



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA
ANA BİLİM DALI



MELATONİN İLAVE EDİLMİŞ SULARDIRICILARLA
DONDURULAN ARI (APİS MELLİFERA) SPERMASININ
İN VİTRO OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

MUSTAFA AKKAŞOĞLU

(DOKTORA TEZİ)

BURSA-2024





T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA
ANA BİLİM DALI



**MELATONİN İLAVE EDİLMİŞ SULANDIRICILARLA
DONDURULAN ARI (APİS MELLİFERA) SPERMASININ
İN VİTRO OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

MUSTAFA AKKAŞOĞLU

(DOKTORA TEZİ)

DANIŞMAN:

Prof. Dr. Selim ALÇAY

Proje No: TDK-2021-700

BURSA-2024

**T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum “**Melatonin İlave Edilmiş Sulandırıcılarla Dondurulan Arı (Apis Mellifera) Spermasının İn Vitro Olarak Değerlendirilmesi**” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Mustafa AKKAŞOĞLU
Tarih ve İmza

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

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

Adı Soyadı: Mustafa AKKAŞOĞLU

Ana Bilim Dalı: Dölerme ve Suni Tohumlama

Tez Konusu: Melatonin İlave Edilmiş Sulandırıcılarla Dondurulan Arı (Apis Mellifera) Spermasının İn Vitro Olarak Değerlendirilmesi

<u>ÖZELLİKLER</u>	<u>UYGUNDUR</u>	<u>UYGUN</u> <u>DEĞİLDİR</u>	<u>ACIKLAMA</u>
Tezin Boyutları	☒	☐	
Dış Kapak Sayfası	☒	☐	
İç Kapak Sayfası	☒	☐	
Kabul Onay Sayfası	☒	☐	
Sayfa Düzeni	☒	☐	
İçindekiler Sayfası	☒	☐	
Yazı Karakteri	☒	☐	
Satır Aralıkları	☒	☐	
Başlıklar	☒	☐	
Sayfa Numaraları	☒	☐	
Eklerin Yerleştirilmesi	☒	☐	
Tabloların Yerleştirilmesi	☒	☐	
Kaynaklar	☒	☐	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. Selim ALÇAY

İmza:

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYANI	II
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU	III
İÇİNDEKİLER	IV
TÜRKÇE ÖZET	IVI
İNGİLİZCE ÖZET	VII
TEZ KONUSUNUN KÜRESEL SÜRDÜRÜLEBİLİR KALKINMA HEDEFLERİ İLE LİŞKİSİ.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Erkek Arıların Kolonilerdeki Yaşamı ve Rolü.....	5
2.2. Erkek Arı Genital Organları.....	5
2.3. Erkek Arılarda Spermatogenezis.....	6
2.4. Erkek Arılarda Spermanın Özellikleri	6
2.5. Çevresel Faktörlerin Arı Sperm Kalitesine Etkisi.....	6
2.5.1. Besinler	6
2.5.2. Sıcaklık.....	7
2.5.3. Pestisidler	8
2.6. Kovan İçi Faktörlerin Arı Sperm Kalitesine Etkisi.....	8
2.6.1. Yaş	8
2.6.2. Vücut ağırlığı ve ölçüsü	9
2.6.3. Protein Bezleri.....	10
2.7. Erkek Arılardan Spermanın Elde Edilmesi	10
2.8. Spermanın Kriyopreservasyonu	11
2.9. Sperma Üzerine Soğuk Şokunun Etkileri	12
2.10. Melatonin	14
2.11. Erkek Arılarda Spermanın Muayenesi	16
2.11.1. Semen Hacmi	16
2.11.2 Spermatozoon Yoğunluğu.....	17
2.11.3 Motilite.....	18
2.11.4. Morfolojik Muayene	18
2.11.4.1. Plazma Membran Bütünlüğü	19
2.11.4.2. Akrozom Bütünlüğü.....	20
2.11.4.3. Sperm Mitokondriyal Fonksiyon (Mitokondriyal Membran Potansiyeli) ..	20
2.11.4.4. DNA Analizi	21

2.11.4.5. Stresin Etkisi	21
2.11.4.5.1 Oksidatif stress	21
2.11.4.5.2 Uyarılan Strese Tepki.....	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
3.1. Erkek Arıların Üretimi	23
3.2. Spermanın Alınması ve Muayenesi	23
3.3. Motilite Muayenesi	27
3.4. Plazma Membran Fonksiyonel Bütünlük Testi (HOST).....	27
3.5. FITC-Pisum Sativum Agglutinin (FITC-PSA) ile Akrozomal Yapının Ortaya Konması	28
3.6. Malondialdehyde (MDA) Konsantrasyonu Tespiti.....	30
3.7. Spermanın Sulandırılarak Dondurulması	30
3.8. Donmuş Spermanın Muayenesi	31
3.9. İstatistiksel Analiz.....	31
4. BULGULAR.....	33
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	35
6. KAYNAKLAR	40
7. SİMGELER VE KISALTMALAR	57
8. TEŞEKKÜR	58
9. ÖZGEÇMİŞ.....	59

TÜRKÇE ÖZET

Ülkemiz bal üretimi istatistikleri üzerinden, dünyada ikinci sırada bulunmaktadır, ancak koloni başına bal verimi açısından diğer ülkelerin gerisinde kalmaktadır. Arı ırklarının dayanıklılığı bu konuda önemlidir. Gezginci arıcılık dayanıklı ırkların kaybına neden olmaktadır ve kontrolsüz çiftleşme sonucu ırkların saflığı bozulmaktadır. Bu nedenle, kaliteli ve üstün genetiğe sahip arılardan sperma alınmalı ekonomik ve sürdürülebilir arıcılık için saklanmalıdır.

Arı spermaları üzerinde dondurma ve çözündürme işlemleri fiziksel, fonksiyonel ve biyokimyasal özelliklerine olumsuz etkileri olmaktadır. Dondurma işlemleri sırasında ortaya çıkan lipid peroksidasyon spermanın motilite ve fertilizasyon yeteneğini düşürmektedir.

Yapılan çalışmada melatonin ilavesinin arı spermasının dondurulması üzerindeki etkilerini değerlendirmesi amaçlandı. Melatonin ilavesinin antioksidan özellikleri nedeniyle sperm membranlarını koruma potansiyeli olduğu ve dondurma-çözündürme işlemleri sonrasında spermatolojik parametrelerde olumlu etkiler sağlayabileceğini gördük.

Çalışmamızda pooling yapılan taze arı sperma örneklerinin dondurulması işlemi sonrasında sperm kalitesindeki değişiklikleri ve melatonin ilavesinin bu değişikliklere olan etkileri incelendi. Yeni alınmış sperma örneklerinde motilite, plazma membranı fonksiyonel bütünlüğü, akrozom bütünlüğü ve DNA sağlamlık oranları belirlendi. Dondurma işleminin, özellikle motilite, plazma membran ve akrozomal bütünlük üzerinde olumsuz etkiler olduğu tespit edildi ($P<0,05$).

Çalışmada, sulandırıcılara melatonin ilavesinin eritme sonrası spermatolojik parametrelerde olumlu etkilere neden olduğu görüldü. Özellikle Mel0,5 ve Mel1 gruplarında kontrol ve diğer gruplara göre daha yüksek motilite değerleri elde edildi ($P<0,05$), en yüksek motilite Mel0,5 grubunda bulundu. Melatonin ilavesinin plazma membran ve akrozomal bütünlük üzerinde de koruyucu etkileri belirlendi ($P<0,05$).

Sonuçlar, melatoninin arı spermasının dondurma-çözündürme işlemleri sonrasında sperm kalitesini artırıcı potansiyele sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Bu bulgular, arı üretiminde kriyoprezervasyon tekniklerinin geliştirilmesi ve genetik materyalin korunması için melatoninin kullanımının potansiyel bir strateji olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Arı Sperması, Melatonin, Kriyoprotektan, Antioksidan, Oksidatif Stres, Sulandırıcı

İNGİLİZCE ÖZET

IN VITRO EVALUATION OF HONEY BEE (APIS MELLIFERA) SPERMATOZOA CRYOPRESERVED WITH MELATONIN SUPPLEMENTED EXTENDERS

Our country ranks second in the world in terms of honey production statistics, but lags behind other countries in terms of honey yield per colony. The durability of bee races is important in this regard. Itinerant beekeeping causes the loss of resistant races and the purity of the races deteriorates as a result of uncontrolled mating. Therefore, semen from bees with high quality and superior genetics should be obtained and stored for economic and sustainable beekeeping.

Freezing and thawing processes have negative effects on the physical, functional and biochemical properties of bee semen. Lipid peroxidation that occurs during freezing processes decreases the motility and fertilization ability of semen.

In this study, it was aimed to evaluate the effects of melatonin addition on the freezing of bee semen. We found that melatonin addition has the potential to protect sperm membranes due to its antioxidant properties and may provide positive effects on spermatological parameters after freezing-thawing processes.

In our study, the changes in sperm quality of fresh bee semen samples after freezing and the effects of melatonin addition on these changes were investigated. Motility, plasma membrane functional integrity, acrosome integrity and DNA integrity were determined in freshly collected semen samples. It was determined that freezing had negative effects especially on motility, plasma membrane and acrosomal integrity ($P<0.05$).

In the study, it was observed that the addition of melatonin to the reconstituents caused positive effects on spermatological parameters after thawing. Especially higher motility values were obtained in Mel0.5 and Mel1 groups compared to control and other groups ($P<0.05$), the highest motility was found in Mel0,5 group. Protective effects of melatonin supplementation on plasma membrane and acrosomal integrity were also determined ($P<0.05$).

The results suggest that melatonin has the potential to improve sperm quality after freeze-thawing of bee semen. These findings suggest that the use of melatonin may be a potential strategy for the development of cryopreservation techniques and preservation of genetic material in bee production.

Key words: Bee Semen, Melatonin, Cryoprotectant, Antioxidant, Oxidative Stress, Diluent

BUÜ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ KONUSUNUN KÜRESEL SÜRDÜRÜLEBİLİR KALKINMA
HEDEFLERİ İLE İLİŞKİSİ*

1 YOKSULLUĞA SON 	2 AÇLIĞA SON 	3 SAĞLIK VE KALİTELİ YAŞAM 	4 NİTELİKLİ EĞİTİM 	5 TOPLUMSAL CİNSİYET EŞİTLİĞİ 	6 TEMİZ SU VE SANİTASYON 
☐	☐	☒	☐	☐	☐
7 ERİŞİLEBİLİR VE TEMİZ ENERJİ 	8 İNSANA YAKIŞIR VE EKONOMİK BÜYÜME 	9 SANAYİ, YENİLİKÇİLİK VE ALTYAPI 	10 EŞİTSİZLİKLERİN AZALTILMASI 	11 SÜRDÜRÜLEBİLİR ŞEHİRLER VE TOPLULUKLAR 	12 SORUMLU ÜRETİM VE TÜKETİM 
☐	☐	☐	☐	☐	☐
13 İKLİM EYLEMİ 	14 SUDAKİ YAŞAM 	15 KARASAL YAŞAM 	16 BARİS, ADALET VE GÜÇLÜ KURUMLAR 	17 AMAÇLAR İÇİN ORTAKLIKLAR 	 KÜRESEL AMAÇLAR
☐	☐	☐	☐	☐	☐

Doktora tezi olarak sunduğum “Melatonin İlave Edilmiş Sulandırıcılarla Dondurulan Arı (Apis Mellifera) Spermasının İn Vitro Olarak Değerlendirilmesi” başlıklı tez Sağlık ve Kaliteli Yaşam Küresel Sürdürülebilir Kalkınma Hedefleri ile ilişkilidir.

1. GİRİŞ

Arıcılık, dünya genelinde olduğu gibi ülkemizde de büyük ilgi gören bir tarımsal faaliyettir. Ülkemizde tarımsal ekonomide sürdürülebilirlik açısından büyük öneme sahiptir. Arıcılık genel olarak, arıları bitkisel kaynaklarla bir araya getirerek bal, propolis, polen, arı sütü, perga (arı ekmeği) gibi ürünlerin yanı sıra oğul ve ana arı, gibi canlı materyallerin üretilmesini sağlayan önemli bir sektördür.

Çiçeklerin tozlaşması (polinasyon) için arılar önemli bir rol oynarlar ve aynı zamanda kendi yaşamlarını sürdürebilmek için çiçeklere ihtiyaç duyarlar. Arıcılık, bu karşılıklı bağımlılık sayesinde ekosistemde denge sağlamaya ve bitki çeşitliliğini artırmaya da katkıda bulunur. Arıcılık, sadece arıcılara değil, aynı zamanda tarım sektörüne ve doğal ekosistemlere de olumlu etkiler sağlar. Bu nedenle, arıcılık ülkemizde önemli bir tarımsal sektördür. Günümüzde hayvansal ve bitkisel üretim modellerinin bütünleşmesinde arıcılık çok önemlidir (Seven, 2010). Balın ve arıcılık ile elde edilen diğer ürünlerin insan yaşamına olumlu yararlarının son zamanlarda daha çok anlaşılması ile birlikte gıda katkı maddelerinde, tedavilerde, gıdada ve kozmetik amacıyla kullanım alanlarında yaygınlaşması arıcılık faaliyetlerinin önemini daha da artırmıştır. Gelişmiş ülkelerde bal ürününün yanında, diğer arı ürünlerinin de faydalarının kanıtlanmasıyla, arıcılık yapmanın karlılığının artması, arıcılık sektörünü ön plana çıkarmaktadır. Arıcılık sektörü, arı ürünleri üretiminin çeşitliliğinin artması nedeniyle, gelişmiş ve gelişmekte olan birçok ülkede hızlı gelişme trendi gösteren bir faaliyettir.

2023 yılı verilerine göre, ülkemizde 8.984.676 adet kovandan 118.000 (koloni başına 13,1 kg.) bal üretimi yapılmış, Çin’de ise 9.217.000 adet kovandan 472.400 ton (koloni başına 51,2 kg.) bal elde edilmiştir. Bu veriler göz önüne alındığında ülke olarak dünya sıralamasında, bal üretimi miktarı bakımından ikinci sırada yer almamıza rağmen, koloni başına düşen bal verimi açısından birçok ülkenin gerisinde kalmaktadır (Burucu, 2023).

Arı yetiştiricileri, yüksek verimli ve hastalıklara dayanıklı arı kolonileri elde etmek isterler. Koloninin verimliliği açısından genetik yönden kraliçe arının etkisi yanı sıra erkek arılarında genetik özelliği önemli etkiye sahiptir. Kaliteli gene sahip yeterli sayıda erkekle birlite olamayan kraliçe arılar, gerekli sayıda spermayı muhafaza

edemedikleri için bir sezonu bile çıkaramadıkları olmaktadır. Bundan dolayı ekonomik katkı süreleri daha kısa olur (Genç,1990; Woyke,1962). Ayrıca, yetersiz spermaya sahip kraliçe arılı kovanlar, yeterli sayıda işçi arı sayısına sahip olmadıklarından dolayı, kovanlarda istenilen miktarda bala ulaşamaz (Cobey, 2007). Bu nedenle, kraliçe arı üretimi yapan arıcılık işletmelerinde öncelikli olarak yüksek genlere sahip, arı spermalarının kullanılması önemlidir. (Güler, 2006)

Ülkemizde yaygın olan gezginci arıcılık nedeni ile doğal olarak Anadolu iklimine adapte olmuş dayanıklı bal arısı ırklarımız önemli ölçüde zarar görmüştür ve bu nedenle önemli gen kaynaklarımız her geçen gün kaybedilmektedir. Bu durumda ise dayanıklı olmayan arı kolonilerinin kalmasıyla koloni kayıpları giderek artmaktadır (Çakmak, 2012; Çakmak ve ark., 2014; Giray ve ark., 2007). Doğal ortamda saf olmayan ırklarla çiftleşmeye bağlı olarak ırkların saflığı hızla bozulmakta, bu durum koloni verimliliğinde düşüşe sebep olmaktadır (De La Rúa, Jaffe, Dall'Olio, Munoz, & Serrano 2009). Bu sebeple bal arısı yetiştiriciliğinde dişi ve erkek gen kaynaklarının kontrollü olarak kullanılması önem arz etmektedir. Kraliçe arıyı tohumlamada kullanılacak gen kaynaklarının kontrolü amacıyla; arı bölgelerde yetiştiricilik yapmaya alternatif olarak suni tohumlama uygulaması yapılabilmektedir (Hellmich, & Waller, 1990; Hellmich, Collins, Danka, & Rinderer, 1988). Bu sayede yetiştiriciler, tohumlamada kullanılan sperm sayısını ve genetik havuzunu belirleyebilmektedir (Collins, & Donoghue, 1999).

Erkek arı spermasının dölleme özelliğini kaybetmeden istenilen süre kadar saklanabilmesi, üstün genetiğe sahip, gen özelliklerinin seçimine ve korunmasına katkı sağlamaktadır. Bu amaçla üstün genetik özelliklere sahip, ırk ve soylara ait arı spermalarının dondurularak saklanması; belirtilen özelliklerin korunmasına ve yaygınlaştırılmasına olanak sağlamaktadır (Cobey, 2007). Arıcılıkta çok karşılaşılan koloni çöküş sendromu ve varroosis gibi hastalıklardan dolayı, kolonilerde gerçekleşen kitlesel arı ölümleri sonucu kaybolan gen kaynaklarının korunması ve yaşanan bu kitlesel ölümlerinden sonra da devamlılığın sağlanabilmesi için arı spermasının dondurulması önemlidir (Stankus, 2008). Arıcılık için sperma dondurulması konusunda çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Fakat şu ana kadar donmuş arı spermasının kullanılması ile yapılan çalışmalardan istenilen düzeyde sonuçlar alınamamıştır (Cobey, 2007; Cobey, Tarpy, & Woyke, 2013).

Spermanın dondurma ve çözdrme işlemleri sırasında buz kristalleri oluşumu, soğuk şoku ve oksidatif stres (Bilodeau, Chatterjee, Sirard, & Gagnon, 2000) spermada membran btnlğn bozmakta, membranın fonksiyonel btnlğn ve spermanın DNA yapısını (Nur, Zik, Ustuner, Sagirkaya, & Ozguden, 2010) negatif etkilemektedir. Ayrıca, intrasellüler lipid ve enzim salınım miktarının artmasının sonucunda, reaktif oksijen türleri (ROS) aktivitesi ile birlikte lipid peroksidasyonu oluşmakta ve bunun sonucunda da sperma üzerinde fiziksel, fonksiyonel ve biyokimyasal hasarlar oluşturmaktadır (Watson, 1981). Sperma yapısında meydana gelen olumsuz değişiklikler, spermanın motilitenin düşmesine ve fertilizasyon yeteneğinin de azalmasına neden olmaktadır (Nur ve ark., 2010).

Birçok araştırmacı spermanın muhafaza esnasında fertilizasyonunun düşmesinde en büyük etkenlerden bir tanesinin spermatozoon membran lipidlerinin peroksidasyonu olduğunu ileri sürmektedir (Bilodeau ve ark., 2000; Bilodeau, Blanchette, Gagnon, & Sirard, 2001; Chatterjee, De Lamirande, & Gagnon, 2001; Chatterjee, & Gagnon, 2001). Sperma sulandırıcılarına eklenen antioksidanlar, spermanın dondurulmasından dolayı oluşan lipid peroksidasyonunu kontrol etmekle birlikte ROS oluşumunu da önleyerek spermatozoanın fertilizasyon özelliğini muhafaza etmektedir (Agarwal, Prabakaran, & Said, 2005; Donnelly, McClure, & Lewis, 2000). Bu nedenlerden dolayı arı spermasının dondurması sırasında kullanılacak antioksidan maddeler eklenmiş sulandırıcılar dondurma-zdrme işlemlerinden sonra spermatolojik faaliyetlere olumlu etkisi olacağı düşünmektedir.

Bu çalışmada; çeşitli dozlarda melatonin ilave edilen sulandırıcılarla dondurulan erkek arı spermasının, dondurma ve zdrme aşamaları sonrasında motilite, plazma membran btnlğ ve DNA btnğne etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yapacağımız çalışmamızdan elde edeceğimiz bilgi ve deneyimler ile arılarda suni tohumlamanın yaygınlaşmasında, genetik ilerlemenin elde edilmesinde, üstün genetik özelliğe sahip arı kolonilerinden daha fazla faydalanılmasında büyük yararlar sağlanabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

Bal arıları; hayvanlar âleminin insektler sınıfının *Apiidae* ailesi ve bu ailenin *Apis* cinsi içerisinde bulunmaktadır. Ülkemizde *Apis mellifera anatoliaca* (Anadolu bal arısı) ve *Apis mellifera caucasica* (Kafkas bal arısı) bilinen en yaygın bal arısı türleridir.

