



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**FARKLI SULANDIRICILARLA DONDURULAN RUS
MERSİN BALIĞI (*Acipenser gueldenstaedtii* 1833)
SPERMASININ KALİTESİ ÜZERİNE
BİR ARAŞTIRMA**

**Su Ürünleri Yük. Müh. Güneş YAMANER
Yetiştiricilik Anabilim Dalı Yetiştiricilik
Programı**

**Danışman
Prof.Dr. Devrim MEMİŞ**

**II.Danışman
Prof.Dr. Alper BARAN**

Ocak, 2012

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**FARKLI SULANDIRICILARLA DONDURULAN RUS
MERSİN BALIĞI (*Acipenser gueldenstaedtii* 1833)
SPERMASININ KALİTESİ ÜZERİNE
BİR ARAŞTIRMA**

**Su Ürünleri Yük. Müh. Güneş YAMANER
Yetiştiricilik Anabilim Dalı Yetiştiricilik
Programı**

**Danışman
Prof.Dr. Devrim MEMİŞ**

**II.Danışman
Prof.Dr. Alper BARAN**

Ocak, 2012

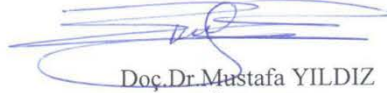
İSTANBUL

Bu çalışma 27/01/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yetiştiricilik Anabilim Dalı Yetiştiricilik programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

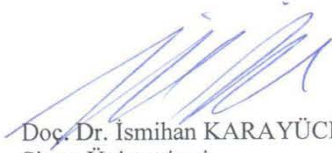
Tez Jürisi



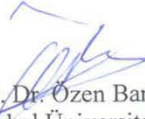
Prof. Dr. Devrim MEMİş
İstanbul Üniversitesi
Su Ürünleri Fakültesi



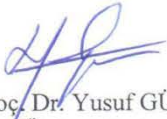
Doç. Dr. Mustafa YILDIZ
İstanbul Üniversitesi
Su Ürünleri Fakültesi



Doç. Dr. İsmihan KARAYÜCEL
Sinop Üniversitesi
Su Ürünleri Fakültesi



Doç. Dr. Özen Banu ÖZDAş
İstanbul Üniversitesi
Veteriner Fakültesi



Doç. Dr. Yusuf GÜNER
Ege Üniversitesi
Su Ürünleri Fakültesi

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 3623 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Tüm eğitimim boyunca ve tez çalışmalarım sırasında bana her türlü yardımı, anlayışı, desteği ve sabrı gösteren, yolumu aydınlatan değerli hocam Prof.Dr.Devrim MEMİŞ'e;

Bu doktora çalışması sırasında bilgi ve deneyimi ile çalışmamı yönlendiren hocam Prof. Dr. Alper BARAN'a;

Doktora tez izleme komitesinde görev alarak çalışmalarına katkı sağlayan emekliye ayrılan Prof.Dr. Metin TİMUR'a ve Doç.Dr.İsmihan KARAYÜCEL, Doç.Dr. Mustafa YILDIZ'a;

Tez çalışmam süresince destek, öneri ve samimiyetleri için Doç.Dr. Süheyla KARATAŞ, Yrd.Doç.Dr. Aygöl EKİCİ ve tüm yetiştiricilik bölümü hocalarıma;

Tez çalışmasında özgün resim kullanmamda emeği geçen Dr. Deniz Devrim TOSUN'a ve Tez çalışması süresince sabırları, anlayışları ve paylaşımları için ofis ve mesai arkadaşlarıma;

Bu çalışmanın desteklenmesini sağlayan İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne;

Sabrı, desteği ve dostluğu için Dr. Nazlı DEMİREL'e;

Aileme;

Sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım....

Ocak, 2012

Güneş YAMANER

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ.....	vii
SEMBOL LİSTESİ.....	viii
ÖZET.....	ix
SUMMARY.....	x
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR.....	6
2.1. MERSİN BALIKLARI HAKKINDA	
GENEL BİLGİ.....	6
2.2. MERSİN BALIKLARINDA ÜREME VE	
ÜREME FİZYOLOJİSİ.....	10
2.2.1. Mersin Balıklarında Dişi ve Erkek Ayrımı.....	12
2.2.2. Erkek Balıkta Üreme Fizyolojisi.....	15
2.2.3. Testisler ve Kanal Sistemi.....	16
2.2.4. Endokrin Düzen ve Spermatogenesis.....	18
2.2.5. Seminal Plazma ve Spermatozoa.....	21
2.2.5.1.Seminal Plazma.....	21
2.2.5.2.Spermatozoon.....	22
2.2.6. Hormon Uygulamaları.....	26
2.3. SPERMATOLOJİK ÖZELLİKLER.....	27
2.3.1. Spermanın Elde Edilmesi.....	27
2.3.2. Sperma Rengi.....	28
2.3.3. Sperma Miktarı.....	28
2.3.4. Sperma pH'sı.....	28
2.3.5.Seminal Plazma'nın Ozmotik Basıncı.....	29

2.3.6.Spermatozoa Yoğunluğu.....	30
2.3.7. Spermatozoa Motilitesi ve Süresi.....	31
2.4. SPERMANIN KRİYOPREZERVASYONU (SULANDIRMA, DONDURMA VE ÇÖZDÜRME İŞLEMLERİ).....	34
2.4.1. Sulandırıcı ve Sulandırma Oranı.....	36
2.4.2. Spermanın Dondurulma ve Çözdürülme Prosedürü.....	38
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	41
3.1. MALZEME.....	41
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Balıklar.....	41
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	41
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	42
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Sulandırıcılar.....	42
3.2.YÖNTEM.....	43
3.2.1. Balıkların Bakımı ve Beslenmesi.....	43
3.2.2. Balıkların Genel Muayenesi, Seçimi ve Markalanması.....	45
3.2.3. Balıklara Hormon Uygulaması.....	48
3.2.4. Markalanan Anaç Balıklardan Spermanın Alınması.....	51
3.2.5. Spermatolojik Özelliklerin İncelenmesi.....	51
3.2.5.1. Sperma Miktarının Hesaplanması.....	51
3.2.5.2. Spermanın pH Değeri ve Seminal Plazmanın Ozmolaritesi.....	51
3.2.5.3. Spermatozoa Yoğunluğu.....	53
3.2.5.4. Spermatozoa Motilitesi.....	53
3.2.5.5. Spermatozoa Motilite Süresi.....	54
3.2.5.6. Sperma Rengi.....	54
3.2.6. Spermanın Sulandırılması ve Dondurulması.....	54
3.2.6.1. Sulandırıcıların Hazırlanması.....	54
3.2.6.2. Spermanın Dondurulması.....	55
3.2.7. Dondurulmuş Spermanın Çözdürülmesi.....	57
3.2.8. İstatistiksel Analizler.....	58
4. BULGULAR.....	59
4.1.DENEME HAVUZLARINDA KULLANILAN SUYUN FİZİKSELVE KİMYASAL DEĞERLERİ.....	59
4.2.DONDURMA ÖNCESİ TAZE SPERMAYA AİT SPERMATOLOJİK ÖZELLİKLER.....	61
4.2.1. Taze Sperma Miktarı.....	61

4.2.2. Taze Sperma pH'sı.....	63
4.2.3. Taze Spermada Seminal Plazmanın Osmotik Basıncı.....	65
4.2.4. Taze Spermada Birim Hacimde Belirlenen Spermatozoa Yoğunluğu.....	67
4.2.5. Taze Spermada Spermatozoa Motilitesi.....	69
4.2.6. Taze Spermada Spermatozoa Motil Kalma Süresi.....	71
4.3. ÇÖZDÜRME SONRASI SAPTANAN SPERMATOLOJİK ÖZELLİKLER.....	73
4.3.1. Çözdürme Sonrası Spermatozoa Motilitesi.....	73
4.3.2. Çözdürme Sonrası Spermatozoa Motil Kalma Süresi.....	74
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	76
KAYNAKLAR.....	90
ÖZGEÇMİŞ.....	106

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	: Mersin balığı türlerinin dünya üzerindeki dağılım alanları.....	6
Şekil 2.2	: Rus Mersin balıklarının dış morfolojik özellikleri.....	9
Şekil 2.3	: Biyopsi aleti (A) ve biyopsi yöntemi ile alınmış yumurtalar (B).....	12
Şekil 2.4	: Biyopsi yönteminin balık vücudunun farklı bölgelerinde kullanımı.....	12
Şekil 2.5	: Endoskopianın uygulanışı.....	13
Şekil 2.6	: Endoskopi aletinin detaylı görünümü	14
Şekil 2.7	: Ultrasonografi aleti (A) ve propları (B)	15
Şekil 2.8	: Mersin balıkları (Acipenser) (A) ve kemikli balıklarda (B) testisler ve böbreğin ilişkisi.....	17
Şekil 2.9	: <i>A. gueldenstaedtii</i> türünde M4 safhasında testisin görünümü.....	18
Şekil 2.10	: Balıklarda spermatozoa oluşumu ve olgunlaşması	20
Şekil 2.11	: <i>A. ruthenus</i> türünde spermatozoon'daki Akrozom görünümü	23
Şekil 2.12	: Spermatozoon baş yapısı (<i>A. transmontanus</i>)	24
Şekil 2.13	: <i>A. gueldenstaedtii</i> spermatozoon'u ve bölümleri.....	25
Şekil 2.14	: Çalışmada kullanılan <i>A. gueldenstaedtii</i> balığının spermatozoa görünümü.....	25
Şekil 2.15	: Spermatozoon flagellasındaki aksonem ve mikrotübüller	26
Şekil 2.16	: Mersin balıklarında sperma alımında kullanılan kateter	28
Şekil 3.1	: Çalışmada kullanılan balıkların bulunduğu havuzların üzeri açık halde görünümü.....	44
Şekil 3.2	: Çalışmada kullanılan balıkların bulunduğu havuzların üzeri kapatılmış görünümü.....	44
Şekil 3.3	: Mersin balıklarında üreme elbisesi A, B- <i>A. gueldenstaedtii</i> , C- <i>A. nudiventris</i> , D- <i>A. ruthenus</i>	45
Şekil 3.4	: Denemede kullanılan erkek bireylerde görülen “üreme elbisesi” denilen beyaz yapı.....	46
Şekil 3.5	: Balıklardan enjektörün ucuna takılan plastik hortum (kateter) ile sperma alımı	46
Şekil 3.6	: Denemede kullanılan balıkların ağırlıklarının ölçülmesi	47
Şekil 3.7	: Denemede kullanılan balıklarda toplam boyun ölçülmesi	47
Şekil 3.8	: Denemede kullanılan balıkların “küpe” ismi verilen marka ile markalanması	48
Şekil 3.9	: Denemede kullanılan balıkların sol pektoral yüzgeçlerine takılan ve numaralandırılan marka	48
Şekil 3.10	: Denemede kullanılan balıklara hormon enjeksiyonunun uygulanması	49
Şekil 3.11	: Denemede kullanılan anaç balıklardan spermanın alınması	51
Şekil 3.12	: Denemede kullanılan masa tipi pH metre	52
Şekil 3.13	: Denemede kullanılan mikro-ozmometre.....	52
Şekil 3.14	: Denemede kullanılan balıklarda kullanılan spermadaki renk farklılıkları.....	54

