

PAPER DETAILS

TITLE: ALABALIK (GÖKKUSAGI ALABALIGI) SPERMASININ DONDURULMASI VE
DEGERLENDIRILMESI

AUTHORS: Mesut ÇEVİK, Ali DASKIN

PAGES: 23-34

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/544226>

ALABALIK (GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI) SPERMASININ DONDURULMASI VE DEĞERLENDİRİLMESİ

(Freezing And Evaluation Of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Semen)

Mesut EVİK¹

Ali DAŐKIN²

¹: Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Lalahan/ANKARA

²: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakóltesi Dölerme ve Sun'i Tohumlama A.B.D. Dışkapi/ANKARA

ÖZET

Bu araştırmada, gökkuşağı alabalığında spermatolojik parametreler ve aralarındaki korelasyonlar değerlendirilmiştir. Ayrıca, iki farklı sulandırıcıyla (Sulandırıcı I ve II) spermalar dondurularak önemli olan spermatolojik özellikler belirlenmiş ve bu sulandırıcıların spermatozoa canlılığı üzerine etkileri incelenmiştir. Spermanın dondurulmasında tesadüfi seçilmiş 24 gökkuşağı alabalığından alınan ejakülatlar kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan alabalıklardan, masaj yöntemiyle sperma alınarak spermatolojik özellikler [sperma miktarı (ml), spermatozoa motilitesi (%), spermatozoa yoğunluğu (x 10⁹ /ml), pH] tespit edilmiştir. Sperma iki farklı sulandırıcı kullanılarak, sıvı azot buharında dondurulmuştur.

Araştırmada, balıklardan alınan toplam 24 ejakülatta saptanan spermatolojik özelliklerden ejakülat miktarı 19.75±2.07 ml, spermatozoa motilitesi %89.58±1.04, spermatozoa yoğunluğu 12.71±6.37 x 10⁹ spermatozoon/ml ve sperma pH'sı 7.02±0.02 olmuştur. Sperma miktarı ile spermatozoa yoğunluğu arasında negatif yönde bir korelasyon tesbit edilmiştir (p<0.05).

Yapılan muayeneler sonucunda sulandırıcı I'de çözüm sonrası spermatozoa motilitesi ve pH sırasıyla %77.08 ve 6.85; sulandırıcı II için ise aynı değerler sırasıyla %72.50 ve 6.79 olarak saptanmıştır. İstatistiki değerlendirme sonucunda sulandırıcı I ve II arasında spermatozoa motilitesi yönünden önemli (p<0.05) bir farklılık tespit edilmiştir.

Dondurulmuş sperma ile yapılan sun'i tohumlama uygulamalarında ise yine sulandırıcı I ve II için ayrı ayrı denemeler yapılmıştır. Fertilizasyon sonuçları 15. günde ki "göz lekesi" oluşumuna göre yumurtalarda sayım yapılmak suretiyle hesaplanmıştır. Buna göre, sulandırıcı I için %56.08 ve sulandırıcı II için ise %50.05 oranlarında fertilizasyon başarıısı elde edilmiştir.

Sonuç olarak, alabalık spermasının dondurulabilirliği ortaya konulmuş ve sulandırıcı I (BSA içeriyor), diğer sulandırıcıdan çözüm sonu spermatozoa motilitesi ve fertilizasyon oranı açısından daha üstün sonuçlar vermiştir.

Anahtar Kelimeler: *Gökkuőađıalabalıđı, sperma, kryopreservasyon, fertilizasyon, sun'i tohumlama.*

SUMMARY

In this experiment, the sperm characteristics of Rainbow trout and the correlations between these parameters were assessed. Furthermore, after the semen was frozen by two different extenders (diluent I and II), considerable post-thaw sperm characteristics and the influence of extenders on sperm viability were determined. 24 ejaculates of randomly selected Rainbow trout were used in freezing process. The sperm characteristics [semen volume (ml), sperm concentration (x 10⁹ /ml), sperm motility (%) and pH] were determined in Rainbow trout semen collected by massage method. Semen of the Rainbow trout were cryopreserved in liquid nitrogen vapour using two different extenders.

In experiment, totally 24 ejaculates collecting from Rainbow trout males were treated with regard to principle spermatological characteristics. Ejaculate volume averaged 19.75±2.07 ml, sperm motility 89.58±1.04%, sperm concentration 12.71±6.37 x 10⁹ /ml and sperm pH 7.02±0.02 were established in fresh semen. Negative correlation (p<0.05) was observed between semen volume and sperm concentration.

In the results of examinations, the post-thaw sperm motility and pH in the first diluent were 77.08 % and 6.85 %, the same values in the second diluent were 72.50 % and 6.79 % respectively. Statistically significant (p<0.05) differences were observed between two extenders in term of motility.

In the applications of artificial insemination by frozen semen, respective tests were carried out for the I and II diluents. The results were evaluated by counting the "eyed egg" on the egg which occurred in 15 days after fertilization. And the percentage of fertilization results for the I and II diluent were 56.08 % and 50.05 % respectively.

The results of this experiment, suggested that Rainbow trout semen could be frozen and BSA supplemented semen is more beneficial than without BSA for the rainbow trout due to post-thaw motility and fertilization results.

Key words: *Rainbow trout, semen, cryopreservation, fertilization, artificial insemination.*

Aynı isimli doktora tezinden özetlenmiştir.
Araştırma A.Ü. Araştırma Fonu tarafından (97.30.00.09) desteklenmiştir.

GİRİŞ

Omurgalılar arasında en fazla türe sahip olan balıklarda, tür sayısının 20.000 olduğu bildirilmektedir. Memelilerin tür sayısı ise sadece 4.500'dür. Bu nedenle, balıklar günümüzde yaşayan omurgalıların yarıdan fazlasını oluşturmaktadır. Bu kadar fazla sayıda türe sahip olan balıklar morfoloji, fizyoloji ve özellikle de reproduktif faaliyetler yönünden oldukça çok çeşitlilik göstermektedirler (7).

Gökkuşuğu Alabalıklarının Ayrırcı

Özellikleri: Erginlerde boy 35-40 cm kadar olup, deride pek çok siyah, yıldız şeklinde benek vardır. Sırt boz-mavi yanlara doğru açık renkli ve janjanlıdır. Gövde boyunca uzanan kırmızimsı renk başta olmak üzere türe adını veren renkli bir bant taşır (Üreme mevsiminde bu renk belirginleşir). Karın bölgesi sarımtıraktır. Abdominal ve anal yüzgeçler açık renkli çizgilerle bezenmiştir ve lateral çizgide 120-150 adet pul bulunur. Alabalıklar doğal koşullarda Crustacea, Mollusca, akvatik sinek larvaları ve suya düşen sineklerle beslenirler (2).