Bal arılarının fiziksel dış görünümlerine bakıldığında, bal toplayan ağız kısmı, 2 duyurga, 5 göz, 6 bacak, 4 kanat, ve bir iğne görülebilir. Arıların vücutları yumuşak kıllar ile yoğun bir şekilde kaplıdır ve çiçeklerden nektarı yalayıcı bir hortum aracılığıyla toplarlar. Arıların ağız yapıları sadece nektar toplamakla birlikte aynı zamanda polen toplama, kovan içinde besin alışverişi ve feromon dağıtımında da aktif rol alır.

Arıların gözleri baş bölgesinde bulunmaktadır. 5 adet bulunan gözlerden ikisi başın yan taraflarında bulunur ve petek gözleri olarak adlandırılırken, diğer üç göz ise basit gözler olarak başın üst ortasındadır. Baş bölgesinde bulunan antenler, arıların koku alma, tat alma, dokunma gibi görevlerini yerine getiren organlardır. Göğüs kısmında, kanatlar ve bacaklar bulunurken, karın kısmında sindirim sistemi, iç organlar ve bir iğne bulunmaktadır. Arılar, savunma amacıyla iğnelerini kullanır ve arı sokması durumunda zehir enjekte ederler.

Bal arıları, sosyal koloniler şeklinde yaşayan canlılardır. Bir kolonide üç farklı görevde birey bulunmaktadır. Bunlar kraliçe arı, sayıları onbinleri bulan işçi arılar, mevsime ve ihtiyaca bağlı olarak sayıları 100-3000 arasında değişen erkek arılardır. Bal arılarının yaşam döngüsü, yumurta evresi, larva evresi ve pupa evrelerini içermektedir. Ergin arılar farklı sürelerde gelişir. Kraliçe ve erkek arıların ortalama ağırlıkları 200 mg iken, işçi arıların ortalama ağırlıkları 120 mg ağırlığındadır. erkek arıların fiziksel görünimleri biraz daha tombul yapıdadır. Kraliçe arıların fiziksel görünimleri ise uzun ve dar bir yapıya sahiptir. (Burucu, 2023).

Arı kolonileri, hiyerarşiye dayalıdır ve belirli bir düzen içinde yaşayan sosyal topluluklardır. Kraliçe arının temel görevi, koloninin devamlılığı için yumurtlamaktır. Genç ve kaliteli bir kraliçe arı, günde ortalama 1500-2000 yumurta bırakabilir. Ayrıca kraliçe arı salgıladığı feromonlar ile kovan içinde düzeni sağlamaktadır. İşçi arıların başlıca görevleri ise petek temizliği, nektar toplama-depolama-olgunlaştırma, yavru

besleme, arı sütü ve balmumu salgılama, savunma, havalandırma, polen–propolis toplama, su toplama gibi kovandaki diğer görevlerdir (Duman, 2022)

2.1. Erkek Arıların Kolonilerdeki Yaşamı ve Rolü

Erkek arılar kraliçe arı tarafından petek gözlerinin tabanına bırakılan yumurtaların gelişerek larva, pupa ve ergin aşamalarında gelişmesiyle meydana gelmektedir. Yumurta evresi erkek arılarda 3 gündür. Yumurta içinde embriyonun gelişiminin tamamlanmasından sonra eriyen yumurta kabuğunun içinde larva çıkmaktadır. 7 günde larva dönemi sürmektedir. Larvalar, başlangıçta 3 gün boyunca arı sütü, takip eden günlerde ise polen ve bal karışımı ile beslenirler. Prepupa ve pupa olarak adlandırılan bu dönem yaklaşık 14 gün sürmektedir ve bu dönemde başkalaşım gerçekleşmektedir (Winston, 1987). Erkek arılarda ergin yaşam süreleri, ırksal farklılıklar ve mevsimlere bağlı olarak değişmektedir. Polen mevsiminde, kolonideki sayıları 2000-3000'i bulan erkek arılar 12-14 günlük yaşta cinsel olgunluğa erişir. Yaşam süreleri bahar aylarında 21-32 gün, yaz aylarında ise 60-90 gün kadardır. Sonbahar mevsiminde erkek arılar, kolonilerde üreme aktivitesinin azalması nedeniyle kovan dışına sürülerek açlığa terk edilirler.

2.2. Erkek Arı Genital Organları

Erkek arılarda, abdomenin her iki tarafında bir çift testis, vas deferens, bir çift vesikula seminalis, bir çift glandula mukoza, duktus ejaculatorius ve penis (endophallus) bölümlerinden oluşmaktadır. Testisler genç bir arıda 5 mm çapında ve yumuşak bir yapıya sahip iken erişkin arılarda yassı ve üçgen biçiminde olup boyutları 1,5 mm çapına iner.

2.3. Erkek Arılarda Spermatogenezis

Erkek arılarda spermatozoa larva aşamasından pupa aşamasına kadar geçen süreçte üretilmektedir. Üretilen spermalar 3. ve 8. günler arasında testislerden seminal veziküllere taşınır ve burada ejakülasyona kadar depolanırlar. Erişkinliğe ulaşmamış genç erkek arıların ejakülasyon yetenekleri bulunmamaktadır. Erkek arıların erişkinliğe ulaşma süreleri, genetiklerine ve içinde yetiştirildikleri koloninin kalitesine bağlı olarak değişmekle birlikte ortalama 12 gündür (Hayashi, & Satoh, 2019; Jaycox, 1961; Zool, & Bishop, 1920).

2.4. Erkek Arılarda Spermanın Özellikleri

12 gün ve üzeri yaşa sahip erişkin bir erkek arıda, sperm sayısı ortalama 4-12 milyon arasında değişiklik göstermektedir (Koeniger, Koeniger, Tingek, & Phiancharoen, 2005). Bir erkek arının, 1 µl hacimdeki semen içinde ortalama 7,5 milyon sperm hücresi vardır. Ayrıca erkek bir arı yaklaşık 10-11 milyon sperm hücresi üretebilmektedir.(Woyke, 1962).

Baş ve kuyruk kısımlarından oluşan spermatozoon, 0,7 µm genişliğinde filamentli bir yapıya sahip ve 250-270 µm uzunluğundadır. Akrozom ve nükleus olmak üzere iki bölümden oluşan baş kısmı kısa (10 µm) ve dar (0,4-0,5 µm) bir yapıya sahiptir. Kuyruk kısmı ise mikrotubuller (9+9+2) yapılardan, iki adet asimetric mitokondriden ve iki destek gövdeden oluşmaktadır. Mitokondriler aksoneme paralel olarak kuyruk boyunca uzanırlar (Lino-Neto, Bao, & Dolder, 2000; Peng, & Yin 1993; Yániz, Silvestre, & Santolaria, 2020).

2.5. Çevresel Faktörlerin Arı Sperm Kalitesine Etkisi

2.5.1. Besinler

Nektar ve polen, arılarda yetişkin ve larva gelişimi için kullanılan başlıca besin kaynaklarıdır. Erkek arıların larva gelişimi aşamasında beslenmeleri esnasında polene

sınırlı erişimi olması durumunda, daha az sperma üretimi ve ejakülasyonda başarısızlığın neden olduğu belirtilmiştir. Ayrıca polen türlerinin bileşimi (yüksek protein içeriği), arı kolonilerinin popülasyonunu büyük ölçüde etkileyen çok önemli bir faktördür (Billiet ve ark., 2016; Vanderplanck ve ark., 2014).

Koloniler sakkaroz şurubu ve protein takviyeleri ile beslendiğinde, erkek arıların sperma hacmi ve motilitesi, ek besin almayan kolonilere göre önemli ölçüde artmaktadır(Rousseau, & Giovenazzo, 2016). Erkek arıların kolonide ortaya çıkmasından sonra protein ile beslenmenin olmaması, sperm motilitesini etkilemediği belirtilmiştir. Bunun nedeni sperma gelişiminin ortaya çıkmadan önce tamamlandığını ve cinsel açıdan olgun erkek arıların ek proteine ihtiyaç duymadığını göstermiştir (Stürup, Baer-Imhoof, Nash, Boomsma, & Baer 2013).

2.5.2. Sıcaklık

Erkek arıların sperma özelliklerinde mevsimsel varyasyon bulunmaktadır. Mevsime bağlı olarak semen hacmi ve spermatozoon sayısı belirgin olarak farklılık göstermektedir. Kovan içi erkek arı sayısı en yüksek Haziran ve Temmuz aylarında görülür (Boes, 2010; Rowland, & Mclellan, 1987).

Arılar, ilkbahar aylarında, yaz ve sonbaharda olduğundan çok daha yüksek semen hacmine sahiptir. Fakat sonbaharda yetiştirilen erkek arılar, yaz ve ilkbaharda yetiştirilen erkek arılardan daha yüksek sayıda spermatozoon üretir (Rhodes, Harden, Spooner-Hart, Anderson, & Wheen, 2011; Zaitoun, Al-Majeed Al-Ghzawi, & Kridli, 2009). Düşük sıcaklıklarda inkübe edilen erkek arıların, daha az semen hacmine sahip olmasına rağmen daha yüksek sperm canlılığına sahip olduğu belirtilmiştir (Czekońska, Chuda-Mickiewicz, & Chorbiński, 2013a). Yüksek sıcaklıklara (45 °C) maruz kalan kraliçelerin spermatekasında bulunan spermatozoonların yarısının öldüğü bildirilmiştir (Bieńkowska, Panasiuk, Węgrzynowicz, & Gerula, 2011). Bu nedenle, sperma kalitesinin korunmasında optimum sıcaklıklara (30–35 °) gereksinimin duyulmaktadır.

2.5.3. Pestisitler

Arılar çeşitli bitkilerden polen ve nektar toplarken pestisitleri, sindirim sistemi ile; temas sonucu ve solunum yolu ile olmak üzere, 3 farklı yol ile alabilirler (Ceylan, Özgenç, Erhan, Sevin, & Yarsan, 2020). Yaygın olarak kullanılan pestisitler, erkek arılarda sperma canlılığını ve kraliçe arılarda spermin depolanması dâhil olmak üzere, arı sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir. 140' tan fazla üründe kullanım için kayıtlı olan neonicotinoidler, 120' den fazla ülkede en yaygın kullanılan pestisitlerdir (Jeschke, Nauen, Schindler, & Elbert, 2011). Neonicotinoidler, imidacloprid ve thiamethoxam erkek arıların sperm kalitesi üzerinde önemli ölçüde olumsuz etkilere sahip olduğu belirtilmiştir. 4,5 ppb'lik bir konsantrasyonda tiyametoksam'a maruz kaldıktan sonra erkek arıların yaşam süreleri önemli ölçüde kısalmış ve canlı spermatozoon sayısı %39 oranında azaldığı bildirilmiştir (Straub ve ark., 2016). Son derece yüksek bir imidacloprid konsantrasyonuna (0,02 ppm) maruz bırakıldıktan sonra, erkek arıların sperm motilitesi önemli oranda düştüğü görülmüştür (Ciereszko ve ark., 2017; Inouri-Iskounen, Sadeddine-Zennouche, Nait Mouloud, Kebieche, & Iguer-Ouada, 2020). Kraliçe arının spermatecası da pestisitlere karşı oldukça hassastır. Düşük dozda coumaphos (5 ppm) ve öldürücü olmayan dozda imidacloprid (0,02 ppm) ile tedaviden sonra spermatekadaki antioksidan genlerin inhibe edildiği görülmüştür. Ölümcül olmayan bir dozda imidacloprid (0,02 ppm) veya yüksek dozda kumafoya (100 ppm) maruz kalma, spermatekada sırasıyla %50 veya %33 oranında sperm canlılığında düşüşe neden olduğu bildirilmiştir (Chaimanee, Evans, Chen, Jackson, & Pettis, 2016)

2.6. Kovan İçi Faktörlerin Arı Sperm Kalitesine Etkisi

2.6.1. Yaş

Sperma özelliğini etkileyen önemli faktörlerden biri de erkek arıların yaşıdır. Erkek arılar yumurtadan çıkarken testislerinde sperma bulunmaktadır (Baer, 2005). Daha sonra sperma testislerden seminal veziküllere hareket eder, bu sırada da sperma kademeli olarak (yumurtadan çıkıştan 6-14 gün sonra) olgunlaşır. Seminal

veziküllerdeki semen hacmi ise giderek azalır, sperm yoğunluğu artar ve ejakülatın bileşimi değişir (Hayashi, & Satoh, 2019).

14 günlük ve 21 günlük erkek arılar, 35 günlük erkek arılara göre ejakülatta daha yüksek sperma sayısına sahiptir (Rhodes ve ark., 2011). Ruttner ve Tarpy, seminal veziküllerdeki sperm sayısının çıkıştan 20 gün sonra 7.390.000'e ulaştığını ve 30 gün sonra önemli ölçüde azaldığını kaydetmiştir (Metz, & Tarpy, 2019).

Ayrıca semen hacmi ve sperm sayısına ek olarak, sperm canlılığı da erkek arı yaşı ile yakından ilişkili olduğu belirtilmiştir. Artan erkek arı yaşı ile sperm canlılığının önemli ölçüde azaldığını, motilite örneklerinin değişmediğini bildirmiştir (Locke, & Peng, 1993; Stürup ve ark., 2013).

2.6.2. Vücut ağırlığı ve ölçüsü

Erkek arıların doğumdaki ağırlığının erkek arıların kolonilerde hayatta kalmasının tahmin edilmesinde önemli bir faktör olduğu ve doğumda daha ağır olan erkeklerin doğumda daha hafif olan erkeklerle göre daha uzun yaşadığını bildirmiştir (Czekońska, Szentgyörgyi, & Tofilski, 2019). Kraliçe arıların sorumlu olduğu kraliçe arı kolonilerinde, reproduktif işçiler kolonideki fertilize olmamış yumurtaların sadece % 7'sini üretir. Kraliçe kaybolduğunda, üreme yapmayan işçilerde vitellogenin ekspresyon seviyesi artar ve bal arılarının farklı alt ailelerinden gelen işçilerin tümü, farklı başarı oranlarıyla yumurtlama eğiliminde olurlar (Page, & Erickson, 1988; Peso ve ark., 2016).

Kraliçenin yumurta bırakması ile yavru erkek arı hücrelerinde üretilen erkek arılar, yumurtlayan işçi arıların bıraktığı hücrelerde gelişen erkek arılardan %17 daha büyük vücut ölçüsüne sahip olmaktadır (Gençer, & Firatli, 2005).

Vücut büyüklüğü, erkek arıların sperm sayısı ile yakından ilişkilidir. İri erkek arıların ortalama sperm sayısı ve aksesuar mukus bezi ve seminal vezikül ağırlıkları, küçük erkek arılardan önemli ölçüde yüksek bulunmuştur (Gençer, & Firatli, 2005; Gençer, & Kahya, 2011; Schlüns, Schlüns, Van Praagh, & Moritz, 2003).

2.6.3. Protein Bezleri

Seminal sıvı, proteinler ve peptitler, şekerler ve lipitler dâhil olmak üzere diğer küçük moleküllerden oluşur ve esas olarak erkek aksesuar bezlerinden üretilmektedir (Baer, Heazlewood, Taylor, Eubel, & Millar, 2009; Poiani, 2006; Tram, & Wolfner, 1999)

Bal arılarında, ejakülattaki sperma aktivitesi, genellikle ejakülat içindeki proteinlerden yararlanan spermatekada depolanan spermadan daha yüksektir (Poland ve ark., 2011). Erkek arıların testislerindeki ölü spermatozoon oranının, yeni çiftleşen kraliçelerin ve eski çiftleşen kraliçelerin spermatekasında bulunan spermatozoon oranından önemli ölçüde düşük olduğunu bildirmiştir (Greeff, & Schmid-Hempel, 2008). Semendeki proteinlerin varlığı ve yapısal bütünlükleri, sıradan protein ikameleri tarafından kopyalanamayan bu etki için kritik öneme sahip olduğu görüşü hâkimdir (King, Eubel, Millar, & Baer, 2011).

2.7. Erkek Arılardan Spermanın Elde Edilmesi

Erkek arılardan spermanın sağlıklı ve hijyenik koşullarda mikroskop yardımıyla alınması, spermanın taze veya dondurularak saklanması ilk aşamasını oluşturmaktadır. Bu amaçla öncelikle erkek arıların yetiştirileceği koloniler tespit edilmeli ve bu koloniler takviye besinlerle desteklenmelidir. Bu sayede koloninin işçi arı varlığı uygun sayılara ulaşması sağlanmalıdır. Varroa hastalığına karşı etkili bir mücadele bu belirlenen kolonilerde yapılmalıdır. Çünkü Varroa hastalığı genellikle erkek arılara ait petek gözlerini tercih etmekte ve bu parazitle yoğun enfestasyon içindeki kolonilerde sperma kalitesinin düşük olmaktadır (Goodvin, & Eaton, 2001).

Erkek arılarda semen toplamak için seminal veziküllerin diseksiyonu ve ejakülasyonun indüksiyonuna dayanan iki ana yöntem belirtilmiştir. Geçmiş yıllarda, semen esas olarak seminal veziküllerden elde edilmesine rağmen son yıllarda indüklenmiş ejakülasyon yöntemi, semen numunelerini toplamak için kullanılan ana yöntem olmuştur (Yániz ve ark., 2020).

Erkek arının ejakülasyonu, göğüs kafesine ve karın bölgesine basınç uygulanmasıyla tetiklenmektedir. Semen, dışa dönük endofallusun ucundan doğrudan bir şırıngaya bağlı bir cam kılcal tüpe toplanmaktadır (Cobey ve ark., 2013).

Sperma alınması sırasında kullanılan serum fizyolojik solüsyonuna alternatif olarak Kiev solüsyonu (NaHCO₃, 0,01 g; Trisodyum citrate-2 hydrate, 2,43 g; KCl, 0,30 g; glikoz, 0,30 g/100 ml distile su), ringer solüsyonu (KCl, 0,025 g; NaCl, 0,85 g; CaCl₂, 0,030 g; glikoz, 0,50 g/100 ml distile su) vb. kimyasal bileşim kullanılabilmektedir (Cobey, & Schley, 2002; Güler, 2006).

Araştırmalar sonucunda geliştirilmiş sulandırıcı (sodium citrate 0,03 g; Na₂HPO₄ 0,014196 g; NaHCO₃ 0,042 g; NaCl 0,49 g; KCl 0,6113 g; TES buffer 0,6878 g; EDTA 0,00037 g; Tris base 0,3634 g; bovine serum albumin 2 mg; proline 0,04950 g; catalase 0,5 mg; arginine 0,01 g; glycine 0,00075 g; 10 µl Gentamycine; 25 µl Streptomycin; 20 µl penicillin/100 ml distile su) sperma toplama ve spermanın dondurma solüsyonu olarak ve kraliçe arıların tohumlanması esnasında iyi sonuçlar verdiği belirtilmektedir (Hopkins, Herr, & Sheppard, 2012).

2.8. Spermanın Kriyopreservasyonu

Kriyopreservasyonun; ilk aşaması spermanın sulandırılması, ikinci aşaması 5°C'a soğutulması, üçüncü aşaması dondurulması ve son aşama olarakta spermanın eritilmesini kapsamaktadır (Curry, Kleinhans, & Watson, 2000 ; Holt, 2000). Sperma sulandırılarak bu aşamalara karşı direnç sağlar.

Spermanın daha iyi dondurulması amacıyla, sulandırıcı geliştirme çalışmalarında, düşük molekül ağırlığına sahip hücre zarından da geçebilen şekerler (glikoz, früktoz vb), farklı pH tamponlayıcı maddeler (Hepes, Test, Tris-sitrik asit, vb) ve membran yapısını koruyan maddelerin (DMSO ve diğer polialkoller, gliserol, amino asitler vb) yer aldığı çok çeşitli sulandırıcılar geliştirilerek kullanılmaktadır (Aisen, Alvarez, Venturino, & Garde, 2000). Bunların yanı sıra membran dengeleyicileri (amino asitler, süt, lipidler ve yumurta sarısı), laktoz, dekstran ve sükroz gibi nüfuz etmeyen şekerler, antifriz proteinleri de sulandırıcılarda kullanılmıştır (Aisen ve ark., 2000; Fiser, Ainsworth, & Fairfull, 1987 ; Molinia, Evans, Casares, & Maxwell, 1994; Salamon, & Maxwell, 1995; Schmehl, Vazquez, &

Graham, 1986).