Şekil 3.15	: Payetlerin üzerine dizildiği buz kasetleri üzerindeki tarağın görünümü	56
Şekil 3.16	: Tarağın strafor kutu içerisindeki sıvı azot buharından 3 cm yukarıya yerleştirilmesinin görünümü.	56
Şekil 3.17	: Payetlerin yerleştirildiği goblet, kanister ve sıvı azot tankının görünümü	57
Şekil 3.18	: Payetlerin strafor kutudaki sıvı azottan çıkarılması	58
Şekil 3.19	: Payetlerin sıvı azottan çıkarıldıktan sonra 40°C’de çözdürülmesi	58
Şekil 4.1	: Deneme öncesi 2010 ve 2011 yılları üreme dönemlerine ait 30 günlük su sıcaklık değerleri (Mayıs-Haziran)	59
Şekil 4.2	: Deneme öncesi 2010 ve 2011 yılları üreme dönemlerine ait 30 günlük çözülmüş oksijen değeri (Mayıs-Haziran)	60
Şekil 4.3	: Deneme öncesi 2010 ve 2011 yılları üreme dönemlerine ait 30 günlük pH değerleri (Mayıs-Haziran)	60
Şekil 4.4	: 2010 ve 2011 üreme dönemlerinde kullanılan balıklardan elde edilen taze sperma miktarları ($p>0,05$)	62
Şekil 4.5	: 2010 ve 2011 üreme dönemlerinde kullanılan balıklardan elde edilen taze spermanın pH değerleri ($p>0,05$)	64
Şekil 4.6	: 2010 ve 2011 üreme dönemlerinde kullanılan balıklardan elde edilen taze spermanın seminal plazmasında ozmotik basınç değerleri ($p>0,05$)	66
Şekil 4.7	: 2010 ve 2011 üreme dönemlerinde kullanılan balıklardan elde edilen taze spermada spermatozoa yoğunluğu ($p>0,05$)	68
Şekil 4.8	: 2010 ve 2011 üreme dönemlerinde kullanılan balıklardan elde edilen taze spermada spermatozoa motiliteleri ($p>0,05$)	70
Şekil 4.9	: 2010 ve 2011 üreme dönemlerinde kullanılan balıklardan elde edilen taze spermada spermatozoa motil kalma süreleri	72
Şekil 4.10	: Taze sperma ve her iki üreme dönemine ait örneklerde çözdürme sonrası motilite yüzdeleri	74
Şekil 4.11	: Taze sperma ve her iki üreme dönemine ait örneklerde çözdürme sonrası spermatozoa motil kalma süreleri	75

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1	: Bazı mersin balığı türlerinin yayılışı ve stok durumu.....	3
Tablo 2.1	: Mersin balıklarında cinsi olgunluğa ulaşma yaşı, boy ve ağırlık değerleri ile iki üreme sezonu arasındaki zaman farkı..	11
Tablo 2.2	: Bazı Mersin balığı türlerinde taze spermada motilite oranları (%).....	33
Tablo 3.1	: 2010 yılı üreme döneminde kullanılan balıkların ağırlıkları, toplam boy uzunlukları ve uygulanan hormon miktarları	50
Tablo 3.2	: 2011 yılı üreme döneminde kullanılan balıkların ağırlıkları, toplam boy uzunlukları ve uygulanan hormon miktarları.....	50
Tablo 4.1	: 2010 yılı üreme döneminde kullanılan bireylerden elde edilen toplam ve nispi sperma miktarları ve ortalaması ($\pm$ SD).....	62
Tablo 4.2	: 2011 yılı üreme döneminde kullanılan bireylerden elde edilen toplam ve nispi sperma miktarları ve ortalaması ($\pm$ SD).....	62
Tablo 4.3	: 2010 yılı üreme döneminde kullanılan bireylere ait taze spermada pH değerleri ve ortalaması ($\pm$ SD).....	64
Tablo 4.4	: 2011 yılı üreme döneminde kullanılan bireylere ait taze spermada pH değerleri ve ortalaması ($\pm$ SD).....	64
Tablo 4.5	: 2010 yılı üreme döneminde kullanılan bireylere ait taze spermada seminal plazmanın ozmotik basınç değerleri ve ortalaması ($\pm$ SD).....	66
Tablo 4.6	: 2011 yılı üreme döneminde kullanılan bireylere ait taze spermada seminal plazmanın ozmotik basınç değerleri ve ortalaması ($\pm$ SD).....	66
Tablo 4.7	: 2010 yılı üreme döneminde kullanılan bireylere ait taze spermada spermatozoa yoğunluğu ve ortalaması ($\pm$ SD).....	68
Tablo 4.8	: 2011 yılı üreme döneminde kullanılan bireylere ait taze spermada spermatozoa yoğunluğu ve ortalaması ($\pm$ SD).....	68
Tablo 4.9	: 2010 yılı üreme döneminde kullanılan bireylere ait taze spermada spermatozoa motilite değerleri ve ortalaması ($\pm$ SD).....	70
Tablo 4.10	: 2011 yılı üreme döneminde kullanılan bireylere ait taze spermada spermatozoa motilite değerleri ve ortalaması ($\pm$ SD).....	70
Tablo 4.11	: 2010 yılı üreme döneminde kullanılan bireylere ait taze spermada spermatozoa motil kalma süreleri ve ortalaması ($\pm$ SD).....	72
Tablo 4.12	: 2011 yılı üreme döneminde kullanılan bireylere ait taze spermada spermatozoa motil kalma süreleri ve ortalaması ($\pm$ SD).....	72

SEMBOL LİSTESİ

FAO	:	Food and Agriculture Organization of the United Nations
IUCN	:	Uluslar Arası Doğa Koruma Birliği
FSH	:	Folikül Uyarıcı Hormon
LH	:	Luteinizing Hormon
GnRH	:	Gonadotropin-Releasing Hormon
LH-RH	:	Luteinizing-Releasing Hormon
PVC	:	Polivinil Klorür
DMSO	:	Dimetilsülfoksit
TOVAG	:	Tarım, Ormancılık ve Veterinerlik Araştırma Destek Grubu

ÖZET

FARKLI SULANDIRICILARLA DONDURULAN RUS MERSİN BALIĞI (*Acipenser gueldenstaedtii* 1833) SPERMASININ KALİTESİ ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA

Bu araştırmada, Rus Mersin balığının (*Acipenser gueldenstaedtii* B&R., 1833) spermatolojik özellikleri ve spermanın kriyoprezervasyonunda kullanılan farklı sulandırıcıların çözündürme sonrası spermatozoa motilitesi ve motil kalma süresine etkisi incelenmiştir. İstanbul Üniversitesi Su ürünleri Fakültesi Sapanca İçsu Ürünleri Üretimi Araştırma ve Uygulama Birimin’de bulunan ve ortalama ağırlığı 7702 ± 2300 g, ortalama boyu $116,9 \pm 9,9$ cm olan 9+ ile 10+ yaşa sahip toplam 12 adet anaç erkek balığın kullanıldığı çalışma, Haziran 2010 ve 2011 olmak üzere iki üreme döneminde gerçekleştirilmiştir.

Her iki üreme döneminde balıklara LHRH hormonu uygulanmış ve spermatolojik özellikler (sperma miktarı, sperma pH’sı, seminal plazma ozmolaritesi, spermatozoa yoğunluğu, spermatozoa motilitesi, spermatozoa motil kalma süresi) incelenmiştir. Dört farklı sulandırıcı (Sulandırıcı I, Sulandırıcı II, Sulandırıcı III, Sulandırıcı IV) kullanılarak dondurulan spermada çözündürme sonrası motilite ve motil kalma süreleri incelenmiştir.

Taze spermada ortalama miktar 140 ± 84 ml, sperma pH’sı $7,8 \pm 0,23$, seminal plazma ozmolaritesi 88 ± 44 mOsmkg⁻¹, spermatozoa yoğunluğu $3,03 \pm 10^9$ /ml, spermatozoa motilitesi 84 ± 6 ve spermatozoa motil kalma süresi 304 ± 135 saniye olarak saptanmıştır.

Çözündürme sonrası en yüksek spermatozoa motilitesi ortalama 30 ± 12 olarak Sulandırıcı III, en düşük ise $11 \pm 6,2$ olarak sulandırıcı IV ile sulandırılan örneklerde belirlenmiştir. Taze spermanın motilite yüzdesi ile sulandırıcı II, III ve IV için çözündürme sonrası motilite yüzdeleri ile elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0,05$). Sulandırıcılar kendi aralarında karşılaştırıldığında ise sulandırıcı II ve III için çözündürme sonrası motilite yüzdeleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p > 0,05$), sulandırıcı II ve IV ve Sulandırıcı III ve IV arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Taze spermanın, motil kalma süresi ile her bir sulandırıcı için elde edilen çözündürme sonrası motil kalma süreleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmasına rağmen, sulandırıcıların kendi aralarında yapılan değerlendirilmesinde Sulandırıcı II, Sulandırıcı III ve Sulandırıcı IV için çözündürme sonrası spermatozoa motil kalma süreleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p > 0,05$).

SUMMARY

A STUDY ON CRYOPRESERVED SPERM QUALITY OF RUSSIAN STURGEON (*Acipenser gueldenstaedtii* 1833) WITH DIFFERENT EXTENDERS

In this study, spermatological parameters of Russian sturgeon fresh sperm and effects of different extenders on post-thaw spermatozoa motility and motility duration were investigated. 12 adult male with initial mean weight of 7702 ± 2300 g, length $116,9 \pm 9,9$ and age 9+ - 10+ obtained from Istanbul University, Faculty of Fisheries, Sapanca Inland Fish Water Production, Research and Applied Station. The study was conducted at two different reproductive periods (June 2010 and 2011).

LHRH-a hormone was used on the fish and fresh sperm parameters such as sperm volume, pH, osmolarity of seminal plasma, sperm concentration, sperm motility and duration of motility were determined at each reproductive period.

Post-thaw motility and duration of motility were investigated after cryopreserved fresh sperm with different extenders (Extender I, Extender II, Extender III, Extender IV).

The spermatological parameters of fresh sperm were identified and expressed as sperm volume 140 ± 84 ml, pH $7,8 \pm 0,23$, sperm concentration $3,03 \pm 10^9$ /ml, sperm motility $\%84 \pm 6$ and duration of motility 304 ± 135 s.

Highest post-thaw motility was achieved using extender III ($\%30 \pm 12$) while lowest was with extender IV ($\%11 \pm 6,2$).

There was significant difference between fresh sperm motility and post-thaw motility for extenders II, III and IV ($p < 0,05$). If extenders were compared as post-thaw motility among themselves, there was no significant difference between extender II and III ($p > 0,05$) whereas there was significant difference between extenders II and IV, extenders III and IV ($p < 0,05$). In terms of motility duration, there was significant difference between fresh sperm motility duration and post-thaw motility duration of each extenders ($p < 0,05$) whereas there was no significant difference between extender II, III and IV ($p > 0,05$).

1. GİRİŞ

Su ürünleri yetiştiriciliğinde mersin balıklarının üretimi geleceği parlak olarak nitelendirilen ve dikkate alınan bir konudur. Siyah havyarının ve etinin dünya marketlerinde satışının ve ederinin artmasından dolayı mersin balığı üretim çiftlikleri günümüzde giderek artmaktadır. Mersin balığı üretimi, 1999 yılında 3,158 ton iken, 2009 yılında 32,898 ton'a yükselmiştir. Üretim çiftlikleri kaynaklı havyar üretimi de 2003 yılında 1,69 ton iken, 2007 yılında 27,32 tona ulaşmıştır (Wuertz ve diğ., 2009; FAO, 2010).

Mersin balıklarının varlıklarını günümüze kadar sürdürebilmeleri *Teleostei* alt sınıfı ile karşılaştırıldığında bir takım morfolojik ve fizyolojik avantajlara sahip olmalarıyla açıklanabilir. Yumurtlama sıcaklık aralıklarının geniş olması, gametlerinin suda dölleme özelliğini uzun süre kaybetmemesi, balıkların juvenil evrede farklı tuzluluk aralığını tolere edebilecek özelliği kazanması, beslenmelerinin geniş bir besin zinciri içinde olması, juvenillerin kemik plakaları sayesinde predatörlerden korunmaları gibi sebeplerle günümüze kadar varlıklarını sürdürebilmişlerdir (Dettlaff ve diğ., 1993; Billard ve Lecointre, 2001).