Reproduksiyon: Alabalıklar genellikle mevsime bağlı olarak reproduktif etkinlik gösterirler. Üreme yılının belli bir bölümünde gerçekleşir ve genellikle sonbahar-ilkbahar ayları arasında su sıcaklığının 7-12 °C olduğu dönem en uygun olanıdır. Alabalıklar için su içerisindeki çözünmüş O₂ seviyesinin 7 mg/l'tnin altına düşmemesine dikkat edilmelidir. Tatlı sularda en az 5 mg/l't çözünmüş O₂ olmalıdır (6,18).

Balıkların %95'inden fazlasında dış döllenme söz konusudur. Dişi balık tarafından bırakılan yumurta, su içerisinde erkek balık tarafından döllenir ve belli bir süre (23-25 gün) sonra yavru çıkar. Çok az balıkta yumurta anayı terk etmeden erkek tarafından döllenir. Yumurtadan yavru çıkarak anayı terk eder. (5,6,11).

Erkeklerde Reproduksiyon:

Puberta: Erkek balıklarda reproduktif etkinliğin başlaması, yumurtadan çıktıktan sonra belli bir vücut gelişimine ulaşması, uygun sıcaklık derecesinin varlığı, ışık ve hormonal mekanizma ile doğrudan ilişkilidir. Genellikle erkekler, dişilerden daha erken

cinsel olgunluğa ulaşırlar. Bazı bireysel özellikler etkili olmakla birlikte alabalıklarda puberta yaşı 2-3 yıl arasında değişiklik göstermektedir (6,16,18).

Spermatozoon ve Sperma:

Spermatozoonlar testisin kanal boşluklarında toplanır ve uygun çevre şartları oluşuncaya kadar dinlenme durumunda kalırlar. Erkek balık üreme mevsiminde gonadotropinlerin etkisi ile sperma vermeye hazır hale gelir. Testislerde hareketsiz durumda bulunan spermatozoa in vitro koşullarda su ile temasa geçince hareket kabiliyeti kazanır. Spermatozoanın suda aktif olduğu periyot oldukça kısadır ve su sıcaklığına bağlı olup bu süre yaklaşık 30 saniye ile 2 dakika arasında değişim göstermektedir. Bu familyaya ait balıkların çoğunluğunda sperma üretimi oldukça yüksektir (5×10^{12} spermatozoa / kg vücut ağırlığı). Ancak reproduksiyon sırasında üretilen spermanın %20-40'ı kullanılabilmekte, kalan kısım ise vücut tarafından resorbe edilmektedir (26).

Spermanın Elde Edilmesi (Sağımlı):

Erkeklerden spermanın sağılması büyük çoğunlukla "dijital masaj" adı verilen, elle sağım tekniğiyle yapılmakla beraber, "hava basıncıyla" ve "vakum sistemiyle" sağım gibi farklı teknikler de kullanılmaktadır (14,26).

Sperma Rengi:

Alabalıklarda sperma, diğer birçok balık türünde olduğu gibi büyük çoğunlukla beyaz-krem renge sahiptir. Zaten bu beyaz renginden dolayı balık spermasına "balık sütü - ersuyu (milt)" denilmektedir (1,29).

Spermanın Miktarı:

Salmonidea familyasında sperma miktarı farklı cinslere göre değişim göstermektedir. Bunun yanında aynı cinsin bireyleri arasında da farklılıklar olabilmektedir. Yine reproduktif sezonun başı, ortası ve sonunda diğer bütün spermatolojik özelliklerde olduğu gibi sperma miktarında da farklılıklar gözlemlenmektedir. Gökkuşuğu alabalığında ortalama sperma miktarı 6-12 ml olarak bildirilmiştir. Ancak, bu miktar bir çok faktöre göre değişim göstermektedir. Bunların başında suyun sıcaklığı, sperma sağım aralığı, yaş, ortamda dişinin varlığı ve özellikle de bakım ve besleme şartları sperma miktarı üzerinde oldukça etkin faktörler olarak bildirilmektedir (8,14).

Gjerde (14)'ye göre, gökkuşağı alabalığında sperma miktarındaki değişim aralığı oldukça yüksek bulunmuştur. Ayrıca bu araştırmacıya göre sperma miktarıyla, vücut ağırlığı ve vücut uzunluğu arasında pozitif bir ilişki bulunmaktadır.

Erdahl ve ark. (12)'nin bildirdiklerine göre gökkuşağı alabalığına ait olan erkekler, yıl içerisinde 22 hafta süreyle sperma üretme yeteneğine sahiptirler. Yıl içerisindeki toplam sperma verimleri ortalama 129 ml olup sağım başına ortalama 12-15 ml bildirilirken, 991×10^9 spermatozoon içermektedir.

Spermanın pH'sı: Balıklarda sperma pH'sı genel olarak 5.5 ile 9.5 arasında değişim göstermektedir. Ancak alabalıklarda sperma pH'sı daha çok suyun pH'sına yakınlık arz etmektedir ve büyük çoğunlukla 7.0 ± 0.2 değerine sahiptir (29).

Spermatozoa Motilitesi: Alabalık spermatozoasının en önemli özelliği, spermatozoanın erkeğin genital kanalında motil olmamasıdır. Bunun da en önemli sebebi, seminal plazmada bulunan K^+ iyonudur. (24, 32).

Spermada motilite tayininde öncelikle spermanın normal su, distile su veya 0.12 M'lık NaCl solüsyonu ile sulandırılması gerekmektedir. Sulandırma oranı 1/10 oranına kadar yapılabilmektedir. Sulandırma işleminin den sonra motilite tayini ışık mikroskopunda, ısıtma tablası kullanılmadan ve $400\times$ büyütmede, en az üç farklı alanda bakılarak tayin edilmektedir (1,33).

Billard ve Cosson (7)'un bildirdiğine göre, spermatozoayı aktive etmek için yüksek oranda sulandırma yapmak gerekmektedir. Bu durumda spermatozoanın tamamı eş zamanlı olarak motil hale geçmektedir. Düşük oranlı sulandırmalarda, spermatozoanın sadece bir kısmı motil hale geçmekte ve kalan kısım sonradan aktive olduğundan, hatalı bir motilite değerlendirilmesi yapılması olasılığı çok yüksek olmaktadır.