Sperma sulandırmasında bir veya iki aşamadan oluşan sulandırma tekniği kullanılmaktadır. Sulandırma tekniklerinden tek aşamalı olanda, kriyoprotektan madde içeren sulandırıcı, spermaya aşamalı bir biçimde eklenerek 28-32°C sıcaklığında tamamlanan sulandırma işlemidir. İki aşamalı sulandırma tekniğinde, önce kriyoprotektan madde içermeyen sulandırıcı ile 28-32°C sıcaklığında sulandırıldıktan sonra, 1-2 saat içinde 5°C sıcaklığına düşürülüp, aynı sıcaklıkta içerisinde kriyoprotektan madde içeren sulandırıcı ile aşamalı bir şekilde ikinci defa sulandırılır.(Çoyan, Ataman, Kaya, & Karaca, 2002; Hafez, & Hafez, 2013) .

Ekilibrasyon (alışım) evresi, bütün sulandırma prosedürleri tamamlandıktan sonra sıcaklığı 5°C' ye azaltılmış spermanın, yine 5°C' de 2-10 saat bekletilmesidir (Çoyan ve ark., 2002). Spermanın membran bütünlüğünün korunması ve motilite için önemli bir aşamadır (Leite ve ark., 2010). Ekilibrasyon, spermanın DMSO ile muamele edilmesi, hücre içi ve dışı dengesinin korunmasıdır.

Sperma genellikle ekilibrasyon sonrasında payet yöntemi kullanılarak dondurulur. Bu yöntemde, ekilibrasyondan sonra sperma payetlere çekilir, sıvı azot buharında 7-10 dakika (-80 ila - 120°C sıcaklıkta) bekletilerek dondurulur (Çoyan ve ark., 2002) ve sonrasında sıvı azot içerisinde -196°C muhafaza edilir.

2.9. Sperma Üzerine Soğuk Şokunun Etkileri

Spermanın dondurulması sırasında oluşan soğuk şoku (Watson, 1981), buz kristalleri ve oksidatif stres (Bilodeau ve ark., 2000) spermanın membran yapısını hasara uğratarak DNA bütünlüğünü ve membran fonksiyonel bütünlüğünü (Nur ve ark., 2010) olumsuz yönde etkilemektedir. Ayrıca, intrasellüler enzim ve lipid salınımının (Darin-Bennett, Poulos, & White, 1973) artması sonucunda meydana gelen reaktif oksijen türleri (ROS) aktivitesi, sperma üzerinde fonksiyonel, biyokimyasal ve fiziksel hasarlar oluşturmaktadır. Bu oluşan hasarlar, fertilizasyon yeteneğinin azalmasına ve motilitenin düşmesine neden olduğu bildirilmektedir (Nur ve ark., 2010).

Sperma donduma ve çözündürme işlemleri, oksidatif strese yol açarak fertilitayı olumsuz yönde etkilemekte ve oluşan ROS, antioksidan savunma sistemini de yok

etmektedir. ROS'un yüksek miktarlarda üretilmesi spermanın oosit penetrasyonu, spermanın füzyonunda ve motilitesinde azalmalara bunun yanı sıra DNA hasarlarında artışa ve sperma hücrelerinin ölümüne sebep olmaktadır (Alcay ve ark., 2019). ROS üretimi ile hücrel antioksidanlar arasında normalde bir denge bulunsa da, bu denge bozulduğunda yüksek ROS üretimi oksidatif stresi tetikleyerek spermatozoanın bütün spermatolojik işlevleriyle mitokondrial ve nükleer DNA'sında daimi zararlara neden olmaktadır (Sariözkan, Bucak, Tuncer, Ulutaş, & Bilgen, 2009). Kriyopreservasyon işlemi sonucu artan serbest radikaller ise spermatozoanın yaşlanmasına yol açarak, fiziksel ve kimyasal hasarlar oluşturmaktadır. (Jones, Mann, & Sherins, 1979).

Serbest radikallerin en önemli etkilerinden biri, lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır. Lipid peroksidasyonu sonucunda ortaya çıkan malondialdehid (MDA), hücre membranları üzerinde iyon alışverişinin etkilenmesi sonucunda membranda bulunan bileşikler çapraz bağlanır. Bu sonuca göre, iyon geçirgenliği etkilenir, enzim aktivitesinde değişikliklere neden olarak olumsuz sonuçlara sebep olur (Placer, Cushman, & Johnson, 1966). Kriyoprezervasyon sürecinde, spermatozoa ve seminal plazmadaki antioksidan enzim düzeylerindeki azalmaya bağlı olarak MDA konsantrasyonu artar, bu da spermatozoanın membranlarında daimi zararlara yol açar. Bu husus, spermatozoanın fertilizasyon özelliğini kapsamak üzere bütün işlevsel özelliklerini negatif etkiler. Ancak antioksidanlar, bu olumsuz etkilere karşı savunmada rol alarak, serbest radikallerin neden olduğu oksidatif strese karşı spermatozoayı korur. Bu koruyucu etki, ROS üretimini engelleyerek mevcut serbest radikalleri yok ederek gerçekleşir (Agarwal ve ark., 2005). Spermatozoa ve seminal plazma ROS' un zarar verici etkisine karşı antioksidatif savunma sistemlerine sahip olduğu bilinmektedir (Jones ve ark., 1979). Seminal plazma ve spermatozoa içinde bulunan antioksidanlar, spermatozoanın plazma membranındaki lipid peroksidasyonunu kontrol altına alarak bütünlüğünü korur. Ancak, spermatozoa sitoplazmalarının küçük olması nedeniyle katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-PX) ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi antioksidan enzim miktarları düşüktür, bu da spermatozoonun antioksidatif savunma sistemlerinin sınırlı olduğu anlamına gelir (Agarwal ve ark., 2005). Spermanın dondurulması, spermatozoadaki intrasellüler antioksidan düzeylerinde belirgin bir azalmaya neden olmaktadır.

Çok sayıda araştırmacı spermanın muhafazası esnasında fertilizasyonun düşmesinde en büyük etkenlerden bir tanesinin spermatozoon membran lipidlerinin peroksidasyonu olduğunu ileri sürmektedir (Bilodeau ve ark., 2000; Bilodeau ve ark., 2001; Chatterjee ve ark., 2001; Chatterjee, & Gagnon, 2001).

Sulandırıcılara eklenen antioksidanlar veya antioksidan içeren maddeler, dondurma işleminden dolayı oluşan, lipid peroksidasyonunu kontrol eder ve ROS oluşmasını önleyerek spermatozoanın sahip olduğu fertilizasyon özelliğini korumaktadır (Agarwal ve ark., 2005; Beconi, Affranchino, Schang, & Beorlegui, 1991; Donnelly ve ark., 2000; Vishwanath, & Shannon, 1997).

2.10. Melatonin

Melatonin, yüksek lipofilik özelliklere sahip güçlü bir antioksidandır; bu özelliği sayesinde hidroksil radikallerini yakalayarak ortadan kaldırabilir (Atasoy, & Erbaş, 2017). Melatonin, oksidatif stresin neden olduğu doku hasarını önleyerek etkili bir koruma sağlar. Bu antioksidan özellik, melatonin'in suda ve lipid fazda çözünbilme özelliği sayesinde tüm intraselüler komponentlere kolayca ulaşmasını sağlar. Hücre membranını, organelleri ve nükleusu serbest radikal hasarından etkin bir şekilde korur. Melatonin, hücre membranına bağlanarak serbest radikalleri yakalar ve detoksifiye ederek membranın bütünlüğünün korunmasını sağlar. Ayrıca mitokondriyal solunumda oluşan hidroksi (OH), oksijen (O₂) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi radikallerin oluşmasını azaltarak spermanın DNA'sını oksidatif hasara karşı korur (Reiter, 1993).

Melatonin, prooksidatif aktivitesi yoktur ve kolaylıkla da oksitlenmeyen bir molekül yapıdadır. Serbest radikal üreten reaksiyonlar ve redoks döngüsüne girmeyerek kendisini korur (Beyer, Steketee, & Saphier, 1998). Melatonin, yüksek dozlarda kullanıldığında bile zarar verici bir toksik özelliği yoktur. Bu özelliği, melatonin genel bilinen antioksidanlardan (β -karoten, E vitamini, C vitamini vb.) ayırır. Bu genel bilinen antioksidanlar, tesirlerinden sonra prooksidan maddelere değişebilirler ve daha az zararlı hale gelirler. Oksidan maddelere etki eden melatonin,

sonraki ara aşamalarda yine antioksidan "suicidal veya terminal antioksidan" etkisi gösterir (Reiter, 1993).

Melatoninin peroksit radikalini ortadan kaldırma özelliği E vitamininden iki kat, OH radikalini nötralize etme özelliği ise glutatyondan beş kat daha fazla olduğu belirtilmiştir. Melatoninin, DNA hasarının onarımını teşvik ettiği de bildirilmiştir (Reiter, Tan, Osuna, & Gitto, 2000). Melatonin, antioksidan enzimleri uyarmasıyla, lipid peroksidasyonunu engellemesiyle ve beyin dokusunu oksijen kaynaklı serbest radikallerden korumasıyla bilinmektedir. (Cosme, Rodríguez, Garrido, & Espino, 2022; Köse, 2004).

Kriyopreservasyon sırasında sperma kalitesi; oksidatif stres, lipid peroksidasyonu artışı ve plazma membran bütünlüğünün kaybı ile sonuçlanabilecek, dolayısıyla sperm-oosit fertilizasyon kapasitesini bozabilecek nedenlerden dolayı olumsuz yönde etkilenir (Grötter, Cattaneo, Marini, Kjelland, & Ferré, 2019; Kopeika, Thornhill, & Khalaf, 2015; Lemma, 2011; Said, Gaglani, & Agarwal, 2010; Sun ve ark., 2020; Tiwari, Dewry, Srivastava, Nath, & Mohanty, 2022; Ugur ve ark., 2019). Bu nedenle bilim insanları, güçlü antioksidan etkisi göz önüne alındığında, melatoninin kriyoprezervasyon sırasında spermatozoa üzerindeki olası koruyucu etkilerine odaklanmıştır.

Bu koruma, hem toplam antioksidan kapasitede hem de antioksidan enzimlerin aktivitesinde melatoninin uyardığı artışla ilişkili olarak sperm hücrelerinde lipid peroksidasyon olaylarının azalmasıyla ilişkilidir (Cruz, Leal, Da Cruz, Tan, & Reiter, 2014). Birçok çalışma, melatoninin sperm kriyoprezervasyonunda etkili bir kriyoprotektan olduğunu kanıtlamıştır. Örneğin, semen sulandırıcıda 2 mM veya 3 mM melatonin takviyesinin, lipid peroksidasyonunu azalttığı ve toplam antioksidan kapasiteyi ve antioksidan enzimlerin aktivitesini arttırdığı için boğa spermasındaki olumsuz etkileri ortadan kaldırdığı bildirilmiştir (Ashrafi, Kohram, & Ardabili, 2013). Benzer şekilde, 100 uM veya 1 mM konsantrasyonda melatonin kullanımı, kriyopreservasyon sonrası bufalo sperminde hem motilite hem de canlılık parametrelerini iyileştirdiği ve in vitro fertilizasyon sonrası elde edilen embriyoların yüzdesine olumlu yansıdığı belirtilmiştir (Chaudhary, Aeksiri, Wanangkarn, Liao, & Inyawilert, 2021; El-Raey, Badr, Rawash, & Darwish, 2014; Inyawilert, Rungruangsak, Liao, Tang, & Paungsukpaibool, 2021). Ayrıca sperma sulandırıcısına

1 mM melatonin ilavesinin tavşan, koç, at ve köpek gibi çeşitli hayvan türlerinde sperma kalitesi üzerine olumlu etkisinin olduğu saptanmıştır.

Bu çalışmalar, melatoninin sperm DNA'sını ve akrozom bütünlüğünü arttırdığını (Divar, Azari, Mogheiseh, & Ghahramani, 2022; Fadl, Ghallab, Abou-Ahmed, & Moawad, 2021; Lançon ve ark., 2018), bunun da artan toplam bölünme oranlarına ve dolayısıyla daha yüksek fertilizasyon ve doğum oranlarına (Fadl ve ark., 2021; Succu ve ark., 2011) sebep olduğunu bildirmiştir.

Bununla birlikte, sulandırıcıya 500 uM melatonin ilave edilmesinin, anti-apoptotik gen B-hücreli lenfoma-ekstra-büyük Bcl-xL ekspresyonunun artmasına ve eritme sonrası fare spermasının yaşayabilirliğini iyileştirdiği gösterilmiştir (Chen ve ark., 2016). Öte yandan, insan sperm numuneleri ile yapılan çalışmalar, kriyoprotektan olarak eklenen 100 uM melatonin kullanımının, hücre içi ROS seviyelerini ve lipid peroksidasyonunu azaltırken, sperm canlılığını ve membran bütünlüğünü önemli ölçüde artırabildiğini göstermiştir (Sun ve ark., 2020; Yu, Deng, Sun, Li, & Liu, 2018). Benzer şekilde, diğer yazarlar da farklı melatonin konsantrasyonlarının (10 uM ve 3 mM), dondurularak saklanan spermatozoanın daha yüksek canlılığı ve hareketliliği ve daha düşük hücre içi ROS seviyeleri ile sonuçlandığını bildirmiştir. (Karimfar ve ark., 2015; Najafi ve ark., 2018)

2.11. Erkek Arılarda Spermanın Muayenesi

2.11.1. Semen Hacmi

Erkek arının ejakülatından elde edilen toplam sperma hacmidir ve mikropipet veya hassas enjektör kullanılarak belirlenebilmektedir. Arılarda sperma hacminin ortalama 1 µL (0,1 ve 2,4 µL arasında) olduğu bildirilmiştir (Collins, & Pettis, 2001; Czekońska, Chuda-Mickiewicz, & Chorbiński, 2013a, 2013b; Czekońska, Chuda-Mickiewicz, & Samborski, 2015; Gençer, & Kahya, 2011; Kairo ve ark., 2016; Rhodes ve ark., 2011; Rousseau, Fournier, & Giovenazzo, 2015; Rousseau, & Giovenazzo, 2016; Schlüns ve ark., 2003). Erkek arı başına toplanan semen hacmini etkileyen

faktörler arasında yaş, vücut ağırlığı, mevsim ve üreme hattının etkileri belirtilmiştir (Gençer, & Kahya, 2011; Rhodes ve ark., 2011).

2.11.2 Spermatozoon Yoğunluğu

Birim hacimde bulunan spermatozoon sayısı erkek arılarda sperm kalitesinin belirlenmesinde en sık kullanılan parametrelerinden biridir ve erkek arıların spermatogenez süreci ile reprodüktif olgunluğunun değerlendirilmesine olanak sağlar (Rhodes ve ark., 2011). Suni tohumlama yapmak amacıyla, erkek arı başına toplanan spermatozoa sayısı ile spermatekaya ulaşan spermatozoon yüzdesi arasında doğrudan bir ilişki bulunmaktadır (Schlüns, Koeniger, Koeniger, & Moritz, 2004). Sperma konsantrasyonu nadiren spektrofotometrik (600 nm dalga boyu) yöntem ve çoğunlukla hemasitometrik yöntem kullanılarak belirlenmektedir (Ciereszko ve ark., 2017; Collins, & Pettis, 2001; Rousseau ve ark., 2015) Erkek arılarda sperma konsantrasyonu 2- 9 milyon /1 μ L arasında değişmektedir. Erkek arıların (11 veya 12 günlük) seminal veziküllerinin kesilerek sayıldığı çalışmalarda, toplam sperma sayısının 1 ila 30 milyon arasında değiştiği bildirilmiştir (De Guzman, Lancaster, Delatte, & Stelzer, 1999; Duay, De Jong, & Engels, 2002; Gençer, & Firatli, 2005; Moritz, 1981; Phiancharoen, Wongsiri, Koeniger, & Koeniger, 2004; Rinderer ve ark., 1981; Schlüns ve ark., 2003) Seminal veziküllerdeki spermatozoa sayısının, yaklaşık 7-9 günlükken en yüksek düzeye ulaştığı belirtilmiştir (Jaycox, 1961; Mackensen, 1955). Ejakülasyon başına toplanan ortalama sperma sayısı ise genellikle seminal veziküller için tanımlanandan daha düşüktür ve 0 ila 19 milyon arasında değişmektedir (Gençer, & Kahya, 2011; Kairo ve ark., 2016; Nur ve ark., 2012; Rhodes ve ark., 2011; Rousseau ve ark., 2015; Rousseau, & Giovenazzo, 2016)

Erkek arı başına üretilen sperma sayısı vücut ağırlığına, yaşa, mevsime, genetiğe ve hastalığa göre değişebilmektedir (Collins, & Pettis, 2001; Czekońska ve ark., 2013b; Gençer, & Kahya, 2011; Mackensen, 1955; Rhodes ve ark., 2011). Sperm üretimi sonbaharda ve yaklaşık 21 günlük büyük ve sağlıklı erkek arılarda daha yüksek görülmektedir. Birçok çalışma da erkek arılarda bulunan spermatozoa sayısındaki büyük farklılıkların, kullanılan yöntemdeki hatalar (Koeniger ve ark., 2005), akrabalı yetiştirme ve erkek arıların farklı yetiştirme ve bakım koşullarının etkisi ile olabileceği

açıklanmıştır. (Czekońska ve ark., 2015)

2.11.3 Motilite

Ejakülat içerisinde hareketli olan spermatozoonların yüzdesi motilite olarak ifade edilmektedir. Motilite, spermanın kraliçenin spermatekasına göçü ve oositin fertilizasyonu için önem arz etmektedir (Wegener, & Bienefeld, 2012) Motilitenin değerlendirilmesi subjektif olarak hareketli hücre yüzdesine göre 4-6 dereceli bir skorun oluşturulmasına dayanmaktadır (Alcay, Üstüner, Çakmak, Çakmak, & Nur, 2015; Dadkhah, Nehzati-Paghaleh, Zhandi, Emamverdi, & Hopkins, 2016; Kaftanoglu, & Peng, 1984; Lensky, & Schindler, 1967; Locke, & Peng, 1993; Nur ve ark., 2012; Taylor, Guzmán-Novoa, Morfin, & Buhr, 2009; Verma, 1978)

Son çalışmalarda ise, motilitenin değerlendirilmesinde hareketli hücreler yüzde olarak ifade edilmiştir (Alcay ve ark., 2019; Ciereszko ve ark., 2017; Wegener ve ark., 2012, Wegener, May, Kamp, & Bienefeld, 2014b, Wegener, May, Kamp, & Bienefeld, 2014a; Yániz, Palacín, & Santolaria, 2019). Spermatozoa, herhangi bir aktif hareket sergiliyorsa hareketli sperm, sperm başı yer değiştiriyorsa serbestçe hareketli, sperm başı ve kuyruğu örtüşüyorsa dairesel sperm olarak sınıflandırılabilir (Yániz ve ark., 2019). Spermin dairesel hareketi bazı yazarlar tarafından sperm kalitesinin bir göstergesi olarak kabul edilmiştir (Ciereszko ve ark., 2017; Wegener ve ark., 2012). Spermatozoa başlarının tanımlanmasındaki zorluklar nedeniyle bilgisayar destekli sperm motilite analizinin geliştirilmesi mümkün olmamıştır. Arı sperması, memeli spermasının tipik motilite hareketlerini sergilemediğinden dairesel bir düzende hareket ederek hızla titreşme eğilimindedir (Taylor ve ark., 2009).

2.11.4. Morfolojik Muayene

Spermatozoonların morfolojik özelliklerinin mikroskop altında incelenmesi, spermanın potansiyel fertilitasını değerlendirmek açısından kritik bir rol oynamaktadır. Spermanın morfolojisinin değerlendirilmesinde memelilerde olduğu gibi çok sayıda çalışma bulunmamaktadır. Ancak arılarda spermanın morfolojik

değerlendirilmesinde; plazma membran bütünlüğü, akrozomal bütünlük, mitokondriyal membran potansiyeli, DNA analizi yöntemleri değerlendirilmektedir.