Yaşayan fosiller olarak adlandırılan mersin balıklarının günümüzde nesilleri tehlike altındadır. Doğal ortamında mersin balıklarının stoklarının azalması ve türlerinin yok olması tamamen insan aktivitelerinin bir sonucudur. Bu aktiviteleri; yıllardan beri devam eden aşırı avcılık, nehirlerin akışının yeniden düzenlenmesi, teleost balıklara özgü hazırlanmış küçük ağ gözüne sahip ağlar ile juvenil bireylerin toplu halde yakalanması ve yok edilmesi, yumurtlamak üzere nehirlere giren anaç dişilerin havyarı için öldürülmesi, doğal suların endüstri ve ziraat faaliyetleri sonucu kirlenmesi, nehirlere inşa edilen barajlar, setler, hidroelektrik santraller, kum-çakıl ocakları gibi yapılanmalar ile yumurtlama göç hareketlerinin engellenmesi gibi sebepler oluşturur (Dettlaff ve diğ., 1993; Wirgin ve diğ., 1997; Billard ve Lecointre, 2001).

1 Nisan 1998 yılından itibaren 164 ülkenin imzalamış olduğu CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora/ Nesli Tehlikede Olan Yabani Hayvan ve Bitki Türlerinin Uluslar Arası Ticaretine İlişkin Sözleşme) kapsamında mersin balıkları koruma altına alınmıştır. Buna bağlı olarak balık ve balıktan elde edilen havyar, et, canlı balık ve yumurta gibi ürünlerin ticareti dünya genelinde kontrol edilmeye başlanmıştır. IUCN'ye göre (International Union of Conservation of Nature – Red List of Threatened Species/ Uluslar Arası Doğa Koruma Birliği - Tehdit Altındaki Türlerin Kırmızı Listesi) Kırmızı Listede yer alan tehdit altındaki 27 mersin balığı türünden *Acipenser gueldenstaedtii* türünün de dahil olduğu özellikle 15 tanesi “Kritik Olarak Tehlike Altında” olarak sınıflandırılmıştır. *A. gueldenstaedtii* türünün bu sınıflandırmaya tabii tutulmasının nedeni; son 10 yılda veya 3 kuşakta, bu balıkların populasyon büyüklüğünde %80'den fazla azalma olarak belirtilmiştir (Tablo 1.1) (Billard ve Lecointre, 2001; IUCN Red List Categories and Criteria version 3.1., 2001).

Tablo 1.1: Bazı mersin balığı türlerinin yayılışı ve stok durumu (Billard ve Lecointre, 2001; Bat ve diğ., 2008) * <http://www.iucnredlist.org/>, 2001 IUCN Red List Categories and Criteria version 3.1., 2011

Latince Adı	Türkçe Adı	İngilizce Adı	Bulunduğu Bölge	Durumu
<i>Huso huso</i>	Beluga,Mersin Morinası	Beluga/Giant	KD, A, HD	T,CT*
<i>H. dauricus</i>	Kaluga	Kaluga	ANS, J	T
<i>Acipenser sturio</i>	Baltık Mersini	European/Atlantic	AV	CT
<i>A.ruthenus</i>	Çoka Balığı	Sterlet	AV, BSN	H
<i>A.nudiventris</i>	Şip Balığı	Ship	KD, HD, AG	T, CT*
<i>A.gueldenstaedtii</i>	Rus, Karaca Mersini	Russian sturgeon	KD, A, HD	T, CT*
<i>A.stellatus</i>	Mersin Balığı, Uzun Burun, Sivri Burun	Sevruga/Stellate	KD, A, HD	T, CT*
<i>A.naccari</i>	Adriyatik Mersini	Adriatic	AD	H, CT*
<i>A.schrenckii</i>	Amur Mersini	Amur	ANS	T, CT*
<i>A.sinensis</i>	Çin Mersini	Chinese	YN, J	T, CT*
<i>A.dabryanus</i>	Yangtze Mersini	Yangtze/Dabry's	YN	CT
<i>A.oxyrinchus</i>	Atlas Okyanus Mersini	Atlantic /Gulf	KAAO	H, DR, TY*
<i>A.fulvescens</i>	Göl Mersini	Lake	KAGN	H,LG*
<i>A.mikhadoui</i>	Sakhalin Mersini	Sakhalin	BO	T, CT*
<i>A.persicus</i>	İran Mersini	Persian	KD,HD	T, CT*
<i>A.baerii</i>	Sibirya Mersini	Siberian	S	H, T*
<i>A.brevirostrum</i>	Kısa Burun Mersin	Shortnose	KAAO	H,
<i>A.medirostris</i>	Yeşil Mersin	Green	KABO, Asya	H, LG*
<i>A.transmontanus</i>	Beyaz Mersin	White	KABO	DR, LG*
<i>Polyodon spathula</i>	Kürek Balıkları Amerikan kaşık ağız	American Paddlefish	M	H

KD: Karadeniz, HD: Hazar denizi, A: Azak, ANS: Amur Nehir Sistemi, J: Japonya, AV: Avrupa, BSN: Batı Sibirya Nehirleri, AG: Aral Gölü, AD: Adriyatik Denizi, YN: Yangtze Nehri, KAAO: Kuzey Amerika Atlas Okyanusu, KAGN: Kuzey Amerika Göl ve Nehirleri, BO: Büyük Okyanus, S:Sibirya, KABO: Kuzey Amerika Büyük Okyanus, M: Mississippi
T: Tehlikede, CT: Ciddi Tehlike, H:Hassas, DR: Düşük Risk, LG: Kırmızı Listeye girmek üzere, TY: Tehlikeye yakın

Mersin balıklarının doğal populasyonlardaki azalışı kontrollü yetiştiriciliğe olan eğilimi arttırmış ve yetiştiricilik şartlarında üretilen bireylerin doğaya bırakılması ile populasyonların arttırılması amaçlanmıştır. *A. ruthenus* ve *A. baerii* türlerinin kontrollü ortamda başarılı bir şekilde üretilmesi ile başlamış olan yetiştiricilik çalışmalarına, balık üretim teknolojisindeki gelişmeler sayesinde *A. transmontanus* ve *A. gueldenstaedtii* gibi bir çok türün üretimi eklenmiştir (Secor ve diğ., 2000; Chebanov ve Billard, 2001; Mims ve diğ., 2002).

Doğal stokların korunması çalışmalarında akuakültür ile beraber balık gametlerinin uzun süre muhafaza edilmesine olanak veren saklama yöntemleri de önemli yer tutmaktadır. Özellikle balık spermasının dondurulması günümüzde yeni bir sektör oluşturmuştur. Balık spermasının dondurularak saklanmasında ilk başarılı sonuç Ringa balıklarından olan *Clupea harengus* türü ile yapılan çalışmada alınmıştır. 1950’li yıllarda yapılan bu çalışmadan sonra 200 farklı balık türünün sperması başarılı bir şekilde dondurulmuş ve günümüzde Rusya ve Ukrayna gibi birkaç ülkede sperm bankaları geliştirilmiştir (Billard ve diğ., 1995a; Chao ve Liao, 2001; Billard ve diğ., 2004; Kopeika ve Kopeika, 2007).

Spermanın +4 °C de saklanması kısa süreli muhafaza edilmesi olarak belirtilirken, canlı hücrelerin ya da işlem görmüş biyolojik materyalin sıvı azot kullanarak kısa ya da uzun süreli saklanması “kriyoprezervasyon” ya da “dondurarak saklama” şeklinde belirtilmektedir. Herhangi bir kriyoprezervasyon metodunun başarılı olabilmesi için hücrelerin, dondurma ve çözündürme işlemleri sonrasında canlılığını koruyor olması gerekmektedir (Rana, 1995a; Fabbrocini ve diğ., 2000; Chao ve Liao, 2001).

Balıklarda spermanın kriyoprezervasyonu, su ürünleri yetiştiriciliğinde, üreme mevsimi farklı olan türler arasında melezleme çalışmasının yapılmasını, dondurularak saklanmış sperma ile yumurta alındığı anda dölleme işleminin gerçekleştirilmesini, özellikle sperma alımının zor olduğu ve sperma hacminin düşük olduğu türlerde mevcut spermanın tümünün saklanmasını, fotoperiyod yada gün ışığı ile ilgili yapılan çalışmalarla üreme mevsimi dışında yavru elde etmek için sadece dişi bireylerin bakımının yapılmasını ve böylelikle işletme giderlerinin azaltılmasını, çiftlikler arası yada doğadan yakalanan bireylerin yerine gametlerinin taşınmasının kolaylığı, genetik

olarak haritası çıkarılmış ve sperma kalitesinde iyi olarak nitelendirilen bireylerin daha sonraki üretim ve dölleme aşamalarında kullanılması gibi avantajları sağlar. Ayrıca kriyoprezervasyon gen kaynaklarının korunmasında en etkili yöntemdir (Fabbrocini ve diğ., 2000; Suquet ve diğ., 2000; Chao ve Liao, 2001; Cabrita ve diğ., 2009).

Yerel adı Karaca ya da Rus Mersini olan bu balıkların doğal yaşam alanlarını Karadeniz, Azak ve Hazar Denizi oluşturmaktadır. Yumurtasını en çok bıraktığı nehirler olarak Volga ve kolları, Terek, Sulak ve Samur nehirleri, Karadeniz’de ise Tuna ve Dinyeper, Sakarya, Yeşilırmak ve Kızılırmak olduğu bildirilmiştir (Slastenenko, 1956; Edwards ve Doroshov, 1989; Vecsei, 2001; Gisbert ve Williot, 2002).

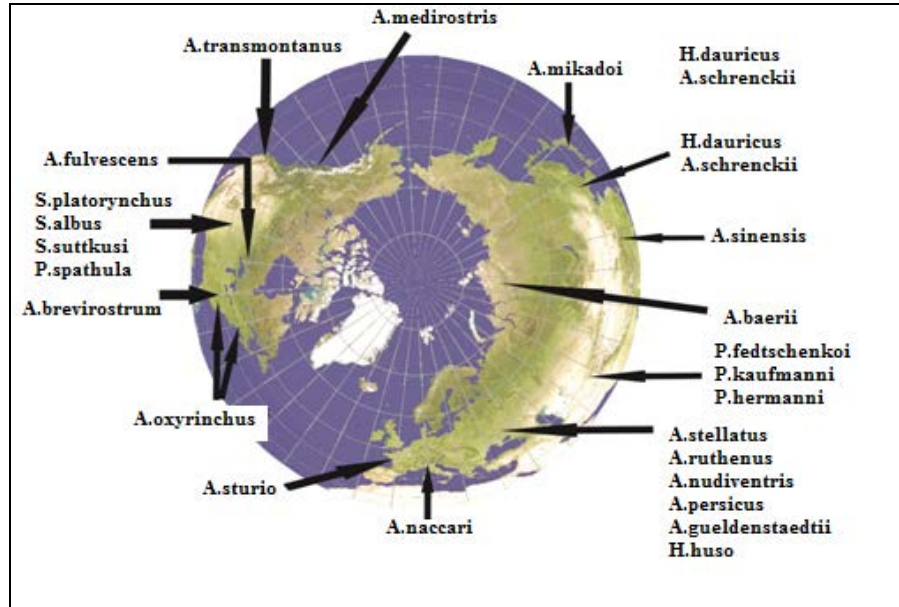
Ülkemizde mersin balıklarından yapay yolla yumurta ve yavru elde edilmesi henüz gerçekleştirilememiştir. Buna karşın İstanbul Üniversitesinin 2001 yılında özel sektör girişimi ile birlikte başlattığı mersin balıklarının yumurtalarına uygun kuluçkahane dizaynı ve Rusya’dan getirilen döllenmiş yumurtalardan larva elde edilerek bunların doğal ortama salınması çalışmaları başarılı bir şekilde yürütülmüştür (Çelikkale ve diğ., 2002; Memiş ve diğ., 2007). Araştırma materyali olarak İstanbul Üniversitesi Sapanca İçsu Balıkları Üretimi Uygulama ve Araştırma Birimi bünyesinde yaklaşık 10 yıldır muhafaza edilen Rus mersin balıklarının beslenme ve bakım çalışmalarının yanı sıra üretim çalışmaları da halen devam etmektedir. Bu balıkların dişi bireylerinden henüz yumurta alımı gerçekleştirilememesine rağmen son iki yıldır bu tez çalışması kapsamında erkek bireylerden sperma alımı başarılı bir şekilde yapılabilmektedir.