Spermatozoa Yoğunluğu: Yoğunluk da diğer spermatolojik parametreler gibi ortama bağlı özelliklerin yanısıra bireysel değişimler arz etmektedir. Baynes ve Scott (4), alabalıklarda spermatozoa yoğunluğunu $9-26 \times 10^9$ spermatozoon / ml olarak bildirirlerken,

Munkittrick ve Moccia (26) yoğunluğu 10.7×10^9 spermatozoon / ml olarak bildirmiştir.

Spermanın Sulandırılması ve Dondurulması: Genellikle araştırmacının ismini alan sulandırıcılardan ilk akla gelenleri şunlardır: *Stein medyum*, *Menez Medyum*, *Mounib Medyum* vb.(4,21,25). Munkittrick ve Moccia (25)'ya göre en yaygın sulandırma oranı 1:3 olmakla birlikte, sulandırma oranı 1:1 ile 1:19 oranlarında değişim göstermektedir (30,31).

Uzun süreli saklama işleminde en önemli katkı maddeleri kryoprotektanlardır. Bunlardan en çok kullanılanları DMSO (Dimethyl Sulfoxide), DMA (Dimethyl Acetamid), Gliserol, Propilen glikol ve Etilen Glikol'dür. Bunlardan salmonid spermatozoası için en uygun olanı DMSO olup, en iyi sonucu %7-10 oranları arasında kullanıldığında vermektedir (31).

Sulandırma medyumuna kryoprotektanlardan başka *yumurta sarısı*, *BSA (Bovine Serum Albumine)*, *Albumin*, *Lecithin*, *Promine-D* ve *Promine-F* gibi katkı maddeleri katılmaktadır. (3,5,9).

Balık spermasının dondurulmasında diğer hayvan türlerinde olduğu gibi *ampul*, *pellet* ve *payet* yöntemleri kullanılmaktadır. Son 10 yıla kadar büyük oranda pellet yöntemi kullanılırken, son zamanlarda payet (sıvı azotla dondurma) yöntemine ağırlık verilmektedir (6,9,17,35).

Dişilerde Reprodüksiyon:

Puberta: Dişi alabalıklar nadiren 2 yıl olmak üzere, genellikle 3 yılda cinsel olgunluğa ulaşmaktadırlar. Bir dişinin ürettiği

yumurta sayısı 500-3000 veya 2000/kg canlı ağırlık olarak belirtilmiştir (2).

Ovum ve Yapısal Özellikleri: Alabalıklar *diemeral* tipte yumurtaya sahiptirler. Ovum, her zaman için bir örtü (*vitellin membran*), chorion ve miktarı değişebilen yumurta sarısı ile karakterize ve en önemlisi bir *Mikropil*'e sahiptir. Yumurtanın özgül ağırlığı suyunkinden fazla olduğundan yumurtalar suyun dibine batarlar. Alabalık yumurtasının çapı 3.5-5.5 mm arasında değişkenlik göstermektedir. Yumurta çapındaki bu değişiklik balığın yaşı, büyüklüğü

ve beslenme rejimine bağlı olarak şekillenmektedir. Alabalık yumurtasının geçici bir yapışkanlık özelliği olup, bu özellik su alıp şiştiklerinde ortadan kalkar (2,11,15).

Fertilizasyon: Salmonidea familyasının büyük çoğunluğunda olduğu gibi gökkuşağı alasında da “*dış döllenme*” (external fertilization) sözkonusudur. Spermatozoon, mikropili geçtikten sonra stoplazmaya penetre olmaktadır. Yumurta ve spermatozoonun direkt bağlanması her iki gamet arasında membran füzyonu ile olmaktadır. Teleost balıklarında bir akrozom olmadığından, yumurtanın plasma membranı ve fertilize olacak spermatozoonun plasma membranı arasında direkt olarak füzyon şekillenmektedir. Bu olayda her iki membranda yeralan tamamlayıcı reseptörlerin rol oynadığı bilinmektedir. Tatlı suda fertilizasyon oldukça hızlıdır. Scanning elektron mikroskopik görüntülere göre tohumlamanın 5 ya da 10. saniyesinde fertilizasyon işlemi gerçekleşmektedir (16,23).

Sun’i Tohumlama: Sun’i tohumlama, birçok evcil hayvan türünde pratik olarak uygulandığı gibi Ortaçağ’dan beri de Salmonidlerde başarıyla yapılagelmektedir. 1758’de bu teknik Jacobi tarafından kullanılmış, daha sonra Gehin ve Remi 1842’de tekrarlayan çalışmalar yapmışlardır. Sun’i tohumlamanın “*Kuru Tohumlama*” ve “*Yaş Tohumlama*” olmak üzere iki farklı metodu vardır. Kuluçka süresi (*Geçen Gün Sayısı x Kuluçka Su Sıcaklığı*) gökkuşağı alasında 7-10 °C’de 290-330 Gün Derece’dir. Bu da ortalama 30-40 günlük bir süredir (6,13,29).

Bu araştırma Türkiye şartlarında yetiştirilen alabalıklarda bazı spermatolojik özellikleri saptamak, balık spermasının dondurulabilirliğini ortaya koymak ve dondurulmuş spermanın sun’i tohumlamada kullanılmasını sağlamak amacıyla yapılmıştır.

Materyal ve Metot

Materyal: Araştırmada, Konya iline bağlı Cihanbeyli ilçesinde bulunan Özel Beyköy Alabalık İşletmesi’nden sağlanan 3 yaş ve üzerindeki 24 adet erkek gökkuşağı alabalığı ve sun’i tohumlama uygulaması için aynı özelliklere ve iyi yumurta kalitesine sahip dişi alabalıklar kullanılmıştır.

Metot: Çalışmada kullanılan alabalıkların canlı ağırlık tespiti, ± 50 gr hassasiyetli terazi yardımıyla yapılmıştır. Spermanın muayenesinde Phase-Contrast mikroskop kullanılmıştır. Spermaların sağımı abdominal masaj yöntemi ile yapılmış ve elde edilen spermanın makroskopik muayenesinde renk, kıvam ve miktar parametrelerinin muayenesi gerçekleştirilmiştir. Sperma miktarı, spermanın alınması işleminden sonra dereceli sperma toplama kadehinde toplanmış olan spermanın mililitre (ml) olarak okunması ile saptanmıştır. Daha sonra inspeksiyon yöntemiyle renk ve kıvam kontrol edilmiştir.

Spermanın mikroskopik muayenesinde nativ, sulandırma sonrası ve çözüm sonu spermatozoa motilitesi (%) ile nativ spermanın spermatozoa yoğunluğu ($\times 10^9$ /ml) saptanmıştır.

