theriogenology*, 2011; 76: 300-311.
- [181] Güner Y. Peker Z. Altunok M. Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nın Fotoperiyodik Kontrollü Yumurtlamasında Poliploidi için Sıcaklık Şoku Uygulamasının Optimizasyonu. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2016; 16(4), 797-804.
- [182] Kocyigit A. Keles H. Selek S. Guzel S. Celik H. Erel O. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2005; 585(1-2), 71-78. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.04.012>
- [183] Doğu Z. Farklı oranlarda çörek otu (*Nigella sativa* l.) özütü ilave edilmiş pelet yem ile beslenen gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*; w., 1792) üreme mevsimi boyunca bazı spermatolojik parametrelerin, spermatozoadaki DNA hasarının ve seminal plazma kompozisyonundaki değişimlerin belirlenmesi (doktora tezi). Ankara: Ankara Üniversitesi; 2011.
- [184] Türk G. Aksu EH. Bozkurt T. Spermatozoon DNA'sı hasarı. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2006; 20(1): 85-95
- [185] Akçay E. Bozkurt Y. Seçer S. Tekin N. Cryopreservation of mirror carp semen. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 2004; 28(5), 837-843.
- [186] Isa MH. Arslan T. The comparison and improvement of artificial media used for the maturation of testicular sperm of rainbow trout neomales. *Aquaculture*, 2021; 533, 736115.
- [187] Kutluyer F. Öğretmen F. İnanan BE. Effects of semen extender supplemented with L-methionine and packaging methods (straws and pellets) on post-thaw goldfish (*Carassius auratus*) sperm quality and DNA damage. *CryoLetters*, 2015; 36(5), 336-343.

- [188] Kutluyer F. Aksu Ö. Kocabaş M. Effect of L-tryptophan on sperm quality of tigris scraper (*Capoeta umbla*)(Pisces: Cyprinidae) after cryopreservation. *Cryoletters*, 2019; 40(2), 77-82.
- [189] Kocabaş M. Kutluyer F. Ertekin Ö. Aksu Ö. Başçınar N. Improvement of sperm motility of *Oncorhynchus mykiss* and *Salvelinus fontinalis* by L-tryptophan. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 2019; 65(3), 187-193.
- [190] Kutluyer F. Öğretmen F. Inanan BE. Cryopreservation of Goldfish (*Carassius auratus*) spermatozoa: Effects of extender supplemented with taurine on sperm motility and DNA damage. *CryoLetters*, 2016;37(1), 41-46.
- [191] Kledmanee K. Taweedet S. Thaijongruk P. Chanapiwat P. Kaeoket K. Effect of L-cysteine on chilled carp (*Cyprinus carpio*) semen qualities. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 2013; 43(1), 91.
- [192] White SH. Jacobs RE. The evolution of proteins from random amino acid sequences. I. Evidence from the lengthwise distribution of amino acids in modern protein sequences. *Journal of molecular evolution*, 1993; 36(1), 79-95.
- [193] Trimeche AYJM. Yvon JM. Vidament M. Palmer E. Magistrini M. Effects of glutamine, proline, histidine and betaine on post-thaw motility of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 1999; 52(1): 181-191.
- [194] Funahashi H. Sano T. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 C. *Theriogenology*, 2005; 63(6), 1605-1616.
- [195] Kaeoket K. Chanapiwat P. Tummaruk P. Techakumphu M. Supplemental effect of varying L-cysteine concentrations on the quality of cryopreserved boar semen. *Asian journal of andrology*, 2010; 12(5), 760.
- [196] Khalili B. Jafaroghli M. Farshad A. Paresh-Khiavi M. The effects of different concentrations of glycine and cysteine on the freezability of Moghani ram spermatozoa. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2010; 23(3), 318-325.