2.11.4.1. Plazma Membran Bütünlüğü

Plazma membran bütünlüğü, arılarda sperma analizi için en yaygın olarak değerlendirilen sperm kalitesi parametrelerinden biridir. Bunun nedeni, membran bütünlüğü kaybının sperm canlılığı ile doğrudan ilişkili olduğu kabul edilmektedir (Yániz ve ark., 2013). Plazma membran bütünlüğünün değerlendirilmesinde birçok yöntem kullanılmıştır (Yániz ve ark., 2020).

Ölü sperm hücrelerini boyamak için en yaygın kullanılan florokrom propidyum iyodür (PI) boyama yöntemidir. Bozulmamış bir plazma membranı PI'yi geçirmez, ancak bu madde hasarlı zarlardan geçebilir, DNA'ya bağlanabilir ve ölü spermatozoanın çekirdeğinde parlak kırmızı bir floresan yayabilir. Genellikle PI; SYBR-14, Hoechst 33342 veya akridin oranj gibi canlı sperm hücrelerinin bozulmamış plazma membranlarını geçebilen floresan boyalarla da kullanılmaktadır. Canlı ve ölü sperm hücrelerinin SYBR-14/PI ile boyandıktan sonra bir floresan mikroskobu altında manuel olarak sayılması, bal arısında sperm canlılığının değerlendirilmesinde kullanılan en yaygın yöntemdir.

Ayrıca plazma membran bütünlüğünün değerlendirilmesinde hipo-ozmotik solüsyonlar da (hipo-ozmotik şişme testi, HOST) kullanılmaktadır. Bu yöntem, bozulmamış plazma zarları ile spermatozoada su birikimi ile ilişkili kuyruk kıvrılmasının değerlendirilmesine dayanmaktadır (Alcay ve ark., 2015,2019; Nur ve ark., 2012). Hücre enzimatik aktivitesine dayanan diğer yöntemler de zaman zaman bal arısında canlılık değerlendirmesi için kullanılmıştır (Abdelkader ve ark., 2014).

Arı ejakülatındaki sperma canlılığının %55 ile %99 arasında olduğu belirtilmiştir (Yániz ve ark., 2020). Adım adım yapılan bir araştırmada, erkek arıların seminal veziküllerinden (%98,1) kraliçenin lateral yumurta kanallarına (%88,7) sperm taşınmasında sperm canlılığında yaklaşık %10'luk bir azalma olduğu bildirilmiştir (Gençer, Kahya, & Woyke, 2014). Bu azalma doğal olarak endofallusun ters çevrilmesinin ikinci aşaması sırasında ve kraliçenin lateral yumurta kanallarına semen enjeksiyonu sırasında meydana geldiği ve bu aşamalar sırasında sperma üzerindeki

artan basıncın buna neden olduğu belirtilmiştir. Sperma canlılığı erkek arının yaşına, beslenmesine, yönetim uygulamalarına, çevresel faktörlere, insektisit ve mitisitlere maruz kalmaya göre de farklılık göstermektedir (Rangel, & Fisher, 2019).

Birden fazla erkek arıdan alınan semen örneklerinin pooling yapılmasının sperma canlılığı üzerindeki etkisi ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Bazı çalışmalarda, pooling uygulamasının sperma canlılığı üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı bildirilirken (Shafir, Kabanoff, Duncan, & Oldroyd, 2009; Tofilski, Chuda-Mickiewicz, Czekońska, & Chorbiński, 2012) diğer çalışmalarda, pooling yapılmasının spermanın canlılığı üzerinde olumsuz bir etkisi olduğu belirtilmiştir. Pooling yapılmış spermatozoa üzerinde bireysel ejakülatlara göre daha büyük bir fiziksel stres olduğunu gözlemlemişlerdir (Collins, & Donoghue, 1999; Den Boer, Baer, & Boomsma, 2010).

2.11.4.2. Akrozom Bütünlüğü

Kraliçe arı yumurtlama sırasında spermatekadan spermatozoonların salınımını yapar. Akrozom reaksiyonu sonucunda yumurtayı fertilize etmek için vitellin zarın penetrasyonuna yardımcı olan litik enzimleri serbest bırakılır. Arılarda akrozom bütünlüğünün değerlendirilmesinde sınırlı sayıda çalışma vardır. Bu çalışmalarda spesifik olarak bazı akrozomal glikoproteinlere bağlanan bitki proteinleri olan lektinler kullanılmaktadır. Bu amaçla *Pisum sativum* aglutinin (PSA) lektin boyası kullanılmaktadır (Alcay ve ark., 2019; Gillan, Evans, & Maxwell, 2005, 2005; Nagy, Jansen, Topper, & Gadella, 2003; Silva, & Gadella, 2006; Yániz ve ark., 2020).

2.11.4.3. Sperm Mitokondriyal Fonksiyon (Mitokondriyal Membran Potansiyeli)

Spermatozoa, farklı işlevlerini yerine getirmek için enerjiye ihtiyaç duymakta ve ATP'yi çoğunlukla glikolitik ve oksidatif fosforilasyon yollarıyla elde edebilmektedir (Moscatelli ve ark., 2017; Storey, 2008). Mitokondri oksidatif fosforilasyonun sperm hücrelerinin hareketi için birincil enerji kaynaklarını sağladığı

varsayılmaktadır (Dolník, Mudroňová, Pošivák, Lazar, & Mudroň, 2019). Mitokondrinin, sperm mitokondriyal fonksiyonunun değerlendirilmesinin oldukça önemli olduğu düşünülen memelilerde, sperma fonksiyonunu düzenlemede önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Peña, Ortiz Rodriguez, Gil, & Ortega Ferrusola, 2018). Mitokondriyal fonksiyon, membran potansiyeli ile değerlendirilmektedir. Bal arısında Rodamin 123 (R123) boyası kullanılarak sperma mitokondriyal fonksiyonunu değerlendiren yalnızca iki adet çalışma bulunmaktadır (Alcay ve ark., 2019).

2.11.4.4. DNA Analizi

Genetik bilginin yavruya doğru şekilde iletilmesinin önemi göz önüne alındığında, spermadaki hasarlı DNA'yı tespit etmek için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (Dolník ve ark., 2019). Bu yöntemlerden bazıları sperm kromatin yapısı testi (SCSA), terminal transferaz dUTP nick-end etiketleme (TUNEL) testi ve sperm kromatin dağılımı (SCD) testi sayılabilir. TUNEL yöntemi, dondurarak saklama prosedürünün neden olduğu DNA hasarını ölçmek için bal arısında test edilmiştir, ancak taze semen örnekleriyle karşılaştırıldığında net bir artış gözlemlenmemiştir (Wegener ve ark., 2014b). SCD testi kullanılarak, spermatekada depolanan spermden erkek arı ejakülatına göre daha düşük bir DNA fragmentasyonu gözlemlenmiştir. Aynı teknik, *N. ceranae* enfeksiyonunun erkek arılarda sperm DNA hasarına neden olduğunu göstermek için de kullanılmıştır (Borsuk, Kozłowska, Anusiewicz, & Paleolog 2018).

2.11.4.5. Stresin Etkisi

2.11.4.5.1 Oksidatif stress

Oksidatif stresin spermadaki redoks homeostazının kaybı, membranların lipid peroksidasyonu ve DNA hasarı da dahil olmak üzere spermatozoa üzerinde zararlı etkileri bulunmaktadır

Spermatozoa, somatik hücrelere göre oksidatif strese daha duyarlıdır. Bunun nedeni birkaç antioksidan içeren indirgenmiş bir sitoplazma sahip olmaları ve plazma

membranlarının, peroksidasyona oldukça duyarlı doymamış serbest asitler açısından zengin olmasıdır.

Ayrıca, flagella hareketi elde etmek için gerekli olan spermatozoanın yüksek hücrel metabolizması serbest radikaller üretir. Sperma bu nedenle kriyopreservasyon işleminden olumsuz yönde etkilenir (Sadeghi ve ark., 2018).

ROS analizi yoluyla oksidatif stresin doğrudan belirlenmesi, ara ürünlerinin kısa ömürleri (Dolník ve ark., 2019) ve spermatozoanın doğal olarak ROS üretmesi (Sadeghi ve ark., 2018) nedeniyle çok zordur. Ancak erkek arı spermasının oksidatif parametrelerinin değerlendirilmesinde birkaç çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda MDA seviyeleri ölçülmüştür.

2.11.4.5.2 Uyarılan Strese Tepki

Termal (Fiser, Hansen, Underhill, & Marcus, 1991), oksidatif (Sellem ve ark., 2015) veya ozmotik stres (Barrier Battut ve ark., 2016) gibi çeşitli uyarılmış stres türlerine spermatozoanın tepkisi, memelilerde sperm kalitesinin bir parametresi olarak kullanılmaktadır. Bal arısında ise, spermanın ozmotik ve pH stresine karşı toleransı değerlendirilmiştir. Suni tohumlama sonrası spermateka'ya ulaşan spermatozoa sayısı ile ozmotik ve pH stresi arasında korelasyonlar olduğu belirtilmiştir (Wegener ve ark., 2012).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Erkek Arıların Üretimi

Erkek arıların üretilmesi amacıyla, en az 6 ay süreyle ilaç kullanılmayan, sağlıklı ve güçlü koloniler tercih edildi. Mart ayı içinde tespit edilen kovanlara, özel olarak erkek arılar için yapılmış geniş hücre çapına sahip petekler yerleştirildi. Bu kolonilere, pudra şekeri, bal ve yaş arı poleni içeren arı keki verildi ve böylece çalışma için ek besin desteği verildi. (Burley, Fell, & Saacke, 2008).

3.2. Spermanın Alınması ve Muayenesi

Nisan-haziran ayları, arılarda üreme içgüdüsünün en yüksek olduğu dönemdir ve bu zaman diliminde sperma alma faaliyeti gerçekleştirilmiştir. Sperma işleminin yapılacağı gün, 14 gün ve daha büyük yaştaki erkek arılar seçilerek laboratuvara getirilmiş ve sperma alma işlemi yapılana kadar yaşamlarına uygun sıcaklık ve besin verilerek bekletilmiştir. Resim 1’de erkek arı yetiştirme hücreleri, resim 2’de erkek arılar ve işçi arılar, resim 3 ve 4’te erkek arıların laboratuvarındaki bekleme kutuları, resim 5’te erkek arı genital organ ve sperması ve resim 6’da erkek arı sperma alınmasının örnekleri vardır.

Sperma toplama işlemi için, Schley Tohumlama aleti (Schley Enstrumental Tohumlama Ekipmanı 12.01, Lich, Almanya) kullanılmıştır. Enjektöre, 0,8 µL fizyolojik tuzlu su çekilmiştir. Ardından laboratuvara getirilmiş erkek arılar baş ve thoraks kısmından sabitlenerek tutulmuştur. Abdomenin nazıkçe sıkılması ile sperma kesesi dışarı çıkarılmıştır. Her erkek arıdan mikroskop altında yaklaşık 0,8-1 µL hacimde sperma enjektöre çekilmiştir. Sperma miktarı 0,8 µL’nin altında olan erkek arılar tercih edilmemiştir. Bu işlem, her bir dondurma grubu için 10 µL final hacmi (yaklaşık 12-14 arı) elde edilene kadar tekrarlanmıştır (Cobey ve ark., 2013).



Resim 1. Erkek arı yetiştirme hücreleri



Resim 2. Erkek arılar ve işçi arılar



Resim 3. Erkek arıların labaratuvardaki bekleme kutuları



Resim 4. Erkek arıların labaratuvardaki bekleme kutuları



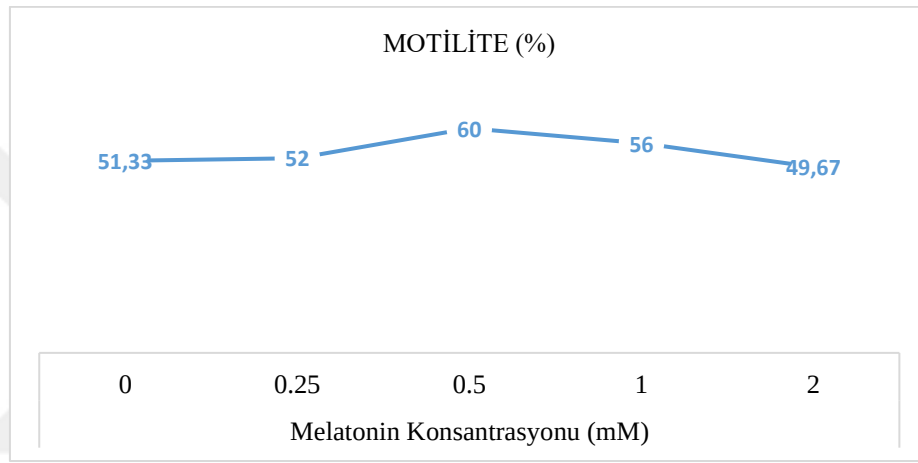
Resim 5. Erkek arı genital organ ve sperması



Resim 6. Erkek arı sperma alınması

3.3. Motilite Muayenesi

Motilitenin değerlendirilmesinde, ısıtma tablalı faz kontrast mikroskop kullanıldı. Mikroskobun görüntü sahasında fazla sayıda spermatozoon olacağından değerlendirmenin doğru bir şekilde yapılabilmesi için taze sperma 1:2 oranında serum fizyolojik ile sulandırıldı. Sulandırılmış spermanın üzerine lamel ile kapatıldıktan sonra x400 büyütmede incelendi ve yüzde (%) olarak ifade edildi (Taylor ve ark., 2009). Elde edilen bulgular Grafik 1’de sunuldu.



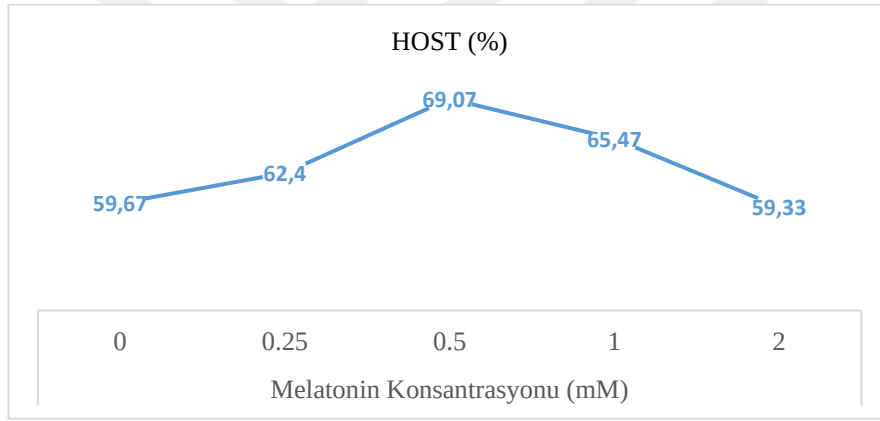
Grafik 1. Motilite

3.4. Plazma Membran Fonksiyonel Bütünlük Testi (HOST)

İlk olarak, 100 mOsm'lük sodyum sitrat-früktoz hipotonik solüsyonu, HOST için hazırlandı. Mikropipet kullanılarak taze veya eritilmiş 20 µl sperma, 1 ml HOST medyumuna bulunan tüplere aktarıldı. Ardından, 37°C'a ayarlı su banyosunda 1 saat bekletildikten sonra, HOST incelemeleri gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrasında lam üzerine bir damla örnek aktararak üzeri lamel ile kapatıldı ve 1000 büyütmede faz-kontrast mikroskopta incelendi. Her preparattan toplam 200 hücre sayılarak, kuyruk kısmı şişmiş hücrelerin yüzde değerleri kaydedildi (Alcay ve ark., 2019). Resim 7’de HOST incelemesi yapılmış arı sperması vardır. Grafik 2’de HOST değerleri vardır.



Resim 7. HOST (Plazma Membran Fonksiyonel Bütünlük Testi)

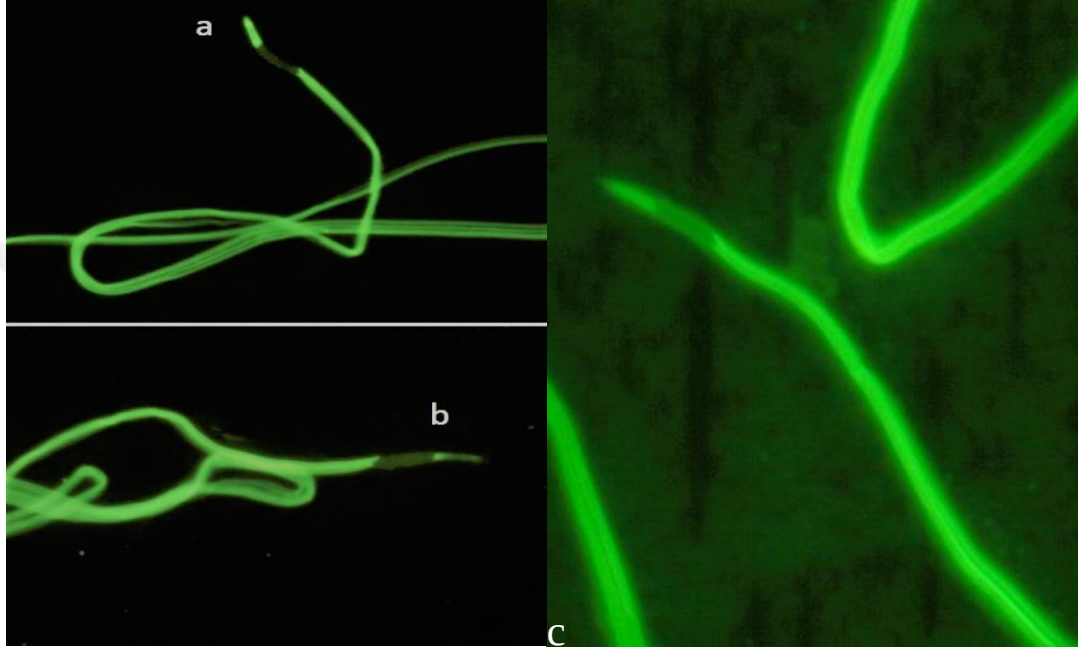


Grafik 2. HOST (Plazma Membran Fonksiyonel Bütünlük Testi)

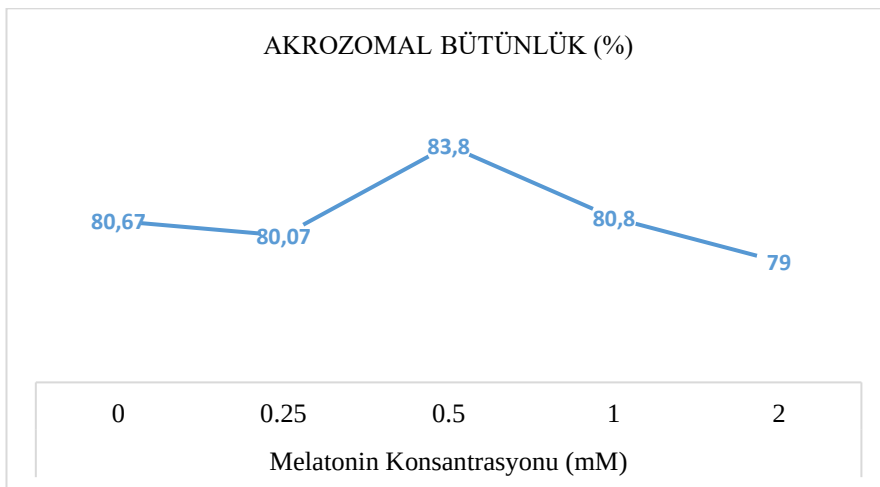
3.5. FITC-Pisum Sativum Agglutinin (FITC-PSA) ile Akrozomal Yapının Ortaya Konması

Akrozomal muayenede, 500 µl PBS içine 20 µl eritilmiş sperma eklenerek oluşturulan karışım, 10 dakika 2000 rpm'de santrifüj edildi. Oluşan süpernatantın uzaklaştırılmasından sonra, 250 µl PBS eklenerek karıştırıldı. Bu yıkama sıvısından alınan örneklerden froti çekildi ve havada kurutuldu. Kurutulan frotiler, 4°C sıcaklıkta aseton ile 10 dakika boyunca sabitlendikten sonra, karanlık ortamda 30 dakika süreyle FITC-PSA (50 µg/ml fosfat buffer solüsyonu) ile boyandı. Boyama işlemi sonrasında Fosfat Buffer solüsyonu ile yıkanıp gliserol ile kaplanarak, farklı floresan filtresine

sahip mikroskop (BX51, Olympus Inc, Japan) altında incelendi. Akrozomu tamamen yeşil görünen spermatozoitler sağlam kabul edildi. Her bir preparattan en az 100 spermatozoa incelenerek, sağlam akrozom yapısına sahip spermatozoa oranı yüzde olarak belirlendi (Alcay ve ark., 2019). Resim 8’de arı spermasının boyanmış örneği yer almaktadır. Grafik 3’te akrozomal bütünlük değerleri verilmektedir.