Spermatozoada motilite tayininde sperma distile su ile karıştırılıp, spermatozoonların aktivasyonu sağlandıktan sonra phase-contrast mikroskopta ısıtma tablası kullanılmadan, 400x büyütme ile en az üç farklı alanda gözlemlenip % olarak ifade edilmiştir.

Spermanın kimyasal muayenesinde sadece pH değeri saptanmıştır. pH tayini 5.5-9.0 aralığındaki “*pH İndikatör Kağıdı*” kullanılarak nativ sperma, sulandırma sonrası ve çözüm sonrası olmak üzere üç aşamada tayin edilmiştir.

Yukarıda belirtilen spermatolojik özellikler yönünden değerlendirilen sperma, iki farklı sulandırıcı (Sulandırıcı I ve II) kullanılarak 1:10 oranında sulandırılmıştır.

SULANDIRICI I

NaCl	5,92 mg/ml
KCl	1,72 mg/ml
CaCl ₂	0,68 mg/ml
MgSO ₄	0,15 mg/ml
Tris	24,20 mg/ml
Sitrik asit	pH 7,25 için
BSA	4,00 mg/ml
Yumurta sarısı	(%15)
DMSO	12 ml
Add. Bidistile su	

SULANDIRICI II

NaCl	7,5 mg/ml
NaHCO ₃	2,0 mg/ml
KCl	0,4 mg/ml
Glukoz	1,0 mg/ml
Yumurta sarısı	(%15)
DMSO	(%9)
Add. Bidistile su	

İki farklı sulandırıcı ile spermalar sulandırıldıktan ve motiliteleri belirlendikten sonra ekilibrasyon uygulanmaksızın dondurma işlemine geçilmiştir. Dondurma işlemi -120 °C'deki sıvı azot buharında 8 dakika tutulmak suretiyle gerçekleştirilmiştir. Dondurma işlemi sonrasında spermatozoa motilitesi ve pH parametrelerine bakılmıştır. Ekilibrasyon işlemi uygulanmadığı için bu aşamada herhangi bir spermatolojik özellik tayini yapılmamıştır.

Sun'i tohumlama denemeleri de her iki sulandırıcı için ayrı olarak yapılmıştır. Sun'i tohumlama uygulamaları kuru tohumlama metodu kullanılarak ve 12 bireylik iki grup oluşturularak yapılmıştır. Yaklaşık 100 yumurtaya 1 payet (0.25 ml'lik) (yaklaşık $15 \cdot 10^6$ spermatozoon içerecek şekilde) oranıyla tohumlamalar yapılmıştır. Tohumlamada kullanılan payetler 35°C'de 10 saniye süreyle çözdürüldükten hemen sonra yumurtaların üzerine boşaltılmış, karışımın üzerine *döllenme sıvısı* (3 gr Üre + 1 gr NaCl / 1 litre distile su) ilave edilmiştir. Tohumlama işlemi tamamlandıktan sonra fertilizasyon ve embriyonik dönem için önemli olan,

tohumlamadan sonraki 20. dakika, 3.gün ve 15. günlerde fertilizasyon ve embriyo gelişim oranı kontrolleri yapılmış ve 15. gün sonunda oluşan “göz lekesi” durumuna göre fertilizasyon oranları saptanmıştır.

Araştırmada elde edilen verilerin ortalama değerleri ve standart hataları hesaplanmış, spermatolojik parametreler arasındaki korelasyonların hesaplanmasında “*Korelasyon Katsayısı Analizi*” testinden faydalanılmıştır. İki grup arasındaki farkın önemlilik derecesi ise “*Student-t Testi*” kullanılarak tespit edilmiştir.

Bulgular**Spermatolojik Muayene Bulguları**

Yapılan çalışmada, 24 adet gökkuşağı-alası erkeğinden sağılan ejakulatlarda başlıca spermatolojik özelliklerden sperma miktarı 19.75 ± 2.07 ml, spermatozoa motilitesi 89.58 ± 1.04 , spermatozoa yoğunluğu $12.71 \pm 6.37 \times 10^9$ /ml, sperma pH'sı 7.02 ± 0.02 ve sperma rengi tüm ejakulatlarda beyaz-krem olarak belirlenmiştir. Taze spermada bulunan spermatolojik özelliklere ait veriler Tablo 2'de verilmiştir.

Yapılan istatistiki değerlendirme sonucunda, canlı ağırlık ile nativ spermatozoa motilitesi ve spermatozoa yoğunluğu parametreleri arasında negatif yönde önemli bir ilişkinin olduğu saptanmıştır ($P < 0.05$).

Ancak diğer spermatolojik parametreler arasında önemli bir fark gözlemlenmemiştir ($P > 0.05$) (Tablo 1).

Tablo1. Bazı Spermatolojik Parametreler ile Canlı Ağırlık Arasındaki Korelasyonlar

	Miktar	Yoğunluk	pH	Canlı Ağırlık	Nativ_Motilite
Miktar	+1.000				
Yoğunluk	+0.258	+1.000			
PH	- 0.183	+0.130	+1.000		
Canlı Ağırlık	- 0.128	- 0.486*	+0.203	+1.000	
Nativ Motilite	- 0.400	+0.292	- 0.427	- 0.581*	+1.000

* : $p < 0.05$

Sulandırma Sonrası Elde Edilen Bulgular

Yapılan istatistiki değerlendirmeye göre sulandırma sonrası I. Sulandırıcı için % 83.96 ± 1.53 ve II. Sulandırıcı için % 79.79 ± 1.63 oranında motilite elde edilmiştir (Tablo 3). pH ise I. Sulandırıcı için 6.87 ± 0.04 ve II. Sulandırıcı için ise 6.81 ± 0.05 olarak tespit edilmiştir. Sulandırıcı I ve II arasında sulandırma sonrası motilitedeki farklılık önemli ($p < 0.05$) bulunmuştur (Tablo 4). Bunun yanında, nativ sperma pH'sı ile sulandırma sonrası sulandırıcı I ve II arasındaki pH değerleri karşılaştırıldığında, nativ ile sulandırıcı I arasında ($P < 0.01$) ve nativ sperma ile sulandırıcı II arasında ($P < 0.001$) önemli farklılık tespit edilmiştir.