Spermanın, sıvı nitrojen içerisinde ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) dondurularak saklanması, akuakültürde yaygın olarak kullanılan modern tekniklerden biridir (Stoss, 1983; Dettlaff ve diğ., 1993; Rana, 1995a; Gwo, 2000; Chao ve Liao, 2001). Mersin balıkları için spermanın dondurularak saklanması standart hale getirilmesi ile ilgili bilimsel çalışmalar günümüzde halen devam etmektedir. Bu tez çalışmasında, *A. gueldenstaedtii* türünden elde edilen taze spermada spermatolojik özelliklerin belirlenmesi, spermanın dondurulması sırasında farklı sulandırıcıların kullanılması ve bu sulandırıcıların çözündürme sonrası spermatozoa motilitesine ve süresine etkilerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. MERSİN BALIKLARI HAKKINDA GENEL BİLGİ

Kuzey yarımkürede Avrupa, Asya ve Amerika’da 2 familya ve 27 tür ile temsil edilen mersin balıkları, kıkırdaklı balıklardan kemikli balıklara geçiş formu olarak değerlendirilmektedir. *Acipenseriformes* takımına dahil olan bu balıklar iki familya ile temsil edilmektedir. Mersin balıkları olarak isimlendirilen “*Acipenseridae*” familyasının 4 genusuna (*Acipenser*, *Huso*, *Scaphirhynchus* ve *Pseudoscaphirhynchus*) ait 25 türü vardır. “Kürek balıkları” ya da “Kaşık ağız” olarak isimlendirilen *Polyodontidae* familyası ise 2 tür ile temsil edilmektedir (Şekil 2.1) (Slastenenko, 1956; Dettlaff ve diğ., 1993; Billard ve Lecointre, 2001; Çelikkale, 2002; Bat ve diğ., 2008; Akbulut ve diğ., 2010).



Şekil 2.1: Mersin balığı türlerinin dünya üzerindeki dağılım alanları (Billard ve Lecointre, 2001; <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/search>)

Bugüne kadar Karadeniz havzasında *Acipenseridae* familyasına ait 7 türün (*H. huso*, *A. gueldenstaedtii*, *A. stellatus*, *A. sturio*, *A. nudiventris*, *A. ruthenus*, *A. persicus*) bulunduğu bildirilmesine rağmen (Geldiay ve Balık, 1988; Pourkazemi ve diğ., 1999; Billard ve Lecointre, 2001; Çelikkale, 2002; Bat ve diğ., 2008), *A. ruthenus* türünün Türkiye'nin Karadeniz sahillerinde bulunup bulunmadığı son yıllarda tartışma konusudur.

Mersin balıkları denizlerin 150 metreye kadar olan derinliklerinde ve bu denizlere bağlı iç sularda yaşarlar. Az tuzlu denizler, tuzlu okyanus suları, nehirler, soğuk göller ve ırmaklar gibi değişik su kaynaklarında yaşayabilmektedirler (Dettlaff ve diğ., 1993; Doroshov ve diğ., 1997; Billard ve Lecointre, 2001; Çelikkale, 2002). Mersin balığı türlerinin çoğu anadromdur ve cinsi olgunluğa eriştikleri zaman denizlerden tatlı sulara göç ederler. *A. ruthenus* ve *A. baerii* gibi türler tüm yaşamlarını tatlı sularda geçirirler. *A. sturio*, *A. oxyrinchus* ve *A. transmontanus* gibi türler belli bir boya ulaştıklarında tamamen denize göç ederler ve kıta sahanlığı içerisinde kalırlar. *A. stellatus*, *A. gueldenstaedtii* ve *H. huso* gibi türler ise Karadeniz, Azak ve Hazar denizi ile bağlantılı nehirlerle göç ederler (Billard ve Lecointre, 2001).

Mersin balıkları morfolojik olarak diğer balıklardan farklılık gösterir. Vücut yapıları fuziformdur. Modern kemikli balıklardan kıkırdaksı iskeletleri ile ayrılırlar. İskeletleri tam olarak kemikleşmemiştir ve iskeletin büyük bir kısmını kıkırdak doku oluşturmaktadır. Sırtta bir sıra, vücudun yan taraflarında birer ve karın bölgesinde iki sıra olmak üzere kemik plakalar bulunur ve bu plakalar baş bölgesinden başlayarak kuyruğa kadar sıralı bir biçimde yerleşmişlerdir (Geldiay ve Balık, 1988; Dettlaff ve diğ., 1993; Doroshov ve diğ., 1997; Çelikkale, 2002).

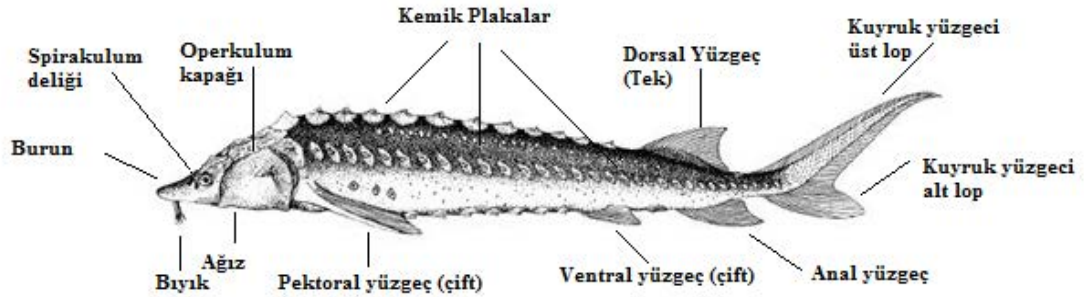
Yüzgeçler kıkırdak ışınlar ile desteklenmektedir ve kuyruk heteroserk tiptedir. Pektoral ve ventral yüzgeçleri çift, dorsal ve anal yüzgeçleri tektir. Dorsal yüzgeci vücudun oldukça gerisinde kuyruğa yakın bir konumdadır. Sırt kısmı koyu siyah veya boz renğinde, vücudun laterali biraz daha açık renk, abdominal bölge ise beyaz ya da gümüş benzeri renktedir. Burun uzamış, ağız yuvarlak, dişsiz ve protraktıl durumdadır. Ağızın önünde, burun uzantısının altında enine bir çizgi üzerinde aşağıya sarkık dört adet bıyık bulunur. Bıyıklar bazı türlerde düz yuvarlak, bazı türlerde ise üzerlerinde küçük

püsküller taşır. Tür tayininde, bıyıkların boyu ve konumları, kemik plaka sayıları ve ağız yapıları önemli kriterlerdir. Balıklarda rostrum ya da burun besin bulmak amacı ile zeminleri kazmakta kullanılır. Gözler vücut büyüklüğüne oranla çok küçüktür ve besinin alınmasında kullanıldığı düşünülmemektedir (Billard ve Lecointre, 2001; Vecsei, 2001; Çelikkale, 2002).

Mersin balığı türlerinin çoğu bentik olarak beslenir. *H. huso* ya da *H. dauricus* gibi türlerin büyük bireyleri ise bentikten veya pelajik balıklar ile beslenmektedirler. Besin alma şekli bentik türlerin ve küçük balık popülasyonunun zenginliğine bağlıdır (Polyaninova ve diğ., 1999). Mersin balıkları diğer balıklardan farklı bir sindirim sistemine sahiptir. Sindirim sistemi kısa bir yemek borusu, bir ön mide ile genişlemiş bir pilorik mide, pilorik keseli ve spiral kıvrımlar ihtiva eden kısa bir bağırsak ve kısa bir rektumdan oluşur. Taşlık benzeri bir yapıya sahip olan pilorik mide dişleri olmayan ve yengeç, midye ve karides gibi kabuklu ve eklem bacaklılarla beslenen mersin balıklarının sindirim sistemlerinin önemli bir kısmını oluşturur. Kısa olan bağırsağın sindirim yüzeyi ise kalınlaşmış bağırsak duvarı, pilorik keseler ve ayrıca bağırsaktaki spiral kıvrımlar sayesinde genişlemiştir. Mersin balıklarında hava kesesi fizostom yapıdadır ve mide ile bağlantılıdır (Dettlaff ve diğ., 1993; Bat ve diğ., 2008; Chebanov ve Galich, 2011).

Bu araştırmada ele alınan *A. gueldenstaedtii* balığı *Acipenser* genusunun Karadeniz, Hazar ve Azak denizi havzalarında en çok dağılım gösteren türlerinden biridir. Bu denizlere dökülen büyük nehirlerde birbirinden bağımsız yerel stokları bulunmaktadır. Yumurtasını en çok bıraktığı nehir Volga ve kolları olan Sheksna, Oka, Vetluga, Kama ve Vishera nehirleridir. Hazar denizinden Terek, Sulak ve Samur nehirlerine sınırlı sayıda bireyler girmektedir. Karadeniz’de ise Tuna ve Dinyeper nehirlerine göç etmekte ve Rioni, Mzymta, Psow ve diğer nehirlerle çok az sayıda birey girdiği bildirilmektedir (Chebanov ve Galich, 2011). Türkiye’de ise son yıllarda Sakarya ve Yeşilırmak nehirlerine az sayıda genç ve olgun bireylerin girdiği rapor edilmiştir (Akbulut ve diğ., 2010).

A. gueldenstaedtii balığının vücudu uzun ve iğ biçimindedir. Dorsal yüzgecinde 27-51, anal yüzgecinde 18-33 ışın bulunmaktadır. Dorsalde yer alan kemiksi plakalar 8-18, lateralinde 24-50 ve ventralinde 6-13 adet arasındadır. Rostrumun şekli *A. gueldenstaedtii* varyateleri arasında değişmektedir. Genellikle toplam boyun %4-6,5'u kadarıdır. Plakalar daha çok dairesel şekle benzemektedir. Vücutta bulunan plakalar arasında bazen dağınık halde küçük plakalarda bulunabilmektedir. Besinleri hissetmesini sağlayan rostrum ucu ile ağız arasında bulunan enine konumlu 4 adet bıyık vardır. Bıyıkları burundan ziyade ağza daha yakındır. Alt dudak ayrık bir haldedir. Dipten beslenen karnivor balıklardır. Bıyıklar ile hissedilen besinler, protraktil özelliğe sahip ağızla birkaç saniye içinde alınır (Şekil 2.2). *A. gueldenstaedtii* balıkları deniz ortamında, sığ sulardaki kabuklularla ve küçük demersal balıklarla beslenirler. Kış aylarında suların soğumasıyla derin sulara doğru göç ederler (Slastenenko, 1956; Bemis ve diğ., 1997; Vecsei, 2001; Chebanov ve Galich, 2011).



Şekil 2.2: Rus mersin balıklarının dış morfolojik özellikleri (Chebanov ve Galich, 2011).

A. gueldenstaedtii türünde yumurtlama göçü Mart-Nisan aylarında başlar ve Kasım ayına kadar sürer. Yumurtlama Hazar havzasındaki balıklar için Mayıs-Haziran aylarında gerçekleşirken (8-14°C) Azak havzasında Nisan-Mayıs aylarında'dır (16-18°C). Yumurtlama nehrin 1-1,5 m/sn akıntı hızına sahip çakıllı ve taşlı bölgelerinde, 4-25 metre derinlikler arasında 9-15°C sıcaklıklarda gerçekleşir. *A. gueldenstaedtii* türünde fekondite 50,000-1,165,000 yumurta/kg'dır (Slastenenko, 1956; Vecsei, 2001; Chebanov ve Galich, 2011).