- [197] Partyka A. Nizanski W. Bajzert J. Qukaszewicz E. Ochota M. The effect of cysteine and superoxide dismutase on the quality of postthawed chicken sperm. *Cryobiology*, 2013; 67, 132-6.
- [198] Kohen R. Nyska A. Invited review: oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic pathology*, 2002; 30: 620–650.
- [199] Nynca J. Dietrich GJ. Dobosz S. Grudniewska J. Ciereszko A. Effect of cryopreservation on sperm motility parameters and fertilizing ability of brown trout semen. *Aquaculture*, 2014; 433, 62-65.
- [200] Silva SV. Soares AT. Batista AM. Almeida FC. Nunes JF. Peixoto CA. ve diğ. In vitro and in vivo evaluation of ram sperm frozen in tris egg-yolk and supplemented with superoxide dismutase and reduced glutathione. *Reproduction in domestic animals*, 2011; 46: 874–881. doi: 10.1111/j.1439-0531.2011.01758. x.
- [201] Li J. Liu Q. Zhang S. Evaluation of the damage in fish spermatozoa cryopreservation. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2006; 24: 4- 370-377. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02842852>.
- [202] Condorelli RA. La Vignera S. Di Bari F. Unfer V. Calogero AE. Effects of myoinositol on sperm mitochondrial function in-vitro. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.*, 2011; 15(2): 129-34. <https://www.europeanreview.org/article/884>.
- [203] Musset B. Clark RA. Decoursey TE. Petheo GL. Geiszt M. Chen Y. ve diğ. NOX5 in human spermatozoa: expression, function, and regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 2012; 287(12): 9376-9388. Doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.314955>
- [204] Donnelly ET. McClure N. Lewis SE. Glutathione and hypotaurine in vitro: effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. *Mutagenesis*, 2000; 15(1): 61-68.
- [205] Agarwal A. Qiu E. Sharma R Laboratory assessment of oxidative stress in semen. *Arab Journal of Urology*, 2018; 16(1): 77-86.

- [206] Colás C. Junquera C. Pérez-Pé R. Cebrián-Pérez JA. Muiño-Blanco T. Ultrastructural study of the ability of seminal plasma proteins to protect ram spermatozoa against cold-shock. *Microscopy Research and Technique*, 2009; 72(8): 566-572.
- [207] Venkatesh S. Riaz AM. Kumar M. Shamsi MB. Tanwar M. Deecaraman M. ve diğ. Oxidative stress: a marker of male in fertility, *Obstetrics and Gynecology Today*, 2009; 14: 34–36.
- [208] Aitken RJ. Gordon E. Harkiss D. Twigg JP. Milne P. Jennings Z. ve diğ. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biology of reproduction*, 1998; 59(5): 1037-1046.
- [209] Grunewald S. Sharma R. Paasch U. Glander HJ. Agarwal A. Impact of caspase activation in human spermatozoa. *Microscopy research and technique*, 2009; 72: 878–888.
- [210] Zobeiri F. Sadrkhanlou R. Salami S. Karim Mardani K. Abbas Ahmadi A. The effect of ciprofloxacin on sperm DNA damage, fertility potential and early embryonic development in NMRI mice. *Veterinary Research Forum*, 2012; 3 (2):131-135.
- [211] Shigenaga MK. Hagen TM. Ames BN. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994; 91(23), 10771-10778.
- [212] Subash P. Assessment of Oxidative DNA Damage by Alkaline Comet Assay in Human Essential Hypertension. *Indian J Clin Biochem.*, 2016; 31(2): 185–193.
- [213] Bağış H. Odaman H. Sağırkaya H. Dinnyes A. Production of transgenic mice from vitrified pronuclear-stage embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 2002; 61: 173-179.
- [214] Sağırkaya H. Değişik gelişim dönemlerinde bulunan hibrit fare embriyolarının vitrifikasyon yöntemiyle dondurulması (Doktora Tezi). U.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa. 2001.



[215] Yang H. Norris M. Winn R. Tiersch TR. Evaluation of cryoprotectant and cooling rate for sperm cryopreservation in the euryhaline fish medaka *Oryzias latipes*. *Cryobiology*, 2010; 61(2): 211-219.