Çözüm Sonrası Elde Edilen Bulgular

Sulandırıcı I ve II'ye ait çözüm sonrası elde edilen spermatolojik bulgular Tablo 3'de verilmiştir. Buna göre, çözüm sonrası ortalama spermatozoa motilitesi sulandırıcı I için % 77.08 ± 1.44 ve sulandırıcı II için ise % 72.50 ± 1.44 olarak tespit edilmiştir.

İstatistiksel değerlendirmede, sulandırıcı I ve II için çözüm sonrası elde edilen bulgular arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p < 0.01$).

Dondurulmuş Sperma ile Yapılan Sun'i Tohumlama Uygulamalarına Ait Bulgular

Çalışmanın bu bölümünde sulandırıcı I ve sulandırıcı II ile sulandırılıp dondurulmuş spermalar ile ayrı ayrı 12'şer adet sun'i tohumlama uygulaması yapılarak fertilizasyon oranları saptanmıştır. Kuru tohumlama metodunun kullanıldığı işlemde tohumlama dozu olarak 100 adet yumurtaya 1 payet (0.25×10^6), ortalama $150-200 \times 10^6$ spp/100 yumurta oranı tercih edilmiştir. Değerlendirmeler tohumlamadan sonraki 20.dakika, 3. gün ve 15. günlerde yapılmıştır. Buna göre sulandırıcı I için 20.dakika, 3. gün ve 15. gün fertilizasyon oranları sırasıyla % 93.88 ± 0.64 , % 75.67 ± 0.97 , % 56.08 ± 1.46 olarak tespit edilmiştir. Sulandırıcı II için ise aynı değerler sırasıyla % 91.25 ± 0.76 , % 73.34 ± 0.94 , % 50.05 ± 1.74 düzeyinde bulunmuştur. Sulandırıcı I ve sulandırıcı II'nin tohumlama

sonrası 20.dakika, 3. gün ve 15. günlerdeki fertilizasyon oranı karşılaştırmalarında 20. dakikada gruplar arasındaki fark önemli ($p < 0.01$) bulunurken, 3. günde karşılaştırmada gruplar arası fark önemsiz ($p > 0.05$) bulunmuştur. 15. günde göz lekesi oluşumu kriterine göre yapılan değerlendirmede ise gruplar arasında önemli ($p < 0.01$) bir farklılık bulunmuştur (Tablo 5). Yapılan istatistiki değerlendirme sonuçlarına göre Sulandırıcı I, diğer sulandırıcıya göre fertilizasyon oranı açısından daha iyi sonuç vermiştir. Sulandırıcı I in içerisinde katkı maddesi olarak bulunan BSA'nın (4mg/ml) pozitif yönde önemli bir etkisinin olduğu saptanmıştır.

Tablo 2. Gökkuşaağalabalığında Spermatolojik Muayene Bulguları

Ejakulat no	Canlı Ağırlık (g)	Miktar (ml)	Yoğunluk (x10 ⁹ /ml)	pH	Sulandırma Sonrası pH		Çözüm Sonrası pH		Nativ Motilite (%)	Sulandırma Sonrası Motilite (%)	
					I	II	I	II		I	II
1	1100	28	10.600	7.0	6.5	6.5	6.5	6.5	90	85	
2	2300	20	9.575	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	95	90	
3	3100	11	10.575	7.0	7.0	7.0	6.5	6.5	80	60	
4	2750	19	10.675	7.0	7.0	6.5	7.0	6.5	90	90	
5	1950	21	8.950	7.0	6.5	7.0	6.5	7.0	85	80	
6	2000	24	8.800	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	90	85	
7	2500	30	10.500	7.5	7.0	7.0	7.0	7.0	90	85	
8	2450	15	10.650	7.0	6.5	6.5	6.5	6.5	75	70	
9	1500	10	9.325	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	95	75	
10	2000	18	11.050	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	90	85	
11	1100	28	10.500	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	90	80	
12	1250	15	13.575	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	85	85	
13	1250	19	10.850	7.0	6.5	6.5	6.5	6.5	90	80	
14	850	8	14.050	7.0	7.0	6.5	7.0	6.5	95	95	
15	750	18	16.750	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	95	90	
16	1100	52	18.975	7.0	7.0	6.5	7.0	6.5	90	90	
17	1750	13	16.225	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	90	85	
18	1400	14	18.050	7.0	7.0	6.5	7.0	6.5	95	85	
19	1300	28	14.375	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	90	90	
20	1950	26	11.200	7.0	6.5	7.0	6.5	7.0	95	85	
21	1850	8	12.675	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	95	90	
22	700	6	15.525	7.0	6.5	6.5	6.5	6.5	85	80	
23	2000	12	17.900	7.0	7.0	6.5	7.0	6.5	90	90	
24	1950	31	13.875	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	85	85	
Genel Ortalama	1702	19.75	12.71	7.02	6.87	6.81	6.85	6.79	89.58	83.96	7

Tablo 3. Sulandırıcılar Arası Sulandırma ve Çözüm Sonrası Spermatozoa Motilite Oranları (%)

Sulandırıcı Grupları	n	Minimum	Maksimum	$\bar{X} \pm Sx$
I Sulandırma sonu	24	60	95	83.96±1.53
Çözüm Sonu	24	60	85	77.08±1.44
II Sulandırma sonu	24	60	95	79.79±1.63
Çözüm . Sonu	24	60	85	72.50±1.44

Tablo.4. Sulandırma Sonrası Sulandırıcı I ve II'ye ait Spermatozoa Motilitesi İstatistik Sonuçları

Grup	n	I ($\bar{X} \pm Sx$)	II ($\bar{X} \pm Sx$)	t	Önemlilik Derecesi
Sulandırma Sonrası Motilite	24	83.96±1.53	79.79±1.63	1.859	*
Çözüm Sonrası Motilite	24	77.08±1.44	72.50±1.44	2.247	**

* : P<0.05

** : P<0.01

Tablo 5. Sulandırıcı I ve II'nin Fertilizasyon Oranı Yönünden İstatistiki Olarak Karşılaştırılması

Değerlendirmeye Alınan Paremetreler	Sulandırıcı I		Sulandırıcı II		t	Önemlilik Derecesi
	n	$\bar{X} \pm Sx$	n	$\bar{X} \pm Sx$		
Yumurta sayısı	12	419.58±5.70	12	402.16±5.70	1.434	-
Payet sayısı	12	4.25±0.13	12	4.00±0.00	1.915	*
Spermatozoa motilitesi (%)	12	75±2.38	12	71±1.39	1.358	-
20.dak. ölü yumurta sayısı	12	25.83±2.84	12	35.25±3.31	-2.153	*
3.gün ölü yumurta sayısı	12	102.25±5.13	12	107.41±4.72	-0.740	-
15.gün ölü yumurta sayısı	12	184.25±7.53	12	201.08±8.18	-1.513	-
20.dak. fertilizasyon oranı	12	93.88±0.64	12	91.25±0.76	2.624	**
3.gün embriyo gelişim oranı	12	75.67±0.97	12	73.34±0.94	1.714	-
15.gün embriyo gelişim oranı	12	56.08±1.46	12	50.05±1.74	2.646	**