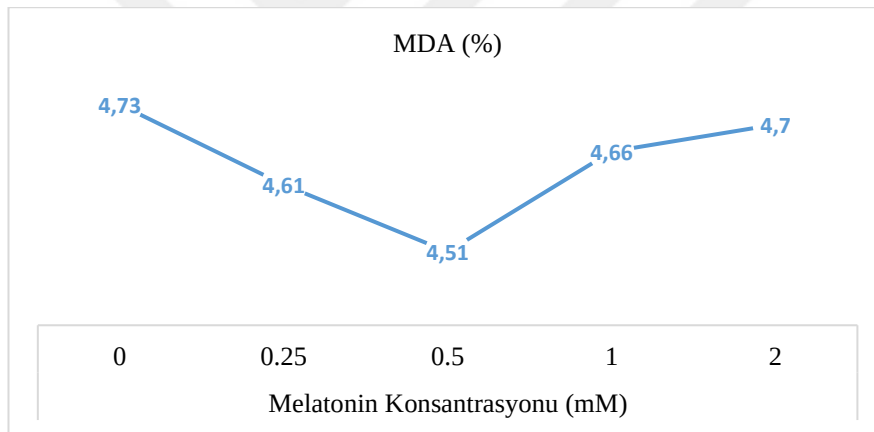
Resim 8. FITCH PSA boyalı arı sperması
a) ve c) Akrozomal bütünlüğe sahip sperma
b) Akrozomal bütünlüğü bozuk sperma



Grafik 3. Akrozomal Bütünlük

3.6. Malondialdehyde (MDA) Konsantrasyonu Tespiti

Tiyobarbitürik asit reaksiyon testi yapılarak, lipid peroksidasyon indikatörü olan MDA konsantrasyonları tespiti yapıldı (Esterbauer, & Cheeseman, 1990) Bu kapsamda, 1 mL sulandırılmış spermadan (250×10^6 spermatozoa/mL), proteinleri çöktürmek için 1 mL soğutulmuş % 20 trikloroasetik asitle karıştırıldı. Çözelti, santrifüj edilerek pellet haline getirildi (15 dakika ve $960 \times g$), ardından 1 mL süpernatant, 1 mL % 0,67 konsantrasyondaki tiyobarbitürik asit ile 100°C 'ta 10 dakika süreyle su banyosunda inkübe edildi. Soğutulan örneklerin absorbans değerleri, spektrofotometre aracılığıyla 532 nm değerinde ölçülerek nmol/mL olarak ifade edildi. Grafik 4'te MDA değerleri vardır.



Grafik 4. MDA

3.7. Spermanın Sulandırılarak Dondurulması

Çalışmada (Alcay ve ark., 2015) arı spermasını dondurmada kullandıkları tek aşamalı sulandırma prosedürü [100 mL distile su, Na-Sitrat 2,43g, NaHCO_3 0,21g, KCl 0,04 g, Amoksisilin 0,03 g ve DMSO % 10 (pH 8,1)] kullanıldı. Kontrol ve melatonin grupları aşağıda belirtildi (Tablo 1).

Tablo 1. Sulandırıcı Grupları

Grup	mMol
Kontrol	-
Melatonin (0,25) (Mel0,25)	0,25
Melatonin (0,5) (Mel0,5)	0,5
Melatonin (1) (Mel 1)	1
Melatonin (2) (Mel 2)	2

Daha önce pooling yapılan sperma (20 µL), bir sulandırıcı ile 1:9 oranında sulandırıldı; 1 saat içinde sıcaklık 5°C'ye düşürüldü ve sonrasında 5°C'de 2 saat süreyle ekilibrasyona bırakıldı. Ekilibrasyonun ardından, sperma 0,25 mL'lik farklı payetlere çekildi. Payet çekme işlemi her bir grup için payetin bir ucuna uygun gruba ait sulandırıcı (20 µL) çekildikten sonra yaklaşık 10 µL hava boşluğu bırakıldı. Daha sonra 50 µL sperma, tekrar hava ve sulandırıcı çekilerek farklı renklerde polivinilpirolidol (PVP) kapama tozları ile kapatıldı. Çekilen sperma, programlanabilir sperm-embriyo dondurma makinesi (Nicol plus PC- Air Liquide, Marne-la-Vallée Cedex 3, France) ile donduruldu.

3.8. Donmuş Spermanın Muayenesi

Her gruptan üçer payet, 30 sn süre ile 37°C de su içinde tutularak eritildi. Eritme sonrası spermada akrozomal bütünlük, motilite ve plazma membran fonksiyonel bütünlük değerlendirildi. Dondurma prosedürü her bir grup için 5 kez tekrarlandı.

3.9. İstatistiksel Analiz

Çalışma kapsamında elde edilen bütün veriler, SPSS (Windows için SPSS 23,0; SPSS, Chicago, IL, ABD) yazılımı ile analiz edildi ve elde edilen sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi. Veri setinin normal dağılıma uygunluğunu değerlendirmek için Shapiro-Wilk testi kullanıldı. Semen parametreleri, tek yönlü

varyans analizi (ANOVA) yöntemiyle değerlendirildi ve ardından Tukey testi kullanılarak gruplar arası karşılaştırmalar yapıldı. $P<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

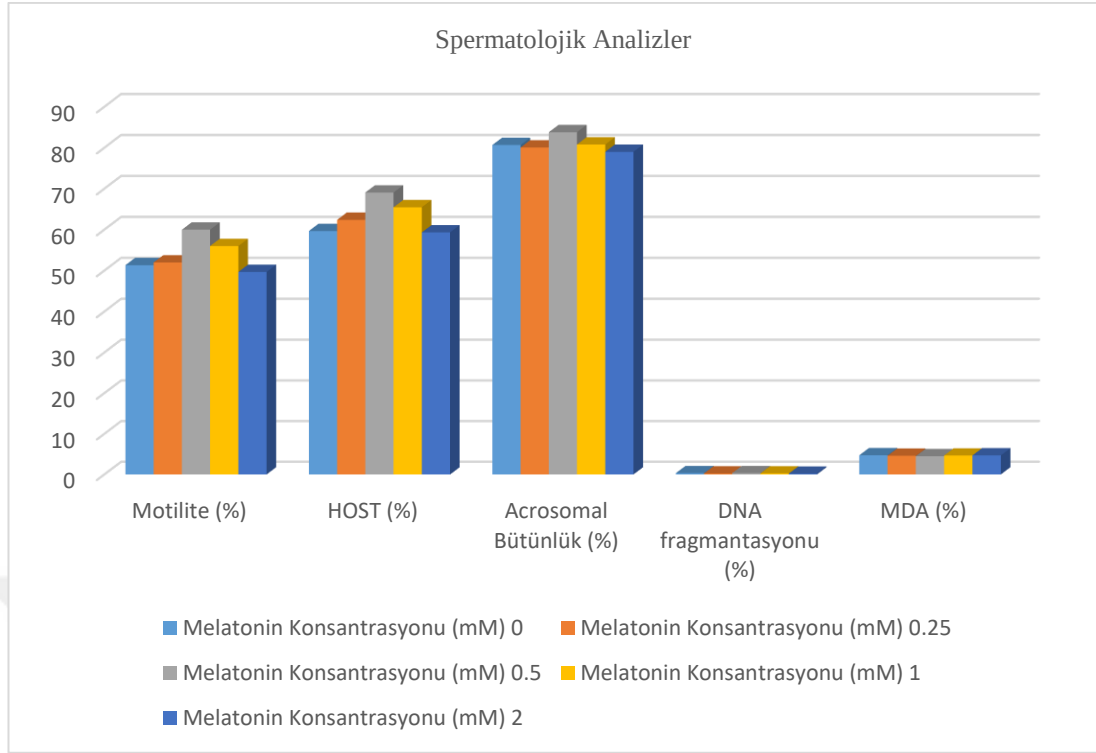
Çalışmamızda, pooling yapılmış taze semen örneklerinin motilite, plazma membranı fonksiyonel bütünlük, akrozom bütünlük ve DNA bütünlük oranları sırasıyla $89,00 \pm 1,24$, $91,20 \pm 1,17$, $93,00 \pm 1,08$ ve $99,50 \pm 0,58$ olarak tespit edildi. Taze sperma ile karşılaştırıldığında sperma kalitesinin kriyoprezervasyon işleminden olumsuz yönde etkilendiği görüldü ($P < 0,05$). Melatonin konsantrasyonlarının eritme işlemi sonrası spermatolojik parametreleri üzerindeki etkileri Tablo 2 ve Grafik 5'te gösterilmektedir. Çalışmadan elde edilen eritme sonrası motilite değerleri; Mel0,5 ve Mel1 gruplarında kontrol ve diğer melatonin gruplarına göre daha üstün bulunmuştur ($P < 0,05$). En yüksek motilite değeri Mel0,5 grubunda elde edilmiştir ($P < 0,05$). Plazma membran bütünlüğü bakımından değerlendirildiğinde Mel0,5 ve Mel1 grupları diğer gruplara göre membran bütünlüğünü daha iyi korumuştur ($P < 0,05$). Akrozomal bütünlük oranları Mel0,5 grubunda diğer konsantrasyon gruplarına göre daha üstün bulunmuştur ($P < 0,05$). Diğer melatonin grupları ve kontrol grupları arasında istatistiki bir fark bulunmamaktadır ($P > 0,05$). DNA fragmentasyon oranları ve MDA değerleri bakımından çalışma grupları arasında bir fark bulunmamaktadır ($P > 0,05$).

Tablo 2. Farklı sulandırıcı gruplarında çalışılan arı spermasının eritme sonrası parametrelerinin ortalaması.

	Melatonin Konsantrasyonu (mM)				
	0	0,25	0,5	1	2
Motilite (%)	$51,33 \pm 1,03^a$	$52,00 \pm 0,82^a$	$60,00 \pm 0,98^b$	$56,00 \pm 0,72^c$	$49,67 \pm 0,77^a$
HOST (%)	$59,67 \pm 1,02^a$	$62,40 \pm 0,74^a$	$69,07 \pm 0,89^b$	$65,47 \pm 0,39^b$	$59,33 \pm 0,93^a$
Acrosomal Bütünlük (%)	$80,67 \pm 0,83^a$	$80,07 \pm 0,54^a$	$83,80 \pm 0,42^b$	$80,80 \pm 0,52^a$	$79,00 \pm 0,94^a$
DNA fragmentasyonu (%)	$0,33 \pm 1,59$	$0,26 \pm 0,15$	$0,33 \pm 0,16$	$0,27 \pm 0,15$	$0,20 \pm 0,11$
MDA (%)	$4,73 \pm 0,86$	$4,61 \pm 0,74$	$4,51 \pm 0,80$	$4,66 \pm 0,82$	$4,70 \pm 0,77$

Veriler ortalama $\pm$ S.S. olarak verilmiştir.

Aynı sütun içindeki farklı harfler gruplar arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir ($P < 0,05$)



Grafik5. Spermatolojik Analizler

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Başarılı bir sperma kryopreservasyonu, istenildiği zaman genetik materyalden faydalanmaya ve genetik materyalin uzun sürede korunmasına olanak sağlar. Ancak dondurma ve eritme işleminin; buz kristallerinin oluşumu, lipid peroksidasyonu ve soğuk şoku gibi nedenlerle spermanın fertilizasyon yeteneğinde negatif etkilerinin olduğu bilinmektedir. Sperma sitoplazması, yetersiz bağışıklık sistemi ve antioksidan konsantrasyonunun düşük seviyede olması nedeniyle dondurma işlemi sırasında aşırı ROS üretimine ve ciddi oksidatif strese maruz kalmaya eğilimlidir (Gökçe, Alçay, & Gül, 2017; Yániz ve ark., 2013). Spermanın sitoplazmasında üretilen serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stres, spermanın fertilesini azaltmada önemli bir role sahiptir. Bu olumsuz etkiler, spermanın canlılığını, motilitesini, akrozom bütünlüğünü ve plazma membran bütünlüğünü azaltır. Yaptığımız bu çalışmada, melatoninin arı spermasının dondurma-eritme işlemleri sonrası plazma membran bütünlüğü, DNA bütünlüğü, akrozomal bütünlüğü ve motilite üzerindeki etkileri belirlenmiştir.

Arılarda semen hacmi yaş, mevsim ve vücut ağırlığına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Taze arı ejekülatında bulunan ortalama spermatozoon sayısı $2-9 \times 10^9/\mu\text{L}$ ve her bir erkek arıdan ortalama 0,1- 2,4 μL hacimde sperma toplanabildiği belirtilmektedir (Collins, & Pettis, 2001; Czekońska ve ark., 2013a, Czekońska ve ark., 2013b; Gençer, & Kahya, 2011; Kairo ve ark., 2016; Rhodes ve ark., 2011; Rousseau ve ark., 2015; Rousseau, & Giovenazzo, 2016; Schlüns ve ark., 2003).

Sunulan çalışmada birim hacimdeki spermatozoon sayısı ortalama $4 \times 10^9/\mu\text{L}$ ve semen hacmi ortalama 1,5 μL elde edilmiştir. Ayrıca pooling yapılan taze semen örneklerinin motilite, plazma membranı fonksiyonel bütünlük, akrozom bütünlük ve DNA bütünlük oranları sırasıyla $89,00 \pm 1,24$, $91,20 \pm 1,17$, $93,00 \pm 1,08$ ve $99,50 \pm 0,58$ bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar yapılmış olan çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur (Alçay ve ark., 2019; Ciereszko ve ark., 2017; Wegener ve ark., 2012, 2014a, 2014b; Yániz ve ark., 2019). Ancak erkek arılardan alınan semen örneklerinin pooling yapılmasının sperm canlılığı üzerindeki etkisi tartışmalıdır. Bazı çalışmalarda, bu uygulamanın sperma canlılığı üzerinde hiçbir etkisi olmadığı belirtilirken (Shafir ve ark., 2009; Tofilski ve ark., 2012) bazı çalışmalarda, pooling yapılmasının spermanın

canlılığı üzerinde olumsuz bir etkisi olduğu belirtilmiştir (Collins, & Donoghue, 1999; Den Boer ve ark., 2010).

Semen değerlendirme prosedürünün, pooling yapılmış ejakülatlardaki spermatozoa üzerinde bireysel ejakülatlara göre daha büyük bir fiziksel strese neden olduğunu belirtmiştir. Motilite spermanın fertilite ile ilgili temel kalite parametrelerinden biridir. Spermanın motilitesinin düşmesi, fertilizasyon yeteneğini olumsuz yönde etkilemektedir (Peng, Locke, Nasr, Liu, & Montague, 1990).

Tohumlama yapılan ana arılarda sperm motilitesi ile diğer sperma parametreleri arasında güçlü bir ilişki olduğunu ve spermateka'ya sperma geçişi için çok önemli olduğunu belirtmiştir (Wegener, & Bienefeld, 2012). Arılarda spermanın motilitesinin değerlendirilmesinde araştırmacılar tarafından iki farklı değerlendirme metodu kullanılmaktadırlar. Ancak son yıllarda % olarak ifade edilen yöntem kullanılmaktadır (Yániz ve ark., 2020). Çalışmamızda eritme sonrası motilite oranları Mel0.5 ve Mel1 gruplarında kontrol ve diğer melatonin gruplarına göre daha üstün bulundu. ($P<0,05$) ve motilite sonucu en yüksek Mel0,5 grubunda bulunmuştur. ($P<0,05$).

Farklı oranlarda BSA içeren TL HEPES bazlı sulandırıcının etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, eritme sonrası sperma motilitesinin en yüksek BSA5 grubundan (% 54,33) elde edildiği bildirilmiş. Arı sütünün eritme sonrası sperma kalitesi üzerine etkisinin çalışıldığı başka bir çalışmada ise motilite oranının % 1 arı sütü içeren grupta en yüksek olduğu (% 59) ifade edilmiştir. Alçay ve arkadaşlarının arı spermasının eritme sonrası spermatolojik parametreleri üzerine metiyonin ve sisteaminin etkilerini çalıştıkları başka bir çalışmada ise motilite oranları en yüksek % 61,33 elde edilmiştir (Alcay ve ark., 2021). Araştırmacıların yaptıkları çalışmalarda farklı sulandırıcılarla dondurulmuş arı spermalarının eritme sonrası motilite değerleri % 25 - % 62 arasında değişmektedir (Collins, 2003, 2004; Del Cacho, Marti, Josa, Quilez, & Sanchez-Acedo, 1996; Hopkins, Cobey, Herr, & Sheppard, 2017; Hopkins, & Herr, 2010; Pettis, Rice, Joselow, vanEngelsdorp, & Chaimanee, 2016; Rhodes ve ark., 2011; Tarpy, & Olivarez Jr, 2014; Taylor ve ark., 2009; Wegener ve ark., 2012; Zaitoun ve ark., 2009). Çalışmamız, eritme sonrası motilitenin, antioksidan içeren diğer çalışmaların bulgularıyla uyum içinde olduğunu göstermektedir.

Plazma membran bütünlüğü, bal arısında semen analizi için en yaygın olarak

değerlendirilen sperm kalite parametrelerinden biridir (Yániz ve ark., 2013). Plazma membran, spermanın metabolizması için gerekli olup, sperm sitozolünün fizyolojisinin korunmasında ve spermanın oosit füzyonunda önemli görevi vardır. Ancak soğuk şoku ve lipid peroksidasyonu membran geçirgenliğine zarar verir. Soğuk şoku, plazma membranı seçici geçirgenlik özelliğini kaybettikten sonra membran lipidlerinin faz geçişine neden olur. Dondurmada-eritme işlemi ve buna bağlı şekillenen ozmotik değişiklikler, tuz konsantrasyonlarını değiştirerek membran bütünlüğünü ve sperm homeostazını etkiler (Alcay ve ark., 2019). Ancak membranın akışkanlığının arttırılması ile soğuk şokuna karşı koruma sağlanması mümkün olabilmektedir. Sperm membranının fonksiyonel bütünlüğünde gerçekleşen küçük değişimleri görebilmek için HOST testi yapılır (Jeyendran, Van der Ven, Perez-Pelaez, Crabo, & Zaneveld, 1984). Çalışmamızda plazma membran bütünlüğü bakımından değerlendirildiğinde Mel0,5 ve Mel1 grupları diğer gruplara göre membran bütünlüğünü daha iyi korumuştur ($P<0,05$). Sperma sulandırıcılarına farklı oranlarda eklenen Shilajitin'in etkilerinin çalışıldığı çalışmada en yüksek HOST değerinin % 69.8 olduğu ifade edilmiştir (Özkök & Yalçın, 2022). Farklı kriyoprotektanların çalışıldığı başka bir çalışmada ise en yüksek HOST değeri % 84,35 elde edilmiştir (Loeza-Concha ve ark., 2019). L-karnitin'in arı spermasının üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada eritme sonrası plazma membran bütünlüğü değerlerinin en yüksek % 5 oranında L-karnitin içeren grupta olduğu bildirilmiştir. Arı spermasının dondurulmasında alabalık seminal plazmasının (ASP) çalışıldığı bir başka çalışmada ise ASP'nin membran bütünlüğünü başarılı bir şekilde koruduğu (% 72,07) belirtilmiştir. Eritme sonrası plazma membran bütünlüğünün çalışıldığı diğer çalışmalarda ise elde edilen değerler % 66-% 84 olduğu görülmüştür (Alcay ve ark., 2015, 2019; Auth, & Hopkins, 2021; Dadkhah ve ark., 2016; Gül, Şahinler, Onal, Hopkins, & Sheppard, 2017; Loeza-Concha ve ark., 2019; Özkök, & Yalçın, 2022). Çalışmamızdan elde edilen sonuçların belirtilen çalışmalar ile uyum içinde olduğu görülmüştür.