Anadrom mersin türlerinin dişi bireyleri denizlerden tatlı sulara henüz dinlenme dönemindeki ovaryumlarında bulunan olgunlaşmamış üreme hücreleri ile göçe başlarlar ve gonadlarının IV. olgunluk evresini tamamlamış halde nehirlerle girerler. Bu dişiler

aynı yıl içerisinde yumurtlamaktadırlar. Gonad olgunlaşmasını tamamlamamış, olgunluk evresinin III. ya da IV. evresinde nehirlere giriş yapan balıklar ise ancak bir sonraki üreme döneminde yumurtlarlar. Gonadotropik hormonlar oositlerin olgunlaşmasını ve yumurtanın bırakılmasını uyarırlar. Dişi birey olgunlaşmış yumurtalarını kısmi olarak suya bırakır. Eş zamanlı olarak erkek bireyde spermasını suya bırakır ve döllenme gerçekleşir (Dettlaff ve diğ., 1993).

A. gueldenstaedtii türünün 48 yıl yaşadığı ve 100 kg ağırlığa ulaşabildiği genellikle de 60 kg ve 200 cm boyda bulunduğu bildirilmektedir (Vescei, 2001). Chebanov ve Galich (2011) Karadeniz’de kayıtlara geçen en büyük balığın boyunu 236 cm ağırlığını ise 115 kg olarak rapor etmişlerdir.

2.2. MERSİN BALIKLARINDA ÜREME VE ÜREME FİZYOLOJİSİ

Mersin balıkları ve teleost balıkların gamet morfolojisi karşılaştırıldığında, mersin balıklarında, spermatozoon üzerinde akrozomun ve yumurtanın üzerinde birden fazla mikrofilin bulunması gibi farklılıklar bulunduğu bildirilmiştir (Dettlaff ve diğ., 1993).

Mersin balıklarının dişi bireylerinde yumurtadaki mikrofil sayısı türler arasında farklılık gösterdiği gibi, bir dişi bireye ait yumurtaların her biri de farklı sayıda mikrofil bulundurabilir (Ginzburg, 1972; Podushka, 1993a,b). *A. gueldenstaedtii* türünün yumurtasındaki mikrofil sayısı 52 adet olarak rapor edilmişken (Ginzburg, 1972); *A. baerii*’de bu sayı 3-16 olarak ifade edilmiştir (Debus ve diğ., 2008).

Balıklarda döllenme esnasında spermatozoon mikrofil kanalını geçerek yumurta yüzeyine ulaşır. Döllenmiş yumurta yani zigot diploid kromozom sayısını içermektedir. Mersinlerde bu sayı çok yüksektir. Bazı türlerde $2n=120$ (*H. huso*, *A. sturio*, *A. ruthenus*, *A. stellatus*, *A. nudiventris*) bazı türlerde ise $4n=240$ (*A. gueldenstaedtii*, *A. naccarii*,) kromozom bulunur (Dettlaff ve diğ., 1993; Billard ve Lecointre, 2001).

Bir yumurtanın birden fazla spermatozoon ile döllenmesi polispermi ismini alır ve polispermi mersin balıklarında yaygın olarak görülmektedir (Ginzburg, 1972; Dettlaff ve diğ., 1993). Yetiştiricilik şartlarında mersin balıklarında yumurtanın birden fazla mikrofile sahip olmasından dolayı, dölleme öncesinde, sperma 1:200 (sperma: su)

sulandırılarak yumurta ile işleme tabi tutulur. Mersin balıklarının yumurtaları yapışkan özelliktedir ve yumurtaların yapışkanlığını önleyici olarak “Fuller’s earth” ve “Tannin” gibi maddeler kullanılmaktadır. Yapışkan önleyici madde ile yaklaşık 1 saat süre ile sürekli karıştırılan ve kullanılan maddenin yumurtadan uzaklaşması için kuluçkahane suyu ile yıkanan yumurtalar daha sonra inkübasyon ünitelerine yerleştirilirler (Mohler, 2003; Chebanov ve diğ., 2004; Chebanov ve Galich, 2011).

Mersin balıklarında doğal şartlarda döl verme yaşı erkek bireylerde 8-13 yaş, dişi bireylerde 10-16 yaş arasında değişmektedir (Dettlaff ve diğ., 1993; Hochleithner ve Gessner, 2000; Chebanov ve diğ., 2004). Günümüzde kuluçkahane şartlarında üretilen mersin balıklarının olgunlaşma yaşı su sıcaklığının yüksek olması durumunda daha erkene alınabilmektedir (Doroshov ve diğ., 1997; Chebanov ve Billard, 2001).

Cinsi olgunluğa erişmiş mersin balıkları her yıl üremezler. Yumurta ve sperma bırakma aralığı, dişiler için 2-11, erkekler için 1-6 yıl’dır (Tablo 2.1). Çiftlik şartları altında *A. baeri* dişilerinin %25’i her yıl yumurta bırakırken %54’ü iki yılda bir, %11’i üç yılda bir yumurta bırakır. Gonadosomatik indeks erkeklerde %3-9 iken, dişilerde %10-25’dir (Dettlaff ve diğ., 1993; Billard ve Lecointre, 2001; Chebanov ve Galich, 2009). Mersin balıklarında cinsiyet farklılaşması en erken 1-3 yaşları arasında tespit edilebilmektedir (Doroshov ve diğ., 1997; Hurtvitz ve diğ., 2007; Chebanov ve Galich, 2009).

Tablo 2.1: Mersin balıklarında cinsi olgunluğa ulaşma yaşı, boy ve ağırlık değerleri ile iki üreme sezonu arasındaki zaman farkı (Billard ve Lecointre, 2001; Chebanov ve Galich, 2009).

Tür	Üreme Yaşı (Yıl) Dişi/Erkek	Ağırlık (kg) Dişi/Erkek	Boy (cm) Dişi/Erkek	Üreme aralığı (Yıl) Dişi/Erkek
<i>A. gueldenstaedtii</i>	12-16/11-13	3/9	100/120	5/2-3
<i>A. stellatus</i>	9/7	9-10/3-4	120/105	4-3
<i>H. huso</i>	19-22/14-16	60/30	200/160	5-6/3-4

2.2.1. Mersin Balıklarında Dişi ve Erkek Ayrımı

Mersin balıklarında seksüel dimorfizm dış gözlem ile ayırt edilemez (Dettlaff ve diğ., 1993; Doroshov ve diğ., 1997). Günümüzde, mersin balıklarında cinsiyet belirlemede çeşitli teknikler uygulanmaktadır. Bu teknikler arasında biyopsi, endoskopi, steroid profil analizi, ultrasonografi ve morfometri tekniği gibi yöntemler bulunmaktadır (Chebanov ve Galich, 2009).

Biyopsi yönteminde, özel bir prop ile vücudun ventralinden ya da yan kasları delerek gonadtan ufak bir parça alınır (Şekil 2.3; 2.4). Kontrollü olarak beslenen balıklarda ovaryum yağ doku ile beraber bulunduğundan, yumurta örneği almak zorlaşmaktadır. Bu nedenle olgun dişilerden yumurta örneği alma gonad olgunluğunun II, III. ve IV. evresinde uygulanmaktadır (Chebanov ve Galich, 2009).



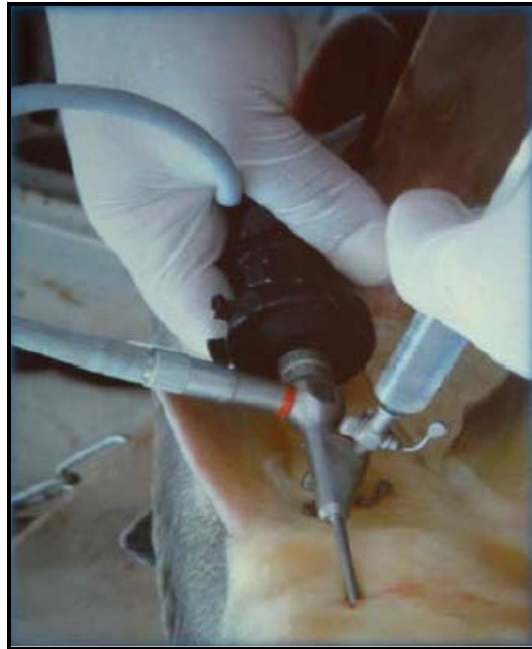
Şekil 2.3: Biyopsi aleti (A) ve biyopsi yöntemi ile alınmış yumurtalar (B) (Chebanov ve Galich, 2009)



Şekil 2.4: Biyopsi yönteminin balık vücudunun farklı bölgelerinde kullanımı (Chebanov ve Galich, 2009)

Olgun dişi bireylerin tespit edilmesinde oosit çapının belirleyici olarak kullanılması önerilmektedir. Örneğin *A. baerii* türünde, dişi bireylerde oosit çapının 2,8 mm'den fazla olması, bu bireylerin birkaç ay içerisinde olgunluğa ulaşacağının göstergesidir (Chebanov ve Galich, 2009).

Endoskopi yöntemi, mersin balıklarında gonad çalışmalarında en yaygın olarak kullanılan metottur. Bu teknik, ürogenital sistem hastalıklarının tedavi çalışmalarında cerrahi kontrol aletinin kullanımına izin verir. Bu alet “sitoretroskop” ya da “boroskop” adını almaktadır. Bu teknik, boroskop probunun, vücudun ventral bölümünde açılan delikten ya da ürogenital açıklıktan sokulması esasına dayanır (şekil 2.5). Aletin bağlı olduğu fiberoptik sistem, gonadın görüntülenmesine izin verir. Doku renkleri ve yapıların detayları optik sistem ile gayet net bir şekilde görüntülenmektedir (şekil 2.6) (Kynard ve Kieffer, 2002; Chebanov ve Galich, 2009). *A. gueldenstaedtii* türünde endoskopi yöntemi ile cinsiyet ayrımı yaygın olarak kullanılmaktadır (Jackson ve diğ., 2006; Hurvitz ve diğ., 2007).



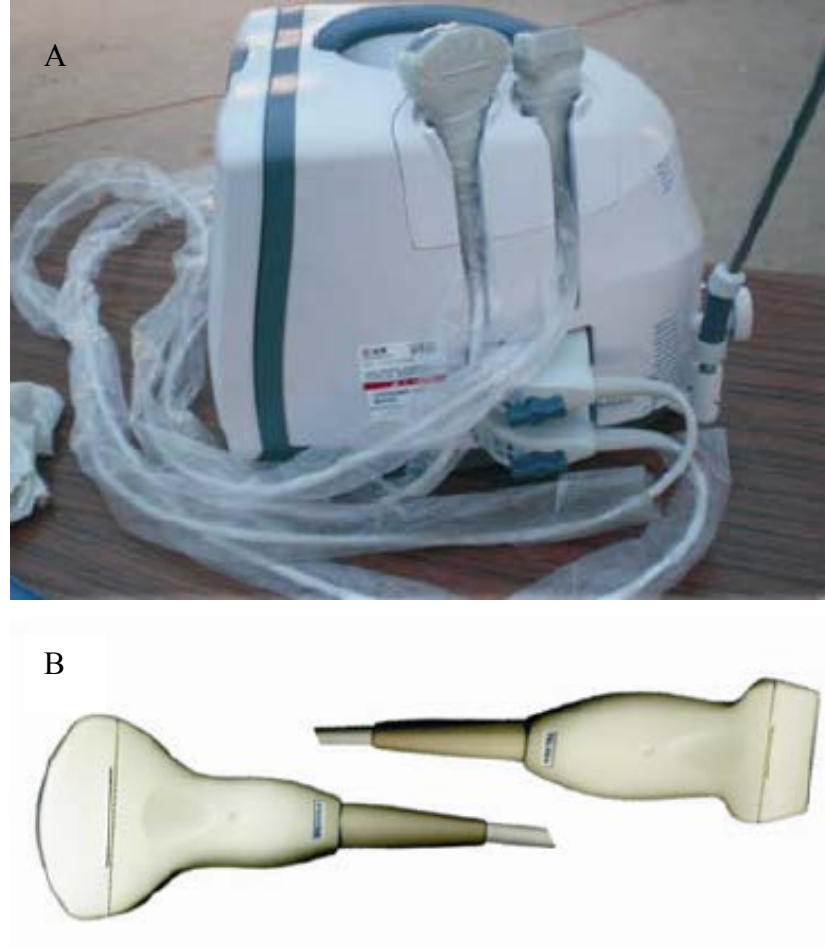
şekil 2.5: Endoskopinin uygulanışı (Kynard ve Kieffer, 2002)