- : P>0.05

* : P<0.05

** : P<0.01

Tartışma ve Sonuç

Elde edilen sperma miktarı (19.75±2.07 ml), bazı araştırmacıların (8,14) bulguları ile benzerlik gösterirken, kimi araştırmacıların (20,25,26,28) bulguları ile farklılık göstermiştir. Oluşan bu farklılıkların özellikle besleme şartları, işletme suyunun O₂ içeriği ve diğer çevre şartlarına bağlı olarak şekillendiği düşünülmektedir.

Sperma miktarının yüksek olmasının sebebi, daha çok yukarıda belirtilen kriterlere ve aynı zamanda bir önceki sağımlarının uzun olmasına bağlıdır. Benzer bir çalışmada, Büyükhatoğlu ve Holtz (8), sperma miktarını

üreme sezonu başı, ortası ve sonunda aldıkları spermaları sırasıyla 24.6 ml, 13.4 ml, 8.9 ml olarak tespit etmişlerdir. Munkittrick ve Moccia (26) ise Şubat, Mart ve Nisan aylarında sperma miktarlarını sırasıyla 7.2±1.1 ml, 7.0±1.0 ml ve 4.7±1.0 ml olarak tespit etmişlerdir. Yukarıda görüldüğü gibi sezon sonuna doğru sperma verimi belirgin ölçüde azalma göstermektedir. Yapılan çalışmada bireyin vücut ağırlığı ve vücut uzunluğu ile sperma verimi arasında pozitif bir ilişkinin varolduğu da saptanmıştır. Spermanın renk ve kıvamı hakkında elde edilen bulgular, araştırmacıların (1, 29) bildirdikleri verilerle uyum göstermektedir.

Sağılan spermalarda ortalama nativ spermatozoa motilitesi (89.58 ± 1.04), varolan literatür bulguları ile benzerlik göstermiştir.

Schmidt-Baulain ve Holtz (28), sağımdan sonraki 0.33, 60 ve 360. dakikalarda spermatozoa motilitesini, sırasıyla %82; %75 ve %36 olarak bildirmişlerdir. Levanduski ve Cloud (22) spermatozoa motilitesini 0.12 M NaCl ile yaptıkları sulandırmada %94.3 vermektedir. Görüldüğü üzere elde edilen verilerle bahsedilen araştırmacıların verileri arasında önemli bir fark yoktur. Varolan fark ise kullanılan sulandırma medyumuna veya çalışmanın yapıldığı döneme bağımlı değişim göstermektedir.

Araştırmada saptanan spermatozoa yoğunluğu ($12.71 \pm 6.37 \times 10^9$ spermatozoon/ml), diğer araştırmacıların büyük çoğunluğunun (5,8,10) saptama yöntemleri ve bulguları ile benzerlik gösterirken, Munkittrick ve Moccia (26)'nın bulguları ($3-10 \times 10^9$ spermatozoon/ml) ile farklılık göstermiştir. Sulandırma oranının düşük tutulması yoğunluğun yüksek olması sebebiyle sayımı zorlaştırmakta ve yanılma payını da artırmaktadır. Bu parametre açısından çalışmaya en çok benzerlik gösteren Büyükhatipoğlu ve Holtz (8)'un bulgusudur ($7.7-16.8 \times 10^9$ spermatozoon/ml).

Çalışmada sperma pH'sının ölçümünde kimi araştırmacıların (7,26) yaptığı gibi 5.5-9.0 aralıklı pH indikatör kağıtları kullanılmıştır. Elde edilen bulgu (7.02 ± 0.02), yukarıdaki araştırmacıların bulgularına büyük oranda benzerlik göstermiştir. Munkittrick ve Moccia (26), spermada yaptıkları pH ölçümünde 7.01 ± 0.16 olarak saptamışlardır. Sulandırma ve çözüm sonrası pH ölçümlerinde bir azalma kaydedilmiştir ki, bunun sebebi sulandırıcı içerisine katılan DMSO'nun suyu dış ortama çekmesi sonucu ortam yoğunluğunun artması ve hücre içindeki *Laktik asit* üretiminin artmasına bağlı olarak pH'da düşüşün olmasıdır.

Sulandırma sonrası elde edilen bulgulardan sulandırıcı I ve II'ye ait motilite değerleri sırasıyla 83.96 ± 1.53 ve 79.79 ± 1.63 bulunmuştur. Ayrıca pH değerleri sulandırıcı I ve II için sırasıyla 6.87 ± 0.02 ve 6.81 ± 0.02 olarak tespit edilmiştir. Bu değerler, bazı araştırmacıların (3,22) bulguları ile

çok benzerlik göstermektedir. Levanduski ve Cloud (22), gökkuşağı alabalığı sperması üzerine yaptıkları çalışmada, Cortland Medyum ile sulandırma sonrası ortalama spermatozoa motilitesini 75.0 ± 19.6 olarak saptamışlardır. Bu araştırmacılarla bulgu yönünden benzerlik vardır. Ancak kullanılan sulandırma medyumuna farklıdır. Oluşan farkın buna bağlı şekillendiği düşünülmektedir.

Spermanın dondurulması ve çözümü sonucu elde edilen motilite ve pH bulguları ise yine Sulandırıcı I ve II için sırasıyla 77.08 ± 1.44 ; 72.50 ± 1.44 ; 6.85 ± 0.04 ve 6.79 ± 0.05 olarak bulunmuştur. Sulandırıcı I'deki gözle görülür motilite artışının, içerdiği 4 mg/ml oranındaki BSA'ya bağlı olarak oluştuğu düşünülmektedir.

Çalışmanın spermanın sulandırılması ve dondurulması bölümünde elde edilen bulgular kullanılan yöntemler ve bulgular açısından bazı araştırmacılarla (3,12,21,22,25,28) birebir benzerlik göstermektedir. Buna karşılık kimi araştırmalarda (17,31,34) farklı sulandırıcıların (Mounib, Menezo, "Glukoz + DMSO + Yumurta Sarısı"), kryoprotektanların ve dondurma yöntemlerinin kullanılmasına bağlı olarak elde edilen bulgular açısından farklılıklar oluşmuştur.