Akrozomal bozukluk kriyoprezervasyon işleminin istenmeyen etkilerinden biridir ve bu oranın düşük seviyelerde olması önemlidir (Nur ve ark., 2010; Ustuner ve ark., 2016). Kraliçe arı yumurtlaması sırasında, spermatekasından bırakılan birkaç spermatozoon, oosite penetrasyonunun gerçekleşebilmesi için akrozom reaksiyonunu

geçirmelidir. Bu nedenle, spermatozoanın fertilitesi için akrozomal bozukluk oranının düşük olması çok önemlidir. Çalışmamızda, akrozomal bütünlük oranları Mel0,5 grubunda diğer gruplara göre daha üstün bulunmuştur ($P<0,05$). Diğer melatonin grupları ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($P>0,05$). Bu sonuçlar, akrozomal bütünlüğün değerlendirildiği diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir ve Fitch-PSA boyama yöntemi kullanılmıştır (Alcay ve ark.,2015, 2019, 2021).

Spermanın DNA bütünlüğü hayati bir öneme sahiptir. DNA bütünlüğünün değerlendirilmesi, kriyopreservasyon işleminde zarar görmüş spermatozoanın en iyi şekilde tanımlanması için önem arz etmektedir (Nur ve ark., 2010). Embriyo gelişimi sağlıklı bir DNA'nın varlığına bağlı olduğundan, diğer sperm testleri arasında DNA bütünlüğünün değerlendirilmesi önemli kabul edilmektedir. Memelilerde donma-çözülme işleminden sonra, spermatozoa özellikle DNA hasarına karşı hassastır (Alcay ve ark., 2015; Ustuner ve ark., 2016). Ancak arı sperması memelilere göre kriyopreservasyon işlemine DNA bütünlüğü bakımından daha dayanıklıdır. Çalışmamızda DNA fragmentasyon oranları bakımından çalışma grupları arasında bir fark bulunmamaktadır ($P>0,05$). Jakob ve arkadaşlarının arı spermasının eritme sonrası DNA bütünlüğü üzerine yaptıkları çalışmada Tunel sonuçlarının % 3,7 oranında olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda elde edilen DNA bütünlüğü değerleri belirtilen çalışmadan daha yüksek, diğer çalışmalarla (Alcay ve ark., 2021,2022) ise benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Ana arılar yaşamları boyunca spermatozoayı spermatekalarında depolayabilme yeteneğine sahiptir (Gotoh ve ark., 2017). Bu süreçte ana arının vücudunda bulunan antioksidanların, ROS etkileşiminin neden olduğu zararlı etkilere karşı koruyucu etkilere sahip olduğu belirtilmiştir (Collins, Williams, & Evans, 2004). Arı sperması, enzimlerin fonksiyonlarını düzenleyen ve çeşitli metabolik aktiviteleri dengeleyen antioksidan enzimler ve proteinler içerir (Zareie, Eubel, Millar, & Baer, 2013). ROS üretimi, bal arılarının koloni dışında maruz kaldıkları olumsuz etkiler (polen, nektar ve çeşitli kimyasal ajanların oksidasyonu gibi) nedeniyle gerçekleşir. ROS oluşumuna neden olan zararlı etkinin düzeyine ve içeriğine göre hücredeki antioksidan düzeyi de değişmektedir (Korayem, Khodairy, Abdel-Aal, & El-Sonbaty, 2012). Ancak tüm bu iç denge, çeşitli patolojik etkilere bozulabilmektedir. Bu nedenle dışarıdan sentetik

antioksidanların kullanılması büyük önem arz etmektedir (Lobo, Patil, Phatak, & Chandra, 2010).

Spermaların kriyoprezervasyonu sırasında meydana gelen soğuk şok, farklı sulandırıcı içerikleri, kriyoprotektan maddeler, santrifüjleme gibi uygulamaların bal arısı spermatozoasını olumsuz etkilediği bildirilmiştir (Paillard, Rousseau, Giovenazzo, & Bailey, 2017; Taylor ve ark., 2009). Bal arılarında oksidatif strese neden olan kimyasal maddelere maruz kalındığında spermatozoonda lipid peroksidasyonunun son ürünü olan katalaz, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve MDA düzeylerinin arttığı bildirilmiştir (Abdelkader ve ark., 2019).

Kriyopreservasyon işlemi sırasında da donmuş spermanın antioksidan kapasitesi azalmaktadır. Ayrıca, spermanın sulandırma işlemleri, semendeki antioksidan bileşimlerini azaltabilir veya ortadan kaldırabilir. Buna bağlı olarak da oksidatif stresin artmasına neden olabilir (Alçay ve ark., 2019). Oksidatif hasar, hücrelerde çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunun anahtar ürünü olan MDA seviyeleri ile değerlendirilebilmektedir. Çalışmamızda antioksidan grupları arasında MDA düzeyleri açısından istatistiksel bir farklılık bulunmamaktadır ($P>0,05$). Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar Alçay ve arkadaşlarının MDA analiz sonuçları ile benzerlik göstermektedir (Alçay ve ark., 2019, 2021, 2022).

Sonuç olarak;

- Arı spermasının taze spermaya göre dondurma-çözdürme işlemlerinden olumsuz yönde etkilendiği,
- Sperma sulandırıcılara melatonin ilave edilmesinin spermatolojik parametreler üzerine olumlu etkiler yaptığı,
- Eritme sonrası en yüksek motilite değerinin Mel0,5 grubunda elde edildiği,
- Plazma membran bütünlüğü bakımından değerlendirildiğinde Mel0,5 ve Mel1 gruplarının daha başarılı olduğu,
- Akrozomal bütünlük oranları Mel0,5 grubunda diğer gruplara göre daha üstün olduğu,
- DNA fragmentasyon oranları ve MDA değerleri bakımından ise çalışma grupları arasında bir fark olmadığı saptandı.

6. KAYNAKLAR

- Abdelkader, F. Ben, Kairo, G., Bonnet, M., Barbouche, N., Belzunces, L. P., & Brunet, J. L. (2019). Effects of clothianidin on antioxidant enzyme activities and malondialdehyde level in honey bee drone semen. *Journal of Apicultural Research*, 58(5), 740-745. <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1655182>
- Abdelkader, F. Ben, Kairo, G., Tchamitchian, S., Cousin, M., Senechal, J., Crauser, D., ... Brunet, J. L. (2014). Semen quality of honey bee drones maintained from emergence to sexual maturity under laboratory, semi-field and field conditions. *Apidologie*, 45(2), 215-223. <https://doi.org/10.1007/s13592-013-0240-7>
- Agarwal, A., Prabakaran, S. A., & Said, T. M. (2005). Prevention of oxidative stress injury to sperm. *Journal Of Andrology*, 26(6), 654-660. <https://doi.org/10.2164/jandrol.05016>
- Aisen, E. G., Alvarez, H. L., Venturino, A., & Garde, J. J. (2000). Effect of trehalose and edta on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology*, 53(5), 1053-1061. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00251-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00251-X)
- Alcay, S., Cakmak, S., Cakmak, I., Aktar, A., Yilmaz, M., Ustuner, B., ... Nur, Z. (2021). L-Carnitine Supplemented Extenders Improve Post-Thawing Quality of Honey Bee Drone (*Apis mellifera*) Spermatozoa. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 27(4), 489-493. <https://doi.org/10.9775/KVFD.2021.25756>
- Alcay, S., Cakmak, S., Cakmak, I., Aktar, A., Yilmaz, M., Ustuner, B., ... Nur, Z. (2022). Honey bee drone (*Apis mellifera*) sperm cryopreservation with rainbow trout seminal plasma supplemented extenders. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 73(1), 3751-3756. <https://doi.org/10.12681/jhvms.25651>
- Alcay, S., Cakmak, S., Cakmak, I., Mulkpınar, E., Gokce, E., Ustuner, B., ... Nur, Z. (2019). Successful cryopreservation of honey bee drone spermatozoa with royal jelly supplemented extenders. *Cryobiology*, 87, 28-31. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.03.005>
- Alcay, S., Üstüner, B., Çakmak, İ., Çakmak, S., & Nur, Z. (2015). Farklı kriyoprotektanların eritme sonrası arı sperm kalitesi üzerine etkileri. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 21(1), 31-35. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2014.11515>
- Ashrafi, I., Kohram, H., & Ardabili, F. F. (2013). Antioxidative effects of melatonin on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved bull spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 139(1-4), 25-30. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.03.016>
- Atasoy, Ö. B., Erbaş, O., Üniversitesi, İ. B., Fakültesi, T., & Dalı, F. A. (2017). Melatonin hormonunun fizyolojik etkileri. *Istanbul Bilim University Florence Nightingale Journal of Medicine*, 3(1), 52-62. <https://doi.org/10.5606/fng.btd.2017.011>
- Auth, C. A., & Hopkins, B. K. (2021). Nitrogen vapor immersion: An accessible alternative for honey bee (*Apis mellifera* L.) semen cryopreservation. *Cryobiology*, 100, 12-18. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.04.006>

- Baer, B. (2005). Sexual selection in Apis bees. *Apidologie*, 36(2), 187-200. <https://doi.org/10.1051/apido:2005013>
- Baer, B., Heazlewood, J. L., Taylor, N. L., Eubel, H., & Millar, A. H. (2009). The seminal fluid proteome of the honeybee *Apis mellifera*. *Proteomics*, 9(8), 2085-2097. <https://doi.org/10.1002/PMIC.200800708>
- Barrier Battut, I., Kempfer, A., Becker, J., Lebailly, L., Camugli, S., & Chevrier, L. (2016). Development of a new fertility prediction model for stallion semen, including flow cytometry. *Theriogenology*, 86(4), 1111-1131. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.001>
- Beconi, M. T., Affranchino, M. A., Schang, L. M., & Beorlegui, N. B. (1991). Influence of antioxidants on SOD activity in bovine sperm. *Biochemistry International*, 23(3), 545-553. Erişim adresi: <https://europepmc.org/article/med/1877992>
- Beyer, C. E., Steketee, J. D., & Saphier, D. (1998). Antioxidant properties of melatonin—an emerging mystery. *Biochemical pharmacology*, 56(10), 1265-1272. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(98\)00180-4](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(98)00180-4)
- Bieńkowska, M., Panasiuk, B., Węgrzynowicz, P., & Gerula, D. (2011). The effect of different thermal conditions on drone semen quality and number of spermatozoa entering the spermatheca of queen bee. *Journal of Apiculture Science*, 55(2), 161-168.
Erişim adresi: <https://www.researchgate.net/publication/258840720>
- Billiet, A., Meeus, I., Van Nieuwerburgh, F., Deforce, D., Wäckers, F., & Smagghe, G. (2016). Impact of sugar syrup and pollen diet on the bacterial diversity in the gut of indoor-reared bumblebees (*Bombus terrestris*). *Apidologie*, 47(4), 548-560. <https://doi.org/10.1007/s13592-015-0399-1>
- Bilodeau, J.-F., Blanchette, S., Gagnon, I. C., & Sirard, M.-A. (2001). Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, 56(2), 275-286. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00562-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00562-3)
- Bilodeau, J. F., Chatterjee, S., Sirard, M. A., & Gagnon, C. (2000). Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Molecular Reproduction and Development*, 55(3), 282-288. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(200003\)55:3<282::AID-MRD6>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(200003)55:3<282::AID-MRD6>3.0.CO;2-7)
- Boes, K. E. (2010). Honeybee colony drone production and maintenance in accordance with environmental factors: an interplay of queen and worker decisions. *Insectes sociaux*, 57, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s00040-009-0046-9>
- Borsuk, G., Kozłowska, M., Anusiewicz, M., & Olszewski, K. (2018). A scientific note on Dna fragmentation rates in sperm collected from drones and spermathecae of queens of different age, with possible implications on the scattered brood phenomenon. *Apidologie*, 49(6), 803-806. <https://doi.org/10.1007/s13592-018-0603-1>
- Borsuk, G., Kozłowska, M., Anusiewicz, M., & Paleolog, J. (2018). Nosema ceranae changes semen characteristics and damages sperm DNA in honeybee

- drones. *Invertebrate Survival Journal*, 15(1), 197-202.
<https://doi.org/10.25431/1824-307X/isj.v15i1.197-202>
- Burley, L. M., Fell, R. D., & Saacke, R. G. (2008). Survival of Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Spermatozoa Incubated at Room Temperature from Drones Exposed to Miticides. *Journal of Economic Entomology*, 101(4), 1081-1087. <https://doi.org/10.1093/JEE/101.4.1081>
- Burucu, V. (2023). Ürün raporu arıcılık 2023. Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü. Erişim adresi:
https://scholar.google.com/scholar?hl=tr&as_sdt=0%2C5&q=Food+and+Agric+ulture+Organization+of+The+United+Nations+2012&btnG=
- Ceylan, A., Özgenç, Ö., Erhan, F., Sevin, S., & Yarsan, E. (2020). Nosemosis'in (nosematosis) bal arısı (*Apis mellifera*) midesine etkileri üzerine histokimyasal gözlemler. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, 91(2), 98-103. <https://doi.org/10.33188/Vetheder.707968>
- Chaimanee, V., Evans, J. D., Chen, Y., Jackson, C., & Pettis, J. S. (2016). Sperm viability and gene expression in honey bee queens (*Apis mellifera*) following exposure to the neonicotinoid insecticide imidacloprid and the organophosphate acaricide coumaphos. *Journal of Insect Physiology*, 89, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.03.004>
- Chatterjee, S., De Lamirande, E., & Gagnon, C. (2001). Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: Protection by oxidized glutathione. *Molecular Reproduction and Development*, 60(4), 498-506. <https://doi.org/10.1002/mrd.1115>
- Chatterjee, S., & Gagnon, C. (2001). Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Molecular Reproduction and Development*, 59(4), 451-458. <https://doi.org/10.1002/mrd.1052>
- Chaudhary, S. C., Aeksiri, N., Wanangkarn, A., Liao, Y. J., & Inyawilert, W. (2021). Effects of Melatonin on Cryopreserved Semen Parameters and Apoptosis of Thai Swamp Buffalo Bull (*Bubalus bubalis*) in Different Thawing Conditions. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 9(2), 238-245. <https://doi.org/10.17582/Journal.Aavs/2021/9.2.238.245>
- Chen, X. J., Zhang, Y., Jia, G. X., Meng, Q. G., Bunch, T. D., Liu, G. S., ... Zhou, G. B. (2016). Effect of melatonin supplementation on cryopreserved sperm quality in mouse. *Cryoletters*, 37(2), 115-122. Erişim adresi:
<https://www.ingentaconnect.com/content/cryo/cryo/2016/00000037/00000002/art00006>
- Chen, Y. P., Evans, J. D., Murphy, C., Gutell, R., Zuker, M., Gundensen-Rindal, D., & Pettis, J. S. (2009). Morphological, molecular, and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from the European honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 56(2), 142-147. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2008.00374.x>
- Ciereszko, A., Wilde, J., Dietrich, G. J., Siuda, M., Bąk, B., Judycka, S., & Karol, H. (2017). Sperm parameters of honeybee drones exposed to imidacloprid. *Apidologie*, 48(2), 211-222. <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0466-2>

- Cobey, S. W., & Schley, P. (2002). Innovations in instrumental insemination. *American Bee Journal*, 142(6), 433-436. Erişim adresi: https://scholar.google.com/scholar?hl=tr&as_sdt=0%2C5&q=Innovations+in+instrumental+insemination.+American+Bee+Journal%2C&btnG=
- Cobey, S. W. (2007). Comparison studies of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee queens and factors affecting their performance. *Apidologie*, 38(4), 390-410. <https://doi.org/10.1051/apido:2007029>
- Cobey, S. W., Tarpy, D. R., & Woyke, J. (2013). Standard methods for instrumental insemination of *Apis mellifera* queens. *Journal of Apicultural Research*, 52(4), 1-18. <https://doi.org/10.3896/ibra.1.52.4.09>
- Collins, A. M. (2003). A scientific note on the effect of centrifugation on pooled honey bee semen. *Apidologie*, 34(5), 469-470. <https://doi.org/10.1051/apido:2003030>
- Collins, A. M. (2004). Sources of variation in the viability of honey bee, *apis mellifera* l., semen collected for artificial insemination. *Invertebrate Reproduction and Development*, 45(3), 231-237. <https://doi.org/10.1080/07924259.2004.9652594>
- Collins, A. M., & Donoghue, A. M. (1999). Viability assessment of honey bee, *Apis mellifera*, sperm using dual fluorescent staining. *Theriogenology*, 51(8), 1513-1523. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00094-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00094-1)
- Collins, A. M., & Pettis, J. S. (2001). Effect of varroa infestation on semen quality. *American Bee Journal*, 141(8), 590. Erişim adresi : <https://www.ars.usda.gov/research/publications/publication/?seqNo115=118617>
- Collins, A. M., Williams, V., & Evans, J. D. (2004). Sperm storage and antioxidative enzyme expression in the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, 13(2), 141-146. <https://doi.org/10.1111/j.0962-1075.2004.00469.x>
- Cosme, P., Rodríguez, A. B., Garrido, M., & Espino, J. (2022). Coping with Oxidative Stress in Reproductive Pathophysiology and Assisted Reproduction: Melatonin as an Emerging Therapeutical Tool. *Antioxidants* 2023, Vol. 12, Page 86, 12(1), 86. <https://doi.org/10.3390/Antiox12010086>
- Cruz, M. H. C., Leal, C. L. V., da Cruz, J. F., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2014). Role of melatonin on production and preservation of gametes and embryos: a brief review. *Animal Reproduction Science*, 145(3-4), 150-160. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.01.011>
- Curry, M. R., Kleinhans, F. W., & Watson, P. F. (2000). Measurement of the water permeability of the membranes of boar, ram, and rabbit spermatozoa using concentration-dependent self-quenching of an entrapped fluorophore. *Cryobiology*, 41(2), 167-173. <https://doi.org/10.1006/cryo.2000.2277>
- Czekońska, K., Chuda-Mickiewicz, B., & Chorbiński, P. (2013a). The effect of brood incubation temperature on the reproductive value of honey bee (*Apis mellifera*) drones. *Journal of Apicultural Research*, 52(2), 96-105. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.2.19>
- Czekońska, K., Chuda-Mickiewicz, B., & Chorbiński, P. (2013b). The influence of honey bee (*Apis Mellifera*) drone age on volume of semen and viability of spermatozoa. *Journal of Apicultural Science*, 57(1), 61-66. <https://doi.org/10.2478/jas-2013-0007>