Şekil 2.6: Endoskopi aletinin detaylı görünümü (Kynard ve Kieffer, 2002)

Cinsiyet steroid profil analiz yönteminde ise kandaki cinsiyet steroidlerinin seviyelerinin ölçülmesi esastır. *A. stellatus*'un genç bireylerinde, balıklar 12 aylıkken cinsiyet steroid seviyesinin ölçülmesi ile balıklarda cinsiyet farklılaşması ortaya konulmaktadır. *A. transmontanus* balığında erkek bireylerdeki kandaki testesteron seviyesi dişilerden daha yüksektir. Bu bilgi cinsiyet tayinin erken dönemde yapılmasına ve olgunluk evresinin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Chebanov ve Galich, 2009). Ayrıca bu yöntem *A. gueldenstaedtii* (Artyukhin ve diğ., 2006; Barannikova ve diğ., 2006), *A. stellatus* (Bayunova ve diğ., 2006), *A. ruthenus* (Semenkova ve diğ., 2006) ve *A. persicus* (Malekzadeh ve diğ., 2006) türlerinde de kullanılmaktadır.

Ultrasonografi metodu ise cinsiyet ayırımında ve olgunlaşma safhasının belirlenmesinde kullanılan en yeni ve etkili tekniktir. Bu yöntemle balık 1-2 yaşında iken dişi/erkek ayrımı ve gonad gelişim evrelerinin tespiti yapılabilmektedir (Şekil 2.7) (Chebanov ve Galich, 2009).



Şekil 2.7: Ultrasonografi aleti (A) ve propları (B) (Chebanov ve Galich, 2009)

Morfometrik yöntem ile cinsiyet tayini dişi ve erkek Bester hibridlerinde (*H.husoxA.ruthenus*) ürogenital bölge morfometrisi ile kafatası ölçümlerinde uygulanmaktadır. Bu teknik deneysel amaca yönelik olduğundan yaygın kullanılmamaktadır (Chebanov ve Galich, 2009).

Tüm bu tekniklerin yanısıra üreme döneminde bireylerin baş üzerinde oluşan beyazımsı bölgeleri incelenerek, bu bireylerin üreme olgunluğuna erişen erkek anaçlar olduğuna karar verilebilmektedir. Ancak bu yöntem *A. stellatus*'ta ve *H. huso*'da uygulanmamaktadır (Chebanov ve diğ., 2004; Chebanov ve Galich, 2009).

2.2.2. Erkek Balıkta Üreme Fizyolojisi

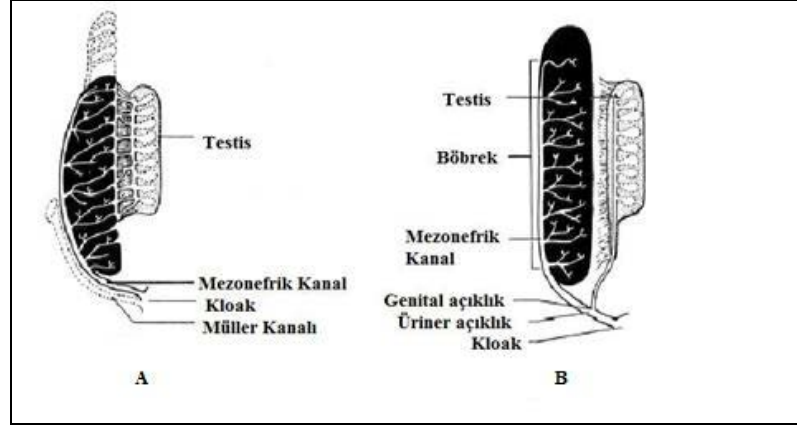
Üreme sistemi, gonadlar ve gonadların kanallarından oluşmaktadır. Balıklarda ovaryum ve testisler sölomun mediyo-dorsalinde uzunlamasına ve çift olarak bulunmaktadır.

Gonadlar sölomun dorsal çeperine mezenterler ile bağlıdırlar. Ovaryumu bağlayan mezentere mezovaryum, testisi bağlayana ise mezokiryum denmektedir (Demir, 2006).

2.2.3. Testisler ve Kanal Sistemi

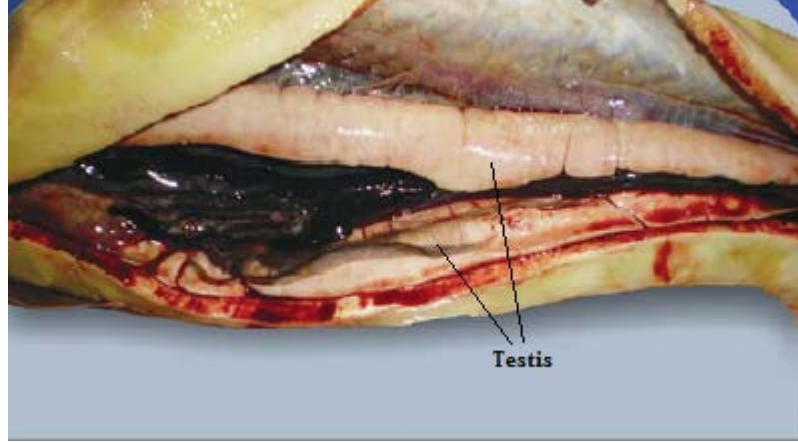
Testisler, çevreleri ince bir bağdokusu ile sarılmış olan sayıca fazla spermatogenetik birimleri içermektedir. Bu birimler, birbirleri ile bir kanal açı ile bağlantılıdır. Spermatogenetik birimler germinal ve interstisyel olarak iki bölüme ayrılır. İnterstisyel bölge testise kan sağlayan kılcal damarlar, kas hücreleri, fibroblast ve androjen salgılayan tek yada küçük gruplar halinde lobüller arasında bulunan Leydig hücrelerini (Testiste seminifer-seminiferus, sperma yapıcı-tüpcükleri arasında bulunan, testosteron hormonu salgılayan hücreler) içerir. Germinal bölüm germ hücreleri ve somatik Sertoli hücrelerini (Testislerde bulunan, sperm hücrelerini koruma ve besleme görevi olan, piramit şeklindeki büyük hücreler) içerir. Germ hücreleri spermatogenik hücrelerin tüm farklılaşma aşamalarındaki hücreleri (spermatogonia, spermatosit, spermatid ve sperm) içerir (İsmihan Karayücel, kişisel görüşme). Sperm hücreleri bu birimler içerisindeki ana hücrelerden yani spermatogonyumlardan spermatogenesis sonucu oluşurlar (Hoar, 1969; Ginzburg, 1972; Demir, 2006; Timur, 2006).

Mersin balıklarında böbrekler ile testisler arasında bağlantı vardır. Bu bağlantı opistonefrozun önünden başlar ve geniş bir bölgeye yayılır. Testislerde oluşan sperma efferent kanalcıklarla opistonefrozun biçim değiştirmiş tüpcüklerinden geçtikten sonra opistonefrik kanala gelirler ve opistonefrik kanal hem spermayı hem de idrarı dışarı atar (Demir, 2006). Testisler sperma kanalı ile sonlanmaz, idrar kanalında idrar ile karışarak dışarıya aynı kanaldan atılırlar. Teleostlarda ise böbrek ile gonadlar arasında bir bağlantı yoktur ve sperma kanalı idrar kanalından ayrılmıştır (Şekil 2.8) (Hoar, 1969; Wrobel ve Jouma, 2004).



Şekil 2.8: Mersin balıkları (Acipenser) (A) ve kemikli balıklarda (B) testisler ve böbreğin ilişkisi (Hoar, 1969).

Mersin balıklarında her bir testis sindirim sisteminin sağında ve solunda yer almaktadır ve ovaryumlardan farklı olarak bağ doku ile çevrilmiş durumdadır. Mersin balıklarında testis lobular yapıdadır. Mersin balıklarının testislerinin 5 safha geçirerek olgun duruma geldiği bildirilmektedir. Buna göre M1 olarak adlandırılan ilk safhada testisler sütü beyaz görünümündedir. İkinci olgunluk safhasında (M2) beyaz yada pembemsi beyaz renk alır. İkinci olgunluk safhası yarı yağlı ve yağlı olarak iki evrede tamamlanır. M2sf olarak adlandırılan yarı yağlı evrede testiküler dokunun yarısı kadar yağ ile kaplandığı gözlemlenir. M2f ise yağlı evredir ve testiküler doku bu evrede tamamen yağ ile kaplıdır. Olgunluk safhası M3 evresi ise çok kısa sürer. Testiküler dokuda bulunan yağ, cinsiyet hücrelerinin oluşumunda kullanılır. Dördüncü safhada (M4) spermatogenesis süreci tamamlanır (Şekil 2.9). Testisler açık süt rengini alır ve yağların hemen hemen tükendiği görülür. Son safhada ise (M5) sperma vermeye hazır hale gelirler (Chebanov ve Galich, 2009; Chebanov ve Galich, 2011).



Şekil 2.9: *A. gueldenstaedtii* türünde M4 safhasında testisin görünümü (Chebanov ve Galich, 2009).

2.2.4. Endokrin Düzen ve Spermatogenesis

Erkek balıklarda spermatozoa sperm ana hücreleri veya spermatogonia adı verilen hücrelerden oluşur. Spermatogonia hücrelerinden spermatozoa oluşumuna kadar geçen olaylar zincirine sitoloji bilim dalında “Spermatogenesis” adı verilmektedir (Hoar, 1969; Ginzburg, 1972; Demir, 2006; Timur, 2006).

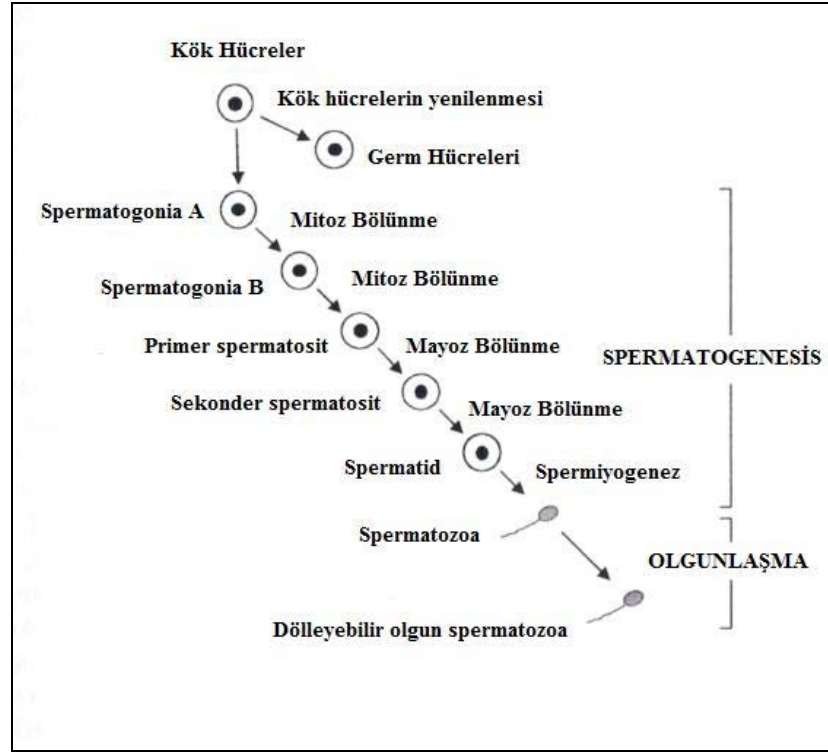
Erkek gonadı yani testis germinal ve somatik dokulardan oluşmaktadır. Germinal hücreler olgun gametleri yani spermatozoayı oluşturmak için spermatogenesis süresince gelişirler. Somatik doku, seminiferus tubülleri ve destekleyici bağ dokuyu oluşturmakla beraber aynı zamanda özelleşmiş somatik hücreler olan “Leydig” ve “Sertoli” hücrelerini meydana getirir. Leydig ve Sertoli hücreleri, germinal hücreleri yapısal ve işlevsel olarak destekler ve hormon üretiminde, üreme hücreleri olan germ hücrelerinin farklılaşması, gelişmesi ve canlılığında büyük önem taşırlar (Hoar, 1969; Ginzburg, 1972; Billard ve diğ., 1995a; Schulz ve Miura, 2002).