Çalışmanın amaçlarından olan spermanın dondurulmasında uygun kryoprotektanın tespitinde ise en uygunu olarak düşünülen DMSO (%9) kullanılmış ve literatür verileriyle doğru orantılı sonuçlar alınmıştır. Wheeler ve Thorgaard (34), büyük payetlerde (4.5 ml'lik) gökkuşağı alabalığı spermasını dondururken, farklı çözme sıcaklığı ve sürelerinde çalışmadan % 49.3 oranında fertilizasyon sonucu almışlardır.

Stoss ve Holtz (31), pellet yöntemiyle dondurdıkları gökkuşağı alabalığı spermasında katkı maddesi olarak kullandıkları BSA (4mg/ml) ve Promine-D'nin (7.5mg/ml) etkisiyle %77.5 oranında fertilizasyon oranı elde etmişlerdir. Araştırmacılar aynı şartlarda, 20.dakika fertilizasyon oranını %81 olarak bildirmişlerdir. Benzer şekilde bu çalışmada, Sulandırıcı I'de bulunan BSA'nın hem spermatozoa motilitesini ve hem de fertilizasyon oranını arttırdığı saptanmıştır.

Yine aynı çalışmada araştırmacılar (31), 1 dakika, 60 dakika ve 60 dakikanın üzerinde uygulanan ekilibasyon sürelerinde fertilizasyon oranlarını sırasıyla %73.7; %50.0 ve %49.2 olarak bildirmişlerdir. Ayrıca DMSO oranının da %10-12 oranında hem spermatozoa ve hemde fertilizasyon için en uygun doz olduğunu belirtmişlerdir.

Sun'i tohumlama denemelerinde, kullanılan teknik ve yöntem açısından büyük oranda benzerlik gösteren bir çalışmada Baynes ve Scott (3) ise gökkuşağı alabalığı spermasının dondurulması ve çözüm sonu fertilite üzerine sperma kalitesi, yumurta kalitesi ve sulandırıcı kompozisyonunun etkisini inceledikleri çalışmalarında fertilizasyon dozu olarak $150-164 \times 10^6$ spermatozoon/yumurta kullanmışlar Bu işlemten 15 gün sonra oluşan embriyoların sayımları yapılmış ve 67.3 ± 0.3 oranında başarı elde etmişlerdir.

Bulgu yönünden farklılık arzeden bir çalışmada ise Munkittrick ve Moccia (25), DMSO kullanarak dondurdukları gökkuşağı alabalığı sperması ile yaptıkları sun'i tohumlama çalışmasında, pelet yöntemiyle dondurulmuş spermadan 80 ± 6.0 , payet yöntemiyle dondurulmuş spermadan ise %80 fertilizasyon sonucu alınmıştır.

Başka bir çalışmada Scheerer (27), *teophylline* ile muamele edilerek dondurulmuş gökkuşağı alabalığı spermasında, fertilizasyondaki başarıyı araştırdığı çalışmasında spermayı %9 DMSO ve %10 yumurta sarısı içeren Cortland Medyumu ile sulandırıp payet yöntemiyle dondurmuş ve çözüm işlemini 10^0C 'de 30 saniye olarak uygulamıştır. Değerlendirmeyi 14-15. günlerde oluşan göz lekesi ve 28. günde yumurtadan çıkışa göre yapmıştır. Sonuç olarak 35.4 ± 5.3 yavru elde etmiştir. Teknik açıdan çok benzer olan bu çalışma sonuçlar (%56.08 ve %50.05) açısından fazla benzerlik göstermemektedir. Bunun sebebi olarak da kullanılan sulandırıcı, yumurta sarısı oranının farklılığı veya çözme prosedüründeki farklılık gösterilebilir.

Yapılan çalışmada tohumlama sonrası yumurtaların inkübasyon ısısı olarak $10-12^0\text{C}$ kullanılmıştır. Elde edilen bulgu bu konuda literatür bilgisi olarak faydalanan Labbe ve Maisse (19)'nin verileri ile doğrudan benzerlik göstermektedir. Araştırmacılar dondurulmuş

sperma ile yapılan sun'i tohumlamalarda 8^0C , 13^0C ve 18^0C 'de oluşan fertilizasyon oranlarını karşılaştırmışlar ve buna göre sırasıyla oranları % 20 - 30; % 60 - 80 ve % 30 - 35 olarak saptamışlardır.

Literatür bulguları ile yapılan araştırmada saptanan bulgular arasında gözlemlenen farklılıklar kullanılan materyalin tesadüfi seçilmiş olmasından, çevre şartlarından ve besleme rejiminden kaynaklanabileceği gibi, kullanılan sperma sulandırıcıları ile sulandırıcıların içerdiği komponentlerin miktar ve oranlarının farklı olmasından kaynaklanmış olabilir. Sulandırıcı I (BSA'lı) ile elde edilen motilite ve fertilite oranları daha yüksek elde edilmiştir. Ancak bu yüksek sonucun, sulandırıcı içerisindeki Tris veya BSA ya da her ikisinden mi kaynaklandığı bilinmemektedir. Bu farklılığın sulandırıcının hangi unsurundan oluştuğunu belirlemek için daha ileri çalışmaların yapılması yerinde olacaktır. Bunların yanısıra spermanın sulandırılmasında ve dondurulmasında kullanılan yöntemlerin de bu farklılıkların ortaya çıkmasında etken olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışma, bu yöndeki çalışmalara bir zemin oluşturması açısından önem taşımaktadır. İlerleyen zaman içerisinde bu çalışma alabalık spermasının dondurulması için uygun sulandırıcının ve kryoprotektanın seçilmesi, dondurulmuş spermanın sun'i tohumlamada kullanılması çalışmalarına ışık tutacaktır. Bu ve benzeri çalışmaların tekrarlanması sonucu, özellikle bu alanda başvuru alan yurtdışından dömlü yumurta ithali ortadan kalkacak ve bu olay hem ülke ekonomisi ve hem de yetiştirici açısından önemli kazanç sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Aas GH, Refstie T, Gjerde B (1991) *Evaluation of milt quality of Atlantic salmon*. Aquaculture , 95:125-132.
2. Atay D (1987) *İç su balıkları üretme tekniği*. A.Ü. Ziraat Fakültesi, Su Ürünleri Bölümü Yayın No: 1035, A.Ü. Zir. Fak. Basımevi, Ankara.
3. Baynes SM, Scott AP (1987) *Cryopreservation of Rainbow trout spermatozoa: the influence of sperm quality, egg quality and extender composition on post-thaw fertility*. Aquaculture , 66: 53-67.