- Czekońska, K., Chuda-Mickiewicz, B., & Samborski, J. (2015). Quality of honeybee drones reared in colonies with limited and unlimited access to pollen. *Apidologie*, 46(1), 1-9. <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0296-z>
- Czekońska, K., Szentgyörgyi, H., & Tofilski, A. (2019). Body mass but not wing size or symmetry correlates with life span of honey bee drones. *Bulletin of Entomological Research*, 109(3), 383-389. <https://doi.org/10.1017/S0007485318000664>
- Çakmak, İ. (2012). Bal arısı koloni kayıpları ve çözüm yolları. *Ordu Arıcılık Araştırma Dergisi* 4(7), 3-8. Erişim adresi: https://scholar.google.com/scholar?hl=tr&as_sdt=0%2C5&q=%C3%87akmak%2C+%C4%B0.++2012. +%E2%80%9CBal+ar%C4%B1s%C4%B1+koloni+kay%C4%B1plar%C4%B1+ve+%C3%A7%C3%B6z%C3%BCm+yollar%C4%B1&btnG=
- Çakmak, İ., Fuchs, S., Çakmak, S. S., Koca, A. Ö., Nentchev, P., & Kandemir, İ. (2014). Morphometric analysis of honeybees distributed in northern Turkey along the Black Sea coast. *Uludağ Bee Journal*, 14, 59-68. Erişim adresi: https://www.researchgate.net/profile/Stefan-Fuchs-2/publication/291520376_Morphometric_analysis_of_honeybees_distributed_in_northern_Turkey_along_the_Black_Sea_coast_Turkiye'nin_Kuzeyinde_Karadeniz_Kiyisi_Boyunca_Dagilis_Gosteren_Balarilarinin_Morfometrik_Analizi/links/56a3944e08aeef24c589a7dd/Morphometric-analysis-of-honeybees-distributed-in-northern-Turkey-along-the-Black-Sea-coast-Tuerkiyenin-Kuzeyinde-Karadeniz-Kiyisi-Boyunca-Dagilis-Goesteren-Balarilarinin-Mor-fometrik-Analizi.pdf
- Çoyan, K., Ataman, M. B., Kaya, A., & Karaca, F. (2002). *Evcil Hayvanlarda Dölerme Ve Suni Tohumlama*. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayın Ünitesi. Erişim adresi: https://scholar.google.com/scholar?hl=tr&as_sdt=0%2C5&q=%C3%87OYAN+K.+Evcil+hayvanlarda+d%C3%B6lerme+ve+suni+tohumlama%2C+Sel%C3%A7uk+%C3%9Cniversitesi+Veteriner+Fak%C3%BCltesi+%C3%9Cnitesi%2C+Konya&btnG=
- Dadkhah, F., Nehzati-Paghaleh, G., Zhandi, M., Emamverdi, M., & Hopkins, B. K. (2016). Preservación de espermatozoides de la abeja de la miel usando extensores de semen basados en la yema de huevo y la lecitina de soja y un protocolo de criopreservación modificado. *Journal of Apicultural Research*, 55(4), 279-283. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1243292>
- Darin-Bennett, A., Poulos, A., & White, I. G. (1973). The Effect of Cold Shock and Freeze-Thawing on Release of Phospholipids by Ram, Bull, and Boar Spermatozoa. *Australian Journal of Biological Sciences*, 26(6), 1409-1420. <https://doi.org/10.1071/BI9731409>
- De Guzman, L. I., Lancaster, V. A., Delatte, G. T., & Stelzer, J. A. (1999). Varroa in the mating yard. I. The effects of Varroa jacobsoni and apistan on drone honey bees. *American Bee Journal*, 139(2), 134-139

- De la Rúa, P., Jaffé, R., Dall'Olio, R., Muñoz, I., & Serrano, J. (2009). Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees. *Apidologie*, 40(3), 263-284. <https://doi.org/10.1051/apido/2009027>
- Del Cacho, E., Marti, J. I., Josa, A., Quilez, J., & Sanchez-Acedo, C. (1996). Effect of *Varroa jacobsoni* parasitization in the glycoprotein expression on *Apis mellifera* spermatozoa. *Apidologie*, 27(2), 87-92. Erişim adresi: https://scholar.google.com.tr/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=DelCacho%2C+E.%3B+Marti%2C+J.I.%3B+Josa%2C+A.%3B+Quilez%2C+J.%3B+Sanc hez-Acedo%2C+C.+Effect+of+Varroa+jacobsoni+parasitization+in+the+glycoprotein+expression+on+Apis+mellifera+spermatozoa.+Apidologie+1996%2C+27%2C+87%E2%80%9392.&btnG=
- Den Boer, S. P. A., Baer, B., & Boomsma, J. J. (2010). Seminal fluid mediates ejaculate competition in social insects. *Science*, 327(5972), 1506-1509. <https://doi.org/10.1126/science.1184709>
- Divar, M. R., Azari, M., Mogheiseh, A., & Ghahramani, S. (2022). Supplementation of melatonin to cooling and freezing extenders improves canine spermatozoa quality measures. *BMC Veterinary Research*, 18(1), 1-16. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03186-8>
- Dolník, M., Mudroňová, D., Pošivák, J., Lazar, G., & Mudroň, P. (2019). Flow cytometry in assessment of sperm integrity and functionality – A review. *Acta Veterinaria Brno*, 88(2), 169-175. <https://doi.org/10.2754/avb201988020169>
- Donnelly, E. T., McClure, N., & Lewis, S. E. M. (2000). Glutathione and hypotaurine in vitro: effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. *Mutagenesis*, 15(1), 61-68. <https://doi.org/10.1093/Mutage/15.1.61>
- Duay, P., De Jong, D., & Engels, W. (2002). Decreased flight performance and sperm production in drones of the honey bee (*Apis mellifera*) slightly infested by *Varroa destructor* mites during pupal development. *Genetics and Molecular Research*, 1(3), 227-232. Erişim adresi : <http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2002/vol3-1/pdf/gmr0043.pdf>
- Duman M. (2022). *Bal Arısı (Apis mellifera L.) Yetiştiriciliği*, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü Arıcılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü.
- El-Raey, M., Badr, M. R., Rawash, Z. M., & Darwish, G. M. (2014). Evidences for the role of melatonin as a protective additive during buffalo semen freezing. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 9(4), 252-262. Erişim adresi: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20153137877>
- Esterbauer, H., & Cheeseman, K. H. (1990). [42] Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*, 186(C), 407-421. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86134-H](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86134-H)
- Fadl, A. M., Ghallab, A. R. M., Abou-Ahmed, M. M., & Moawad, A. R. (2021). Melatonin can improve viability and functional integrity of cooled and frozen/thawed rabbit spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 56(1), 103-111. <https://doi.org/10.1111/rda.13853>

- Fiser, P. S., Ainsworth, L., & Fairfull, R. W. (1987). Evaluation of a new diluent and different processing procedures for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, 28(5), 599-607. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(87\)90276-7](https://doi.org/10.1016/0093-691X(87)90276-7)
- Fiser, P. S., Hansen, C., Underhill, L., & Marcus, G. J. (1991). New thermal stress test to assess the viability of cryopreserved boar sperm. *Cryobiology*, 28(5), 454-459. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(91\)90054-R](https://doi.org/10.1016/0011-2240(91)90054-R)
- Fisher, A., Harrison, K., Love, C., Varner, D., & Rangel, J. (2018). Spatio-temporal variation in viability of spermatozoa of Honey Bee, *Apis mellifera*1, drones in central Texas apiaries. *Southwestern Entomologist*, 43(2), 343-356. <https://doi.org/10.3958/059.043.0206>
- Genç, F. (1990). Bal arılarında koloni performansını etkileyen faktörler. *Teknik Arıcılık*, 27, 18-26. Erişim adresi: https://scholar.google.com/scholar?hl=tr&as_sdt=0%2C5&q=Gen%C3%A7%2C+F.%2C+1990.+%E2%80%9CBalar%C4%B1lar%C4%B1nda+koloni+performans%C4%B1n%C4%B1+etkileyen+fakt%C3%B6rler%E2%80%9D%2C+Teknik+Ar%C4%B1c%C4%B1l%C4%B1k%2C+27%2C+18%E2%80%9326.&btnG=
- Gençer, H. V., & Firatlı, Ç. (2005). Reproductive and morphological comparisons of drones reared in queenright and laying worker colonies. *Journal of Apicultural Research*, 44(4), 163-167. <https://doi.org/10.1080/00218839.2005.11101172>
- Gençer, H. V., & Kahya, Y. (2011). Are sperm traits of drones (*Apis mellifera* L.) from laying worker colonies noteworthy? *Journal of Apicultural Research*, 50(2), 130-137. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.50.2.04>
- Gençer, H. V., Kahya, Y., & Woyke, J. (2014). Why the viability of spermatozoa diminishes in the honeybee (*Apis mellifera*) within short time during natural mating and preparation for instrumental insemination. *Apidologie*, 45(6), 757-770. <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0295-0>
- Gillan, L., Evans, G., & Maxwell, W. M. C. (2005). Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, 63(2), 445-457. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.024>
- Giray, T., Çakmak, İ., Aydın, L., Kandemir, İ., İnci, A., Oskay, D., ... Kence, A. (2007). Preliminary Survey Results On 2006–2007 Colony Losses In Turkey. *Uludağ Arıcılık Dergisi* 7, 101-107. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/143525>
- Goodvin, M., & Eaton, V. C. (2001). *Control of Varroa: A guide for New Zealand Beekeepers*. New Zealand Ministry of Agriculture and Forestry, Wellington, Erişim adresi: <https://homepage.ntlworld.com/gandboss/BeeginnersFAQ/Problems/control-of-varroa-guide.pdf>.
- Gotoh, A., Shigenobu, S., Yamaguchi, K., Kobayashi, S., Ito, F., & Tsuji, K. (2017). Transcriptome profiling of the spermatheca identifies genes potentially involved in the long-term sperm storage of ant queens. *Scientific Reports*, 7(1), 5972. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05818-8>

- Gökçe, E., Alçay, S., & Gül, Z. (2017). Positive effect of BSA supplemented soybean lecithin based extender on liquid storage of ram semen at 5°C. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 64(4), 313-320. https://doi.org/10.1501/vetfak_0000002815
- Greeff, M., & Schmid-Hempel, P. (2008). Sperm viability in the male accessory testes and female spermathecae of the bumblebee *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). *European Journal of Entomology*, 105(5), 849-859. Erişim adresi: <https://www.eje.cz/artkey/eje-200805-0007.php>
- Grötter, L. G., Cattaneo, L., Marini, P. E., Kjelland, M. E., & Ferré, L. B. (2019). Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(4), 655-665. <https://doi.org/10.1111/rda.13409>
- Gül, A., Şahinler, N., Onal, A. G., Hopkins, B. K., & Sheppard, W. S. (2017). Effects of diluents and plasma on honey bee (*Apis mellifera* L.) drone frozen-thawed semen fertility. *Theriogenology*, 101, 109-113. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.06.020>
- Güler, A. (2006). Bal Arıları (*Apis mellifera* L.)'nda Yapay Tohumlama Ve Türkiye İçin Önemi. *Anadolu Journal of Agricultural Sciences*, 21(3), 370-378. <https://doi.org/10.7161/Anajas.2006.21.3.370-378>
- Hafez, E. S. E., & Hafez, B. (Eds.). (2013). *Reproduction in farm animals*. John Wiley & Sons. Erişim adresi: https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=BzqQDQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP2&dq=Reproduction+in+farm+animals.+John+Wiley+%26+Sons.&ots=Hh7WejGzjU&sig=zUEAcqa_lu8bcf40mhsKJsEHYBI&redir_esc=y#v=onepage&q=Reproduction%20in%20farm%20animals.%20John%20Wiley%20%26%20Sons.&f=false
- Hayashi, S., & Satoh, T. (2019). Sperm maturation process occurs in the seminal vesicle following sperm transition from testis in honey bee males. *Apidologie*, 50(3), 369-378. <https://doi.org/10.1007/s13592-019-00652-5>
- Hellmich, R. L., & Waller, G. D. (1990). Preparing for Africanized honey bees: evaluating control in mating apiaries. *American Bee Journal*, 130(8), 537-542. Erişim adresi: <https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/60500500/Pdf/files/201-300/237-Hellmich--Preparing%20for%20Africanized%20Honey.pdf>
- Hellmich, R. L., Collins, A. M., Danka, R. G., & Rinderer, T. E. (1988). Influencing Matings of European Honey Bee Queens in Areas with Africanized Honey Bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, 81(3), 796-799. <https://doi.org/10.1093/JEE/81.3.796>
- Holt, W. V. (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53(1), 47-58. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00239-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00239-3)
- Hopkins, B. K., Cobey, S. W., Herr, C., & Sheppard, W. S. (2017). Gel-coated tubes extend above-freezing storage of honey bee (*Apis mellifera*) semen to 439 days with production of fertilised offspring. *Reproduction, Fertility and Development*, 29(10), 1944-1949. <https://doi.org/10.1071/RD16087>

- Hopkins, B. K., & Herr, C. (2010). Factors affecting the successful cryopreservation of honey bee (*Apis mellifera*) spermatozoa. *Apidologie* 41(5), 548-556. <https://doi.org/10.1051/Apido/20010006.PDF>
- Hopkins, B. K., Herr, C., & Sheppard, W. S. (2012). Sequential generations of honey bee (*Apis mellifera*) queens produced using cryopreserved semen. *Reproduction, Fertility and Development*, 24(8), 1079-1083. <https://doi.org/10.1071/RD11088>
- Inouri-Iskounen, A., Sadeddine-Zennouche, O., Nait Mouloud, M., Kebieche, M., & Iguer-Ouada, M. (2020). In vitro effects of imidacloprid on honey bee sperm: evaluation using computer-aided sperm analysis (CASA). *Journal of Apicultural Research*, 59(4), 343-349. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1775017>
- Inyawilert, W., Rungruangsak, J., Liao, Y. J., Tang, P. C., & Paungsukpaibool, V. (2021). Melatonin supplementation improved cryopreserved Thai swamp buffalo semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 56(1), 83-88. <https://doi.org/10.1111/rda.13851>
- Jaycox, E. R. (1961). The Effects of Various Foods and Temperatures on Sexual Maturity of the Drone Honey Bee (*Apis mellifera*). *Annals of the Entomological Society of America*, 54(4), 519-523. <https://doi.org/10.1093/Aesa/54.4.519>
- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., & Elbert, A. (2011). Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(7), 2897-2908. https://doi.org/10.1021/Jf101303g/Asset/Images/Medium/Jf-2010_01303g_0011.Gif
- Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. G., & Zaneveld, L. J. D. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Reproduction*, 70(1), 219-228. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0700219>
- Johnson, R. M., Dahlgren, L., Siegfried, B. D., & Ellis, M. D. (2013). Effect of in-hive miticides on drone honey bee survival and sperm viability. *Journal of Apicultural Research*, 52(2), 88-95. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.2.18>
- Jones, R., Mann, T., & Sherins, R. (1979). Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertility and Sterility*, 31(5), 531-537. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)43999-3](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)43999-3)
- Kaftanoglu, O., & Peng, Y. S. (1984). Preservation of honeybee spermatozoa in Liquid Nitrogen. *Journal of Apicultural Research*, 23(3), 157-163. <https://doi.org/10.1080/00218839.1984.11100625>
- Kairo, G., Provost, B., Tchamitchian, S., Ben Abdelkader, F., Bonnet, M., Cousin, M., ... & Brunet, J. L. (2016). Drone exposure to the systemic insecticide Fipronil indirectly impairs queen reproductive potential. *Scientific Reports*, 6(1), 31904. <https://doi.org/10.1038/srep31904>
- Karimfar, M. H., Niazvand, F., Haghani, K., Ghafourian, S., Shirazi, R., & Bakhtiyari, S. (2015). The protective effects of melatonin against cryopreservation-induced oxidative stress in human sperm. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 28(1), 69-76. <https://doi.org/10.1177/0394632015572080>

- King, M., Eubel, H., Millar, A. H., & Baer, B. (2011). Proteins within the seminal fluid are crucial to keep sperm viable in the honeybee *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology*, 57(3), 409-414. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.12.011>
- Koeniger, G., Koeniger, N., Tingek, S., & Phiancharoen, M. (2005). Variance in spermatozoa number among *Apis dorsata* drones and among *Apis mellifera* drones. *Apidologie*, 36(2), 279-284. <https://doi.org/10.1051/apido:2005009>
- Kopeika, J., Thornhill, A., & Khalaf, Y. (2015). The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: Principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. *Human Reproduction Update*, 21(2), 209-227. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmu063>
- Korayem, A. M., Khodairy, M. M., Abdel-Aal, A.-A. A., & El-Sonbaty, A. A. M. (2012). The protective strategy of antioxidant enzymes against hydrogen peroxide in honey bee, *Apis mellifera* during two different seasons. *Journal of Biology and Earth Sciences*, 201(2), 93-94. Erişim adresi: <http://www.journals.tmkarpinski.com/index.php/jbes>
- Köse, K. (2004). Melatonin: Karanlığın antioksidan gücü [Melatonin: the antioxidant power of darkness]. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 13 (2), 56-65. Erişim adresi: https://scholar.google.com/scholar?hl=tr&as_sdt=0%2C5&q=Melatonin%3A+Karanli%C4%9Fin+Antioksidan+G%C3%BCc%C3%BC+Melatonin%3A+Th e+Antioxidant+Power+Of+Darkne&btnG=
- Lançon, R., Celeghini, E. C. C., Alves, M. B. R., Lemes, K. M., Gonella-Diaza, A. M., Oliveira, L. Z., & Arruda, R. P. de. (2018). Melatonin Added to Cryopreservation Extenders Improves the Mitochondrial Membrane Potential of Postthawed Equine Sperm. *Journal of Equine Veterinary Science*, 69, 78-83. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.06.006>
- Leite, T. G., do Vale Filho, V. R., de Arruda, R. P., de Andrade, A. F. C., Emerick, L. L., Zaffalon, F. G., ... Andrade, V. J. de. (2010). Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. *Animal Reproduction Science*, 120(1-4), 31-38. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.04.005>
- Lemma A. (2011). Effect of cryopreservation on sperm quality and fertility. *Artificial Insemination In Farm Animals* 12, 191-216.
- Lensky, Y., & Schindler, H. (1967). Motility and reversible inactivation of honeybee spermatozoa in vivo and in vitro. *Les Annales de l'Abeille*, 10(1), 5-16. Erişim adresi: <https://hal.science/hal-00890245>
- Lino-Neto, J., Bao, S. N., & Dolder, H. (2000). Sperm ultrastructure of the honey bee (*Apis mellifera*) (L) (Hymenoptera, Apidae) with emphasis on the nucleus-flagellum transition region. *Tissue and Cell*, 32(4), 322-327. <https://doi.org/10.1054/tice.2000.0119>
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>

- Locke, S. J., & Peng, Y. -S. (1993). The effects of drone age, semen storage and contamination on semen quality in the honey bee (*Apis mellifera*). *Physiological Entomology*, 18(2), 144-148. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3032.1993.TB00461.X>
- Loeza-Concha, H., Domínguez-Rebolledo, Á., Copas-Medina, K., Vivas-Rodríguez, J., Escalera-Valente, F., & Ramón-Ugalde, J. (2019). Effect of egg yolk on sperm cryopreservation of drone (*Apis mellifera*). *Abanico Veterinario*, 9(1), 1-11. <https://doi.org/10.21929/Abavet2019.921>
- Mackensen, O. (1955). Experiments in the Technique of Artificial Insemination of Queen Bees. *Journal of Economic Entomology*, 48(4), 418-421. <https://doi.org/10.1093/JEE/48.4.418>
- Metz, B. N., & Tarpy, D. R. (2019). Reproductive senescence in drones of the honey bee (*Apis mellifera*). *Insects*, 10(1), 11. <https://doi.org/10.3390/insects10010011>
- Molinia, F. C., Evans, G., Casares, P. Q., & Maxwell, W. M. C. (1994). Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 36(1-2), 113-122. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(94\)90058-2](https://doi.org/10.1016/0378-4320(94)90058-2)
- Moritz, R. F. A. (1981). Influence of Inbreeding on the Fitness of Drones. *Apidologie*, 12(1), 41-55. Erişim adresi: https://scholar.google.com/scholar?hl=tr&as_sdt=0%2C5&q=Influence+of+Inbreeding+on+the+Fitness+of+Drones.&btnG=
- Moscatelli, N., Spagnolo, B., Pisanello, M., Lemma, E. D., De Vittorio, M., Zara, V., ... & Ferramosca, A. (2017). Single-cell-based evaluation of sperm progressive motility via fluorescent assessment of mitochondria membrane potential. *Scientific Reports*, 7(1), 17931. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18123-1>
- Nagy, S., Jansen, J., Topper, E. K., & Gadella, B. M. (2003). A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biology of Reproduction*, 68(5), 1828-1835. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.011445>
- Najafi, A., Adutwum, E., Yari, A., Salehi, E., Mikaeili, S., Dashtestani, F., ... Asadi, E. (2018). Melatonin affects membrane integrity, intracellular reactive oxygen species, caspase3 activity and AKT phosphorylation in frozen thawed human sperm. *Cell and Tissue Research*, 372(1), 149-159. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2743-4>
- Nur, Z., Seven-Cakmak, S., Ustuner, B., Cakmak, I., Erturk, M., Abramson, C. I., ... Soylu, M. K. (2012). The use of the hypo-osmotic swelling test, water test, and supravital staining in the evaluation of drone sperm. *Apidologie*, 43(1), 31-38. <https://doi.org/10.1007/s13592-011-0073-1>
- Nur, Z., Zik, B., Ustuner, B., Sagirkaya, H., & Ozguden, C. G. (2010). Effects of different cryoprotective agents on ram sperm morphology and DNA integrity. *Theriogenology*, 73(9), 1267-1275. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.12.007>