Sertoli hücreleri germ hücrelerini sarmaya başlar, testisin germinal epitelini meydana getirirler ve germinal dokunun dokular arası bulunan bölümünden ayrılmış olan temel taban zara bağlanırlar. Dokular arasındaki bu bölüm somatik hücrelerden oluşmuştur ve Leydig hücreleri bu bölüm ile seminiferus tubüller arasında yer almaktadır. Leydig hücreleri de Sertoli hücreleri gibi endokrin hücreler olarak özelleşmiştir ve üreme hücrelerinin gelişimi için gerekli olan hormon üretiminde rolü çok önemlidir (Hoar, 1969; Ginzburg, 1972; Billard ve diğ., 1995a; Schulz ve Miura, 2002).

Spermatogenesis üç ana safhaya ayrılmaktadır. Bunlardan ilki, spermatogoniaların mitoz bölünmesi, ikincisi spermatositlerin mayoz bölünmesi ve en sonuncusu ise haploid spermatidlerin flagellalı spermatozoon'a dönüştüğü üçüncü evredir. Germ hücreleri sırası ile spermatogonia A ve B, primer spermatosit ($2n$) ve sekonder spermatosit (n), spermatid ve spermatozoa'ya doğru çeşitli gelişim evrelerini geçirirler (Şekil, 2.10). Bu gelişim evrelerinin her biri testisin gelişim evresi ile paralel olarak ilerlemektedir. Gonad gelişiminin başlamasından önce olgun olmayan testis spermatogonial kök hücrelerinden mitoz bölünme ile hızla çoğalan spermatogoniaları içermektedir. Bu evre süresince testiste kök hücrelerin popülasyonu artar. Bazı spermatogonial kök hücreleri spermatogenesis evresine girer ve spermatogonia üretimine geçiş yapar. Spermatogonialar mitoz bölünme evresi süresince türe bağlı olarak 5'ten 15'e kadar değişen sayıda mitoz bölünme evresi geçirir. Bu bölünmelerde sitokinez tamamlanmamakta ve oluşan yeni hücrelerin birbirleri arasındaki sitoplazma bağı varlığını devam ettirmektedir. Oluşan bu hücreler kümeler oluşturur ve bu kümelere "Spermatosist" denir. Kümeler birbirlerinden bir duvar ile ayrılmaktadır. Mitoz bölünme süresince, spermatogonialar ilk olarak yavaş bir bölünme evresine (Spermatogonia A) daha sonra hızlı bir bölünme evresine (Spermatogonia B) girerler. Spermatogonia B'lerin son mitoz bölünmesi ile mayoz bölünmeye başlayacak olan primer spermatositler oluşur. Buna da ikinci evre denmektedir. İkinci evre süresince spermatositler, DNA duplikasyonunu ve genetik bilginin oluşumunu içeren ilk mayoz bölünmeye uğrarlar ve sekonder spermatositlerin meydana gelmesi ile devam eder. Spermatositlerin ikinci mayoz bölünmesinde DNA duplikasyonu meydana gelmez ve bu bölünmede haploid üreme hücreleri yani spermatidler oluşur (Şekil 2.10) (Hoar, 1969; Ginzburg, 1972; Billard ve diğ., 1995a; Schulz ve Miura, 2002).

Spermatidler spermiyogenez evresine yani üçüncü evreye girerler ve bu evrede haploid spermatidler flagellalı spermatozoalara dönüşürler. Üçüncü evrede hücre bölünmesi görülmez fakat hücrelerin sitoplazmik içeriğinin dışarıya çıkışı ve nükleustaki yoğunlaşmadan dolayı hücre büyüklüğünde azalma ile sonuçlanan hücre dönüşümü meydana gelir. Buna ilaveten orta kısım ve flagellanın oluşumu bu safhadadır. Spermatogenesisin tamamlanması ile flagellalı spermatozoa testiküler boşluk yada kanal içerisine bırakılırlar. Burada spermatozoa olgunlaşma evresine geçerler ve dölleme yeteneğini kazanırlar. Kanal sisteminin özel salgısıyla birleşerek "süt" (milt)

adı verilen spermayı oluştururlar. Oluşan bu yapı uygun evre şartları sağlanıncaya kadar dinlenme durumunda kalır (şekil 2.10) (Hoar, 1969; Ginzburg, 1972; Billard ve diğ., 1995a; Schulz ve Miura, 2002; Mananos ve diğ., 2009).



şekil 2.10: Balıklarda spermatozoa oluşumu ve olgunlaşması (Mananos ve diğ., 2009)

Üreme dönemi, beyin-bez-gonad eksenini boyunca hormonların artması ile organize edilen bir dönemdir ve bu sebeple “Üreme eksenini” adını alır. Bu ekseninde; Hipofiz gonadotropinleri, Follikül uyarıcı hormon (FSH) ve Luteinizing hormon (LH), endokrin sistemin kontrolünde ana görevli yapılardır. Gonadotropinlerin salgılanması, Gonadotropin-releasing hormonun (GnRH) uyarıcı etkisi ile beraber beyin tarafından kontrol edilir ve gonadotropinlerin salgılanması üremenin ilk basamağını oluşturur. Spermatogenesis ve olgunlaşma hipofiz gonadotropinleri ile düzenlenir fakat testis tarafından salgılanan steroidlerin çalışmasında çok kuvvetli bir etkisi vardır. Spermatogenesisi bir androjen olan 11-ketotestesteron, spermatozoa olgunlaşmasını ise olgunlaşmayı uyaran (maturation-inducing) steroid düzenler. Her iki steroid de hipofiz gonadotropinlerinin etkisi ile testisin somatik hücreleri tarafından sentezlenir. LH Leydig hücrelerinde androjen üretiminden, FSH ise Leydig hücrelerinde androjen üretimi uyarılmasından sorumludur. Ayrıca FSH spermatogenesis süresince sertoli

hücrelerinin işlevlerini düzenler. Erkek bireylerde FSH'in seviyesi spermatogenesis başlangıcında yüksektir, testisin olgunlaşma sürecinde maksimuma çıkar ve spermanın bırakılmasından sonra azalmaya başlar. LH seviyesi ise spermatogenesis başlangıcında düşüktür, testisin gelişmesi sürecinde artmaya başlayarak üreme döneminde maksimuma ulaşır. Olgunlaşmayı uyaran steroid ise spermatozoanın olgunlaşmasında görevlidir fakat etkisi direkt spermatozoa üzerine değildir. Özel enzimlerin aktivasyonunu sağlayarak seminal plazmanın pH artışına neden olur ve buda spermatozoanın dölleme yeteneği kazanmasını sağlar (Hoar, 1969; Ginzburg, 1972; Billard ve diğ., 1995a; Schulz ve Miura, 2002; Mananos ve diğ., 2009).

2.2.5. Seminal Plazma ve Spermatozoa

2.2.5.1. Seminal Plazma

Seminal plazma spermatozoa için gerekli tüm maddeleri içeren basit bir yapıya sahiptir. Seminal plazmanın esas rolü çoğu zaman uzun süre *in vivo* olarak muhafaza edilmesi gereken spermatozoa için uygun çevresel şartları oluşturarak saklanmasını sağlamaktır. Bu çevresel şartlar, uygun seviyede ozmotik basınç, iyon konsantrasyonu, pH ve spermatozoayı koruyan proteinlerden oluşmaktadır. Spermatozoanın dölleyebilme yeteneği, motilitesi ve canlılığı bu muhafaza süresince korunmak zorundadır. Ayrıca mersin balığı spermatozoasında bulunan akrozomda seminal plazma içerisinde korunmaktadır (Ginzburg, 1972; Billard ve diğ., 1995a; Ciereszko, 2007; Lahnsteiner ve diğ., 2008; Mananos ve diğ., 2009).

Seminal plazma bir çok balıkta testislerden ya da sperma kanalından salgılanır. Balık seminal plazması yüksek omurgalılar ile karşılaştırıldığında, hem düşük protein içeriği hem de sodyum, magnezyum, kalsiyum, potasyum gibi ana mineralleri ve hormon, kolesterol, gliserol, serbest aminoasitler, vitamin, şeker, sitrik asit ve yağ gibi organik maddeleri düşük miktarda içermesi ile karakterize edilir (Billard ve diğ., 1995a; Ciereszko, 2007; Lahnsteiner ve diğ., 2004; Li ve diğ., 2009; Mananos ve diğ., 2009).

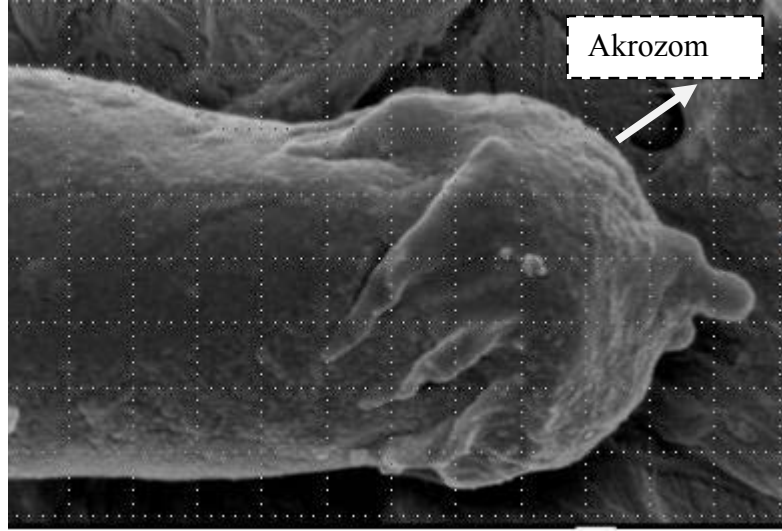
Seminal plazmanın spermatozoayı korumak kadar spermatozoayı hareketsiz (immotil) olarak tutma özelliğide vardır. Üreme sezonunda su ortamına bırakılan spermatozoalar hareketli hale geçerler. Doğal şartlara bırakılan ya da suni aktivasyon solüsyonları ile sulandırılan spermada iyon konsantrasyonu, ozmolarite ve pH önemlidir. Bu

parametreler hücre membranını depolarize ederek flagella hareketini dolayısı ile motiliteyi başlatır (Morisawa ve Suzuki, 1980; Morisawa ve diğ., 1983; Lahnsteiner, 2003; Cosson, 2004; Ciereszko, 2007). Tatlı su teleostlarının seminal plazmasının iyon konsantrasyonu, hem tatlı su hem deniz *Chondrostei* türlerinden her zaman daha fazladır (Mims, 1991; Toth ve diğ., 1997; Cosson, 2004).