4. **Baynes SM, Scott AP** (1985) *Seasonal variations in parameters of milt production and in plasma concentration of sex steroids of male Rainbow trout (Salmo gairdneri)*. Gen. Comp. Endocrinol. 57 (1): 150-160.
5. **Billard R** (1988) *Artificial insemination and gamete management*. Marine Behavioral Physiology, 14: 1-21.
6. **Billard R** (1992) *Reproduction in Rainbow trout: sex differentiation, dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes*. Aquaculture , 100: 263-298.
7. **Billard R, Cosson MR** (1992) *Some problems related to the assesment of sperm motility in freshwater fish*. The Journal of Experimental Zoology , 261: 122-131.
8. **Büyükhatoğlu Ş, Holtz W** (1984) *Sperm output in Rainbow trout (Salmo gairdneri) effect of age, timing and frequency of stripping and presence of females*. Aquaculture , 37: 63-71.
9. **Cabrera E, Alvarez R, Anel L, Rana KJ, Herraiz MP** (1998) *Sublethal damage during cryopreservation of Rainbow trout sperm*. Cryobiology , 37 (3): 245-253.
10. **Ciereszko A, Dabrowski K** (1993) *Estimation of sperm concentration of Rainbow trout , Whitefish and Yellow perch using a spectrophotometric technique*. Aquaculture , 109: 367-373.
11. **Craik JCA, Harvey SM** (1984) *Egg quality in Rainbow trout: the relation between egg viability, selected aspects of egg composition and time of stripping*. Aquaculture, 40:115-134.
12. **Erdahl AW, Erdahl DA, Graham EF** (1984) *Some factors affecting the preservation of Salmonid spermatozoa*. Aquaculture , 43: 341-350.
13. **Erdahl AW, Cloud JG, Graham EF** (1987) *Fertility of Rainbow trout (Salmo gairdneri) gametes: gamete viability in artificial media*. Aquaculture, 60: 323-332.
14. **Gjerde B** (1984) *Variation in semen production of farmed Atlantic salmon and Rainbow trout*. Aquaculture , 40: 109-114.
15. **Goetz FW, Coffman MA** (2000) *Storage of unfertilized eggs of Rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) in artificial media*. Aquaculture, 184: 267-276.
16. **Hart NH** (1990) *Fertilization in Teleost fishes: mechanisms of sperm-egg interactions*. International Review of Cytology, 121: 1-61.
17. **Holtz W** (1993) *Cryopreservation of Rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) sperm: practical recommendations*. Aquaculture, 110: 97-100.
18. **Kara S** (1982) *Alabalıkların biyolojisi, üretimi ve beslenmeleri üzerinde inceleme ve araştırmalar*. E.İ.T.İ.A. Sağlık Bilimleri Fakültesi, Eczacılık Bölümü, Eskişehir.
19. **Labbe C, Maisse G** (1996) *Influence of rainbow trout thermal acclimation on sperm viability on sperm cryopreservation: relation to change in the lipid composition of the plasma membrane*. Aquaculture , 145 (1-4): 281-294.
20. **Lahnsteiner F, Patzner RA, Weismann T** (1993) *Energy resources of spermatozoa of the Rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Pisces, Teleostei)*. Reprod. Nutr. Dev., 33: 349-360.
21. **Legendre M, Billard R** (1980) *Cryopreservation of Rainbow trout sperm by deep-freezing*. Reprod. Nutr. Dev. , 20 (6): 1859-1868.
22. **Levanduski MJ, Cloud JG** (1988) *Rainbow trout (Salmo gairdneri) semen : effect of non-motile sperm on fertility*. Aquaculture , 75: 171-179.
23. **Moccia RD, Munkittrick KR** (1987) *Relationship between the fertilization of Rainbow trout (Salmo gairdneri) eggs and the motility of spermatozoa*. Theriogenology, 27(4): 679-688.
24. **Morisawa M, Suzuki K, Morisawa S** (1983) *Effects of potassium and osmolality on spermatozoon motility of Salmonid fishes*. The Journal of Experimental Biology , 107: 105-113.
25. **Munkittrick KR, Moccia RD** (1984) *Advances in the cryopreservation of Salmonid semen and suitability for a production-scale artificial fertilization program*. Theriogenology , 21(4): 645-654.
26. **Munkittrick KR, Moccia RD** (1987) *Seasonal changes in the quality of Rainbow trout (Salmo gairdneri) semen: effect of a delay in stripping on spermatozoa, motility, volume and seminal plasma constituents*. Aquaculture , 64: 147-156.
27. **Scheerer PD** (1989) *Improved fertilization by cryopreserved Rainbow trout semen treated with Theophylline*. The Progressive Fish-Culturist, 51: 179-182.

28. **Schmidt-Baulain R, Holtz W** (1989) *Deep-freezing of Rainbow trout (Salmo gairdneri) sperm at varying intervals after collection.* Theriogenology , 32 (3): 439-443.
29. **Seçer S** (1998) *Su ürünleri ve balık yetiştiriciliği.* Ankara Bölgesi Veteriner Hekimler Odası Üretim Dergisi, 5/6 : 26-42.
30. **Steyn G, Van Vuren JHJ, Grobler E** (1989) *A new sperm diluent for the artificial insemination of Rainbow trout (Salmo gairdneri).* Aquaculture , 83: 367-374.
31. **Stoss J, Holtz W** (1983) *Cryopreservation of Rainbow trout (Salmo gairdneri) sperm. IV. The effect of DMSO concentration and equilibration time on sperm survival, sucrose and KCl as extender components and the osmolality of the thawing solution.* Aquaculture , 32: 321-330.
32. **Tanimoto S, Morisawa M** (1988) *Roles for potassium and calcium channels in the initiation of sperm motility in Rainbow trout.* Develop. Growth & Differ. , 30 (2): 117-128.
33. **Turner C** (1986) *Evaluation of Salmonid sperm motility for cryopreservation.* The Progressive Fish-Culturist , 48: 230 - 232.
34. **Wheeler PA, Thorgaard GH** (1991) *Cryopreservation of Rainbow trout semen in large straws.* Aquaculture , 93: 95-100.
35. **Yao Z, Crim LW, Richardson GF, Emerson CJ** (2000) *Motility, fertility and ultrastructural changes of Ocean pout (Macrozoarces americanus L.) sperm after cryopreservation.* Aquaculture, 181: 361-375.