- Özkök, A. O., & Yalçın, B. (2022). Effects of antioxidant use on semen storage in honey bees. *International Journal of Science Letters*, 4(1), 183-189. <https://doi.org/10.38058/ijsl.1045462>
- Page, R. E., & Erickson, E. H. (1988). Reproduction by worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Behavioral Ecology And Sociobiology*, 23, 117-126. Erişim adresi: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00299895>
- Paillard, M., Rousseau, A., Giovenazzo, P., & Bailey, J. L. (2017). Preservation of Domesticated Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Drone Semen. *Journal of Economic Entomology*, 110(4), 1412-1418. <https://doi.org/10.1093/jee/tox149>
- Paynter, E., Baer-Imhoof, B., Linden, M., Lee-Pullen, T., Heel, K., Rigby, P., & Baer, B. (2014). Flow cytometry as a rapid and reliable method to quantify sperm viability in the honeybee *Apis mellifera*. *Cytometry Part A*, 85(5), 463-472. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22462>
- Peña, F. J., Ortiz Rodriguez, J. M., Gil, M. C., & Ortega Ferrusola, C. (2018). Flow cytometry analysis of spermatozoa: Is it time for flow spermetry? *Reproduction in Domestic Animals*, 53, 37-45. <https://doi.org/10.1111/rda.13261>
- Peng, Y. S., Locke, S. J., Nasr, M. E., Liu, T. P., & Montague, M. A. (1990). Differential staining for live and dead sperm of honey bees. *Physiological entomology*, 15(2), 211-217. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1990.tb00509.x>
- Peng, C., Yin, C., & R Y, L. Y. (1993). Ultrastructure of honey bee, *Apis mellifera*, sperm with special emphasis on the acrosomal complex following high-pressure freezing fixation. *Physiological Entomology* 18(1), 93-101 <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1993.tb00454.x>
- Peso, M., Even, N., Søvik, E., Naeger, N. L., Robinson, G. E., & Barron, A. B. (2016). Physiology of reproductive worker honey bees (*Apis mellifera*): insights for the development of the worker caste. *Journal of Comparative Physiology A*, 202, 147-158. <https://doi.org/10.1007/s00359-015-1061-0>
- Pettis, J. S., Rice, N., Joselow, K., vanEngelsdorp, D., & Chaimanee, V. (2016). Colony failure linked to low sperm viability in honey bee (*Apis mellifera*) queens and an exploration of potential causative factors. *PloS one*, 11(2), e0147220.. <https://doi.org/10.1371/Journal.Pone.0147220>
- Phiancharoen, M., Wongsiri, S., Koeniger, N., & Koeniger, G. (2004). Instrumental insemination of *Apis mellifera* queens with hetero- and conspecific spermatozoa results in different sperm survival. *Apidologie*, 35(5), 503-511. <https://doi.org/10.1051/apido:2004043>
- Placer, Z. A., Cushman, L. L., & Johnson, B. C. (1966). Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Analytical biochemistry*, 16(2), 359-364. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(66\)90167-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(66)90167-9)
- Poiani, A. (2006). Complexity of seminal fluid: a review. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 60, 289-310. <https://doi.org/10.1007/s00265-006-0178-0>
- Poland, V., Eubel, H., King, M., Solheim, C., Harvey Millar, A., & Baer, B. (2011). Stored sperm differs from ejaculated sperm by proteome alterations associated with energy metabolism in the honeybee *Apis mellifera*. *Molecular Ecology*, 20(12), 2643-2654. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05029.x>

- Rangel, J., & Fisher, A. (2019). Factors affecting the reproductive health of honey bee (*Apis mellifera*) drones—A review. *Apidologie*, 50(6), 759-778. <https://doi.org/10.1007/s13592-019-00684-x>
- Reiter, R. J. (1993). Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals: a brief review. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 26(11), 1141-1155. Erişim adresi: <https://europepmc.org/article/med/8136717>
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Osuna, C., & Gitto, E. (2000). Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress: a review. *Journal of Biomedical Science*, 7(6), 444-458. <https://doi.org/10.1159/000025480>
- Rhodes, J. W., Harden, S., Spooner-Hart, R., Anderson, D. L., & Wheen, G. (2011). Effects of age, season and genetics on semen and sperm production in *Apis mellifera* drones. *Apidologie*, 42(1), 29-38. <https://doi.org/10.1051/apido/2010026>
- Rinderer, T. E., Collins, A. M., Pesante, D., Daniel, R., Lancaster, V., & Baxter, J. (1981). A comparison of Africanized and European drones: weights, mucus gland and seminal vesicle weights, and counts of spermatozoa. *Apidologie*, 16(4), 407-412. Erişim adresi: https://www.apidologie.org/articles/apido/pdf/1985/04/Apidologie_0044-8435_1985_16_4_ART0005.pdf
- Roberts, K. E., Evison, S. E. F., Baer, B., & Hughes, W. O. H. (2015). The cost of promiscuity: sexual transmission of *Nosema* microsporidian parasites in polyandrous honey bees. *Scientific Reports*, 5(1), 10982. <https://doi.org/10.1038/srep10982>
- Rousseau, A., Fournier, V., & Giovenazzo, P. (2015). *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) drone sperm quality in relation to age, genetic line, and time of breeding. *Canadian Entomologist*, 147(6), 702-711. <https://doi.org/10.4039/tce.2015.12>
- Rousseau, A., & Giovenazzo, P. (2016). Optimizing Drone Fertility With Spring Nutritional Supplements to Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colonies. *Journal of Economic Entomology*, 109(3), 1009-1014. <https://doi.org/10.1093/JEE/TOW056>
- Rowland, C. M., & McLellan, A. R. (1987). Seasonal changes of drone numbers in a colony of the honeybee, *Apis mellifera*. *Ecological modelling*, 37(3-4), 155-166. [https://doi.org/10.1016/0304-3800\(87\)90023-8](https://doi.org/10.1016/0304-3800(87)90023-8)
- Rzymiski, P., Langowska, A., Fliszkiewicz, M., Poniedziałek, B., Karczewski, J., & Wiktorowicz, K. (2012). Flow cytometry as an estimation tool for honey bee sperm viability. *Theriogenology*, 77(8), 1642-1647. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.12.009>
- Sadeghi, S., Pertusa, J., Yaniz, J. L., Nuñez, J., Soler, C., & Silvestre, M. A. (2018). Effect of different oxidative stress degrees generated by hydrogen peroxide on motility and DNA fragmentation of zebrafish (*Danio rerio*) spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(6), 1498-1505. <https://doi.org/10.1111/rda.13296>

- Said, T. M., Gaglani, A., & Agarwal, A. (2010). Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reproductive Biomedicine Online*, 21(4), 456-462. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.05.011>
- Salamon, S., & Maxwell, W. M. C. (1995). Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*, 37(3-4), 185-249. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(94\)01327-I](https://doi.org/10.1016/0378-4320(94)01327-I)
- Sariözkan, S., Bucak, M. N., Tuncer, P. B., Ulutaş, P. A., & Bilgen, A. (2009). The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. *Cryobiology*, 58(2), 134-138. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.11.006>
- Schlüns, H., Koeniger, G., Koeniger, N., & Moritz, R. F. A. (2004). Sperm utilization pattern in the honeybee (*Apis mellifera*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 56(5), 458-463. <https://doi.org/10.1007/s00265-004-0806-5>
- Schlüns, H., Schlüns, E. A., Van Praagh, J., & Moritz, R. F. A. (2003). Sperm numbers in drone honeybees (*Apis mellifera*) depend on body size. *Apidologie*, 34(6), 577-584. <https://doi.org/10.1051/apido:2003051>
- Schmehl, M. K., Vazquez, I. A., & Graham, E. F. (1986). The effects of nonpenetrating cryoprotectants added to TEST-yolk-glycerol extender on the post-thaw motility of ram spermatozoa. *Cryobiology*, 23(6), 512-517. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(86\)90060-X](https://doi.org/10.1016/0011-2240(86)90060-X)
- Sellem, E., Broekhuijse, M. L. W. J., Chevrier, L., Camugli, S., Schmitt, E., Schibler, L., & Koenen, E. P. C. (2015). Use of combinations of in vitro quality assessments to predict fertility of bovine semen. *Theriogenology*, 84(9), 1447-1454. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.035>
- Seven, İ. (2010). Elazığ Yöresindeki Arıcılık İşletmelerinin Hastalık, Parazit Ve Zararlılar Yönünden İncelenmesi. *Veterinary Sciences*, 5(2), 52-66. Erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/en/pub/nwsavet/issue/10885/130594>
- Shafir, S., Kabanoff, L., Duncan, M., & Oldroyd, B. P. (2009). Honey bee (*Apis mellifera*) sperm competition in vitro - Two are no less viable than one. *Apidologie*, 40(5), 556-561. <https://doi.org/10.1051/apido/2009014>
- Silva, P. F. N., & Gadella, B. M. (2006). Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, 65(5), 958-978. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.010>
- Stankus, T. (2008). A review and bibliography of the literature of honey bee Colony Collapse Disorder: a poorly understood epidemic that clearly threatens the successful pollination of billions of dollars of crops in America. *Journal of Agricultural & Food Information*, 9(2), 115-143. <https://doi.org/10.1080/10496500802173939>
- Storey, B. T. (2008). Mammalian sperm metabolism: Oxygen and sugar, friend and foe. *International Journal of Developmental Biology*, 52(5-6), 427-437. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072522bs>
- Straub, L., Villamar-Bouza, L., Bruckner, S., Chantawannakul, P., Gauthier, L., Khongphinitbunjong, K., ... & Williams, G. R. (2016). Neonicotinoid insecticides can serve as inadvertent insect contraceptives. *Proceedings of the*

- Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1835), 20160506.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2016.0506>
- Stürup, M., Baer-Imhoof, B., Nash, D. R., Boomsma, J. J., & Baer, B. (2013). When every sperm counts: factors affecting male fertility in the honeybee *Apis mellifera*. *Behavioral Ecology*, 24(5), 1192-1198.
<https://doi.org/10.1093/Beheco/Art049>
- Succu, S., Berlinguer, F., Pasciu, V., Satta, V., Leoni, G. G., & Naitana, S. (2011). Melatonin protects ram spermatozoa from cryopreservation injuries in a dose-dependent manner. *Journal of Pineal Research*, 50(3), 310-318.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2010.00843.x>
- Sun, T. C., Li, H. Y., Li, X. Y., Yu, K., Deng, S. L., & Tian, L. (2020). Protective effects of melatonin on male fertility preservation and reproductive system. *Cryobiology*, 95, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.01.018>
- Tarpy, D. R., & Olivarez Jr, R. (2014). Measuring sperm viability over time in honey bee queens to determine patterns in stored-sperm and queen longevity. *Journal of Apicultural Research*, 53(4), 493-495.
<https://doi.org/10.3896/IBRA.1.53.4.02>
- Taylor, M. A., Guzmán-Novoa, E., Morfin, N., & Buhr, M. M. (2009). Improving viability of cryopreserved honey bee (*Apis mellifera* L.) sperm with selected diluents, cryoprotectants, and semen dilution ratios. *Theriogenology*, 72(2), 149-159. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.02.012>
- Tiwari, S., Dewry, R. K., Srivastava, R., Nath, S., & Mohanty, T. K. (2022). Targeted antioxidant delivery modulates mitochondrial functions, ameliorates oxidative stress and preserve sperm quality during cryopreservation. *Theriogenology*, 179, 22-31. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.11.013>
- Tofilski, A., Chuda-Mickiewicz, B., Czekońska, K., & Chorbiński, P. (2012). Flow cytometry evidence about sperm competition in honey bee (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 43(1), 63-70. <https://doi.org/10.1007/s13592-011-0089-6>
- Ugur, M. R., Saber Abdelrahman, A., Evans, H. C., Gilmore, A. A., Hitit, M., Arifiantini, R. I., ... & Memili, E. (2019). Advances in cryopreservation of bull sperm. *Frontiers in veterinary science*, 6, 268.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00268>
- Ustuner, B., Alcay, S., Toker, M. B., Nur, Z., Gokce, E., Sonat, F. A., ... Soylu, M. K. (2016). 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*, 164, 97-104.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.11.017>
- Vanderplanck, M., Moerman, R., Rasmont, P., Lognay, G., Wathelet, B., Wattiez, R., & Michez, D. (2014). How does pollen chemistry impact development and feeding behaviour of polylectic bees?. *PloS one*, 9(1), e86209.
<https://doi.org/10.1371/Journal.Pone.0086209>
- Verma, L. R. (1978). Biology of honeybee (*Apis mellifera* L.) spermatozoa. 1. Effect of different diluents on motility and survival. *Apidologie*, 9(3), 167-174. Erişim adresi: https://scholar.google.com/scholar?hl=tr&as_sdt=0%2C5&q=Biology+o

- f+honeybee+%28Apis+mellifera+L.%29+spermatozoa.+1.+Effect+of+differen
t+diluents+on+motility+and+survival&btnG=
- Vishwanath, R., & Shannon, P. (1997). Do sperm cells age? A review of the physiological changes in sperm during storage at ambient temperature. *Reproduction, Fertility and Development*, 9(3), 321-332. <https://doi.org/10.1071/R96088>
- Watson, P. F. (1981). The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. *Reproduction*, 62(2), 483-492. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.0620483>
- Wegener, J., & Bienefeld, K. (2012). Toxicity of cryoprotectants to honey bee semen and queens. *Theriogenology*, 77(3), 600-607. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.08.036>
- Wegener, J., May, T., Kamp, G., & Bienefeld, K. (2014a). A successful new approach to honeybee semen cryopreservation. *Cryobiology*, 69(2), 236-242. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.07.011>
- Wegener, J., May, T., Kamp, G., & Bienefeld, K. (2014b). New Methods and Media for the Centrifugation of Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Drone Semen. *Journal of Economic Entomology*, 107(1), 47-53. <https://doi.org/10.1603/EC13159>
- Wegener, J., May, T., Knollmann, U., Kamp, G., Müller, K., & Bienefeld, K. (2012). In vivo validation of in vitro quality tests for cryopreserved honey bee semen. *Cryobiology*, 65(2), 126-131. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2012.04.010>
- Winston, M. (1987). *The Biology Of The Honey Bee*. Harvard University Press.
Erişim adresi:
https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=a8fmEAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=The+Biology+Of+The+Honey+Bee.+Harvard+University+Press&ots=GFJdDDwAWh&sig=_5zVx3nmXyBL5Z7UYWKZng4p2Dg&redir_esc=y#v=onepage&q=The%20Biology%20Of%20The%20Honey%20Bee.%20Harvard%20University%20Press&f=false
- Woyke, J. (1962). Natural And Artificial Insemination Of Queen Honeybees. *Bee World*, 43(1), 21-25. <https://doi.org/10.1080/0005772x.1962.11096922>
- Yániz, J. L., Silvestre, M. A., & Santolaria, P. (2020). Sperm quality assessment in honey bee drones. *Biology*, 9(7), 174. <https://doi.org/10.3390/Biology9070174>
- Yániz, J., Palacín, I., & Santolaria, P. (2019). Effect Of Chamber Characteristics, Incubation, And Diluent On Motility Of Honey Bee (*Apis mellifera*) drone sperm. *Apidologie*, 50(4), 472-481. <https://doi.org/10.1007/s13592-019-00659-y>
- Yániz, J., Palacín, I., Vicente-Fiel, S., Gosálvez, J., López-Fernández, C., & Santolaria, P. (2013). Comparison of membrane-permeant fluorescent probes for sperm viability assessment in the ram. *Reproduction in Domestic Animals*, 48(4), 598-603. <https://doi.org/10.1111/rda.12132>
- Yu, K., Deng, S. L., Sun, T. C., Li, Y. Y., & Liu, Y. X. (2018). Melatonin regulates the synthesis of steroid hormones on male reproduction: a review. *Molecules*, 23(2), 447. <https://doi.org/10.3390/Molecules23020447>

- Zaitoun, S., Al-Majeed Al-Ghzawi, A., & Kridli, R. (2009). Monthly changes in various drone characteristics of *Apis mellifera ligustica* and *Apis mellifera syriaca*. *Entomological Science*, 12(2), 208-214. <https://doi.org/10.1111/j.1479-8298.2009.00324.x>
- Zareie, R., Eubel, H., Millar, A. H., & Baer, B. (2013). Long-term survival of high quality sperm: Insights into the sperm proteome of the honeybee *Apis mellifera*. *Journal of Proteome Research*, 12(11), 5180-5188. <https://doi.org/10.1021/pr4004773>
- Zool, G., & Bishop - J. (1920). Fertilization in the honey-bee. *Journal of Experimental Zoology*, 31(2), 225-286. Erişim adresi: https://scholar.archive.org/work/ukcqtnt5zncfrmg3ntsiumsae/access/ia_file/crossref-pre-1923-scholarly-works/10.1002%252Fjctb.5000412409.zip/10.1002%252Fjez.1400310204.pdf



7. SİMGELER VE KISALTMALAR

ANOVA		Tek yönlü varyans analizi
ASP	:	Alabalık seminal plazması
ATP	:	Adenozin trifosfat
BSA	:	Sığır serum albümini
C°	:	Santigrat derece
CAT	:	Katalaz
CaCl	:	Kalsiyum Klorür
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
DMSO	:	Dimetil Sülfoksit
EDTA	:	Etilendiamin tetraasetik asit
FITC-PSA	:	FITC-Pisum sativum agglutinin
g	:	Gram
GSH-PX	:	Glutatyon Peroksidaz
H ₂ O ₂	:	Hidrojen Peroksit
HOST	:	Plazma membran fonksiyonel bütünlük testi
KCl	:	Potasyum Klorür
mL	:	Mililitre
µl	:	Mikrolitre
MDA	:	Malondialdehit
NaCl	:	Sodyum Klorür
NaHCO ₃	:	Sodyum bikarbonat
Na ₂ HPO ₄	:	Disodyum Fosfat
OH	:	Hidroksi
O ₂	:	Oksijen
pH	:	Power of hydrogen
PI	:	Propidyum İyodür
ppm	:	Milyon başına parça
ppb	:	Milyar başına parça
PSA	:	Pisum sativum aglutinin
PVP	:	Polivinilpirolidol
ROS	:	Reaktif oksijen türleri
R13	:	Rodamin 123
SCD	:	Sperm kromatin dağılımı
SCSA	:	Sperm kromatin yapısı testi
SOD	:	Süperoksit Dismutaz
SYBR-14	:	Membran geçirgen nükleik asit leke etiketleri
TUNEL	:	Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling

8. TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi ve birikimleri ile her zaman destek veren, yol gösteren kıymetli danışman hocam Sayın Prof.Dr. Selim ALÇAY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalındaki değerli hocalarım Prof.Dr. Hakan SAĞIRKAYA, Prof.Dr. Ülgen GÜNAY, Prof.Dr. İbrahim DOĞAN, Prof.Dr. M. Kemal SOYLU, Prof.Dr. Zekariya NUR, Prof.Dr. Burcu ÜSTÜNER'e teşekkürlerimi sunarım.

Doktora süresince ve tez çalışmamda, her zaman desteklerini ve yardımlarını esirgemeden yanımda olan sevgili arkadaşlarım Kemal BAĞCI, Ahmet AKTAR ve Emine BEKİL' e çok teşekkür ederim.



9. ÖZGEÇMİŞ

İlk, orta liseyi Bursa’ da okudu. Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi’ ni kazandı. Ayrıca ek olarak Anadolu Üniversitesinden Adalet Programı, Dış Ticaret Programı ve Kamu Yönetimi bölümlerini bitirdi.

Meslek hayatında ilk olarak perakende sektöründe, gıda alanında çalıştı. Sonrasında Tarım ve Orman Bakanlığı’ nda çalışmaya başladı. Keles İlçe Tarım Müdürlüğü ve Nilüfer İlçe Tarım Müdürlüğü’nde veteriner hekim olarak hayvan sağlığı biriminde görev yaptı. Bursa İl Tarım Müdürlüğü’nde Arazi Edindirme Şube Müdürü olarak 2 yıl görev yaptı. Ardından 2,5 yıl yine Bursa Tarım İl Müdürlüğü Balıkçılık ve Su Ürünleri Şube Müdürü olarak görev aldı. Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalında doktora programına başladı. 2020 yılından itibaren Bursa Uludağ Üniversitesi’nde veteriner hekim olarak görev yapmaktadır.