[216] Martinez HR. Ekwall H. Electron microscopy in the assessment of cryopreserved spermatozoa viability. *The Americas Microscopy and Analysis*, 1998; 11-13.

# Ek B

## Tezden Üretilmiş Yayınlar

### Konferans Bildirileri

**1. Doğan M**, Kutluyer Kocabaş F, Kocabaş M, Can E. Spermatozoa cryopreservation of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): The effect of dilution rate and a N-(2-Mercaptopropionyl)-Glycine-based extender on sperm motility and fertilizing capacity. 2nd International Congress on Multidisciplinary Natural Sciences (ICOMNAS-2022), Dec 01-02 2021 Ankara / TURKEY. (**Sözlü bildiri**).

**2. Doğan M**, Kutluyer Kocabaş F, Kocabaş M, Can E. Sperm cryopreservation in sex-reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). 2nd International Congress of Engineering and Natural Sciences (ICENSS 2022), May 07-09 2022. Ankara / TURKEY (**Sözlü bildiri**).

### Makaleler

**1. Doğan M**, Can E, Kutluyer Kocabaş F. Spermatozoa cryopreservation of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): The effect of dilution rate and a N-(2-Mercaptopropionyl)-Glycine-based extender on sperm motility and fertilizing capacity. Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology

# Özgeçmiş

Adı Soyadı: Mustafa Doğan

## Eğitim:

1997–2001 Çukurova Üniversitesi, Su Ürünleri Müh. Bölümü  
2002–2004 Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Ents.  
2019–2022 İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi, Fen Bilimleri Ents.

## İş Deneyimi:

2001 – 2002 Harran Üniversitesi Kâhta MYO (Ücretli)  
2006 – 2012 Önder Su Ürünleri Alabalık Yetiştiriciliği (Ürt. Müd.)  
2012 – 2014 Bağcı Balık A.Ş. Alabalık Yetiştiriciliği (Ürt. Müd.)  
2014 – 2019 Ayhan Alp Alabalık Ürt. Koordinatörü.  
2019 – 2021 Abalıoğlu Balık ve Gıda Ürünleri A.Ş. Alabalık Ürt. Koordinatörü.

## Yayımlar (varsa):

1. **Doğan, M**, “Hatay Bölgesi’ndeki Su Kaynaklarından Alınan Balık (*Carasobarbus luteus* HECKEL, 1843) ve Su Örneklerinde Ağır Metal Düzeyleri”, Yüksek Lisans Tezi, 76 s., Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2004.

2. **Doğan M**, Tanrikul TT, Dincturk E. Lerneosis in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Cage Culture. April 2018. DOI: 10.13140/RG.2.2.16325.76006 Conference: International Congress on Engineering and Life Science, 2018. **(Poster bildirisi)**.

3. **Doğan M**, Gökçek CK. Farklı protein kaynaklarının gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792), juvenillerinin proteaz aktivitesi üzerine etkisi. 6. Ulusal Alabalık Sepmozyumu. 2022. Isparta. **(Sözlü bildirisi)**.

4. **Doğan M**, Sex control in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic Animal Reports. x(y) aa-bb.

5. Yılmaz AB, **Dogan M.** Heavy metals in water and in tissues of himri (*Carasobarbus luteus*) from Orontes (Asi) River, Turkey. Environ. Monit. Assess DOI 10.1007/s10661-007-0005-8. 2008.

6. Yılmaz AB, **Dogan M.** Levels of Heavy Metals in Water and Fish (*Carasobarbus luteus* Heckel, 1843) were Sampled from GÖLBAŞI LAKE, HATAY, TURKEY, Nicosia, Northern Cyprus, 496, 2007.

7. Yılmaz AB, **Dogan M.** Hatay Bölgesi'ndeki Su Kaynaklarından Alınan Balık (*Carasobarbus luteus* HECKEL, 1843) ve Su Örneklerinde Ağır Metal Düzeyleri, XIII. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, 73, Çanakkale, 2005. **(Sözlü bildiri).**