2.2.5.2. *Spermatozoon*

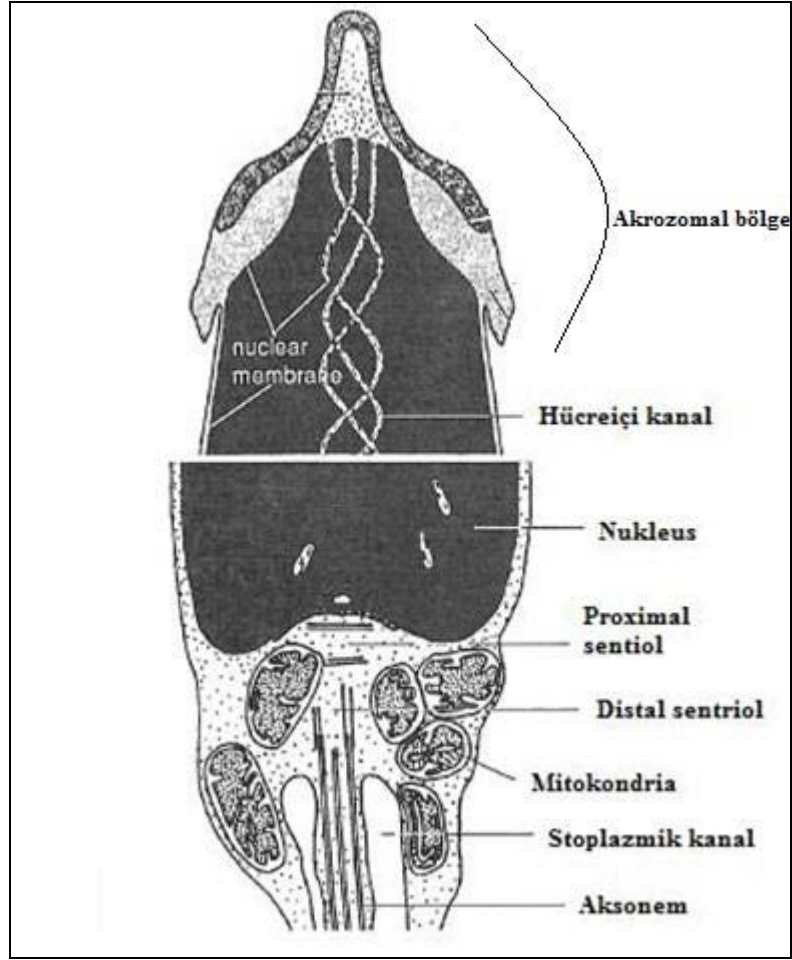
Tek bir sperm hücresi olan spermatozoon, erkekteki haploid kromozom setini yumurtaya taşımak ile görevlidir. Mersin balığının spermatozoon'u dört farklı bölümden oluşur. Bunlar; akrozom, baş, orta kısım ve flagellum'dur (Dettlaff ve diğ., 1993; Cosson, 2004; Cosson, 2007a; Lahnsteiner ve Patzner, 2007). Baş kısmı nukleustan oluşur ve bu yüzden DNA materyalini içermektedir. Birçok teleost balıkta spermatozoon başı küre biçimine yakın, tamamen küre şeklinde, oval biçiminde iken bazı teleostlarda ve mersinlerde çubuk benzeri bir yapıya sahiptir (Ginzburg, 1972). Mitokondria orta kısımda yer almaktadır ve flagella hareketi için gerekli enerjiyi iletir. Flagella, spermatozoonun motoru olarak görev yapmaktadır (Dettlaff ve diğ., 1993; Lahnsteiner ve Patzner, 2007; Cosson, 2007a).

Mersin balığı spermatozoonun küre şeklindeki başı, akrozomun yer aldığı ön bölgenin sonuna doğru konikleşir. Spermatozoon baş kısmının yüzeyinden dışa doğru dallanmış "Akrozom" denilen yapılar vardır ve bu yapılar akrozomal bölge ile sınırlanır. Spermatozoondaki bu karmaşık yapılar genellikle baş yüzeyine basık haldedir ama bazı durumlarda baş bölgesinden ayrılmıştır (Şekil 2.11) (Dettlaff ve diğ., 1993; Psenicka ve diğ., 2009).



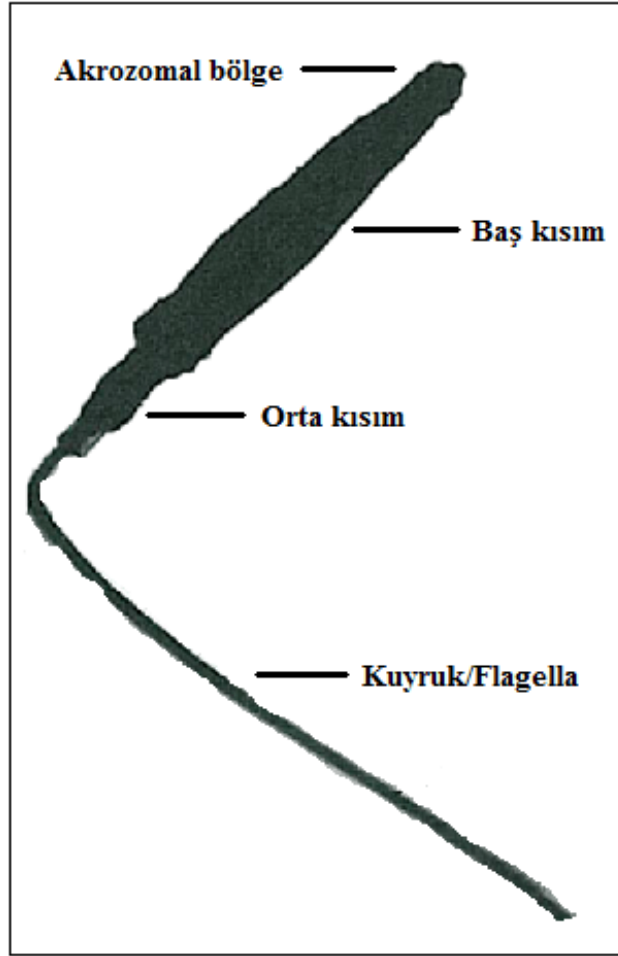
Şekil 2.11: *A. ruthenus* türünde spermatozoon'daki Akrozom görünümü (Psenicka ve diğ., 2009)

Spermatozoon başının geri kalan kısmı nukleus ile doludur. Spiral şeklinde üç kanalın bulunduğu bu kısım merkezdeki nukleusun yerinde kalmasını sağlayan bir kanal ile sınırlandırılmıştır. Bu kanallar akrozomal bölgenin altından başlar ve nukleusun içine girer. Orta kısım “C” şeklinde bir ya da iki mitokondrial cisimcikle çevrelenmiş sentriyolar sistemi içerir ve 1 μm uzunluğundadır. Yakın (Proximal) olan sentriyol basit yapıdadır ve diğer bir çok hayvan spermatozoon'u gibi uzun diklemesine eksenden başın boylamasına eksenine, uzak (Distal) olan sentriyol ise yakın olana dikey olarak konumlanmıştır (Şekil 2.12) (Dettlaff ve diğ., 1993; Jamieson, 1991; Cosson, 2007a).

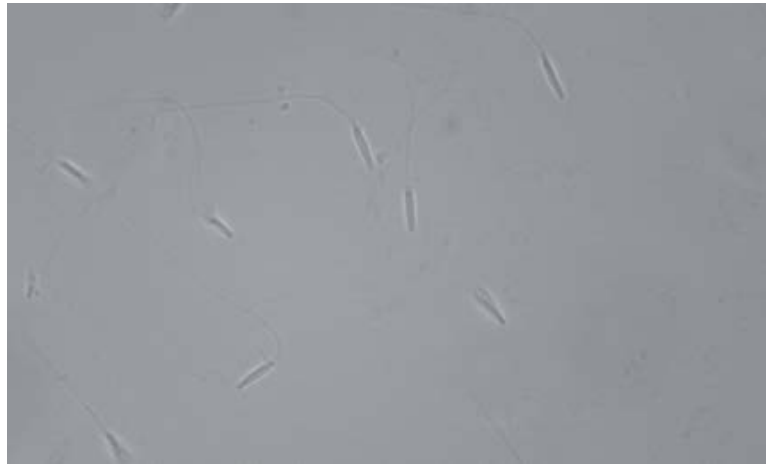


Şekil 2.12: Spermatozoon baş yapısı (*A. transmontanum*) (Jamieson, 1991)

A. gueldenstaedtii türünün spermatozoonunun baş kısmının uzunluğu 8,9 μm , genişliği 1,9 μm ; baş kısım, orta kısım ve flagella toplam uzunluğu ise 58 μm 'dir (Şekil 2.13) (Jamieson, 1991; Dettlaff ve diğ., 1993). Araştırmada kullanılan *A. gueldenstaedtii* erkek anaçlarından elde edilen spermatozoanın baş ve kuyruk kısmının görüntüsü Şekil 2.14'te verilmiştir.

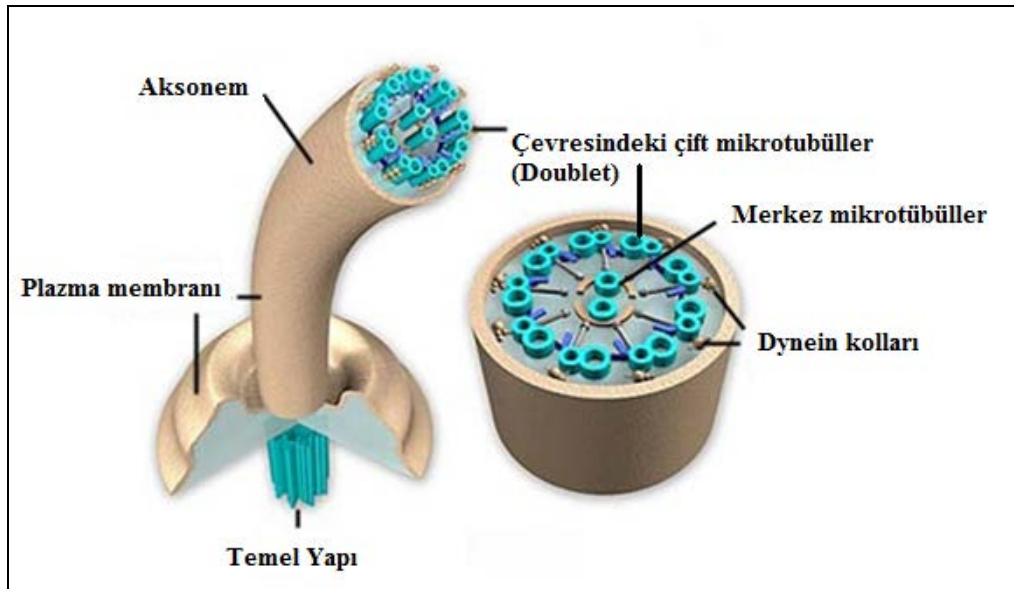


Şekil 2.13: *A. gueldenstaedtii* spermatozoon'u ve bölümleri (Dettlaff ve diğ., 1993)



Şekil 2.14: Çalışmada kullanılan *A. gueldenstaedtii* balığının spermatozoa görünümü (x200)

Spermatozoonun flagellasında mikrotübül esaslı bir yapı vardır ve bu yapı “Aksonem” ismini alır. Aksonem yaklaşık 250 proteinden oluşmaktadır ve motor proteinleri adı da verilen “dynein” proteini içermektedir. Aksonemde merkezde bir çift, çevresinde ise 9 çift mikrotübül bulunur ve bu yapı $9(2)+2$ şeklinde ifade edilir. Merkezdeki çift mikrotübül ve çevresinde çift mikrotübüller (doublet) arasındaki bağlantı radial kollar ile sağlanmakta ve çevredeki her bir mikrotübül çifti birbirine dynein kolları ile tutunmaktadır. Plazma membranı ile çevrili bu yapı, spermatozoonun hareket etmesini sağlar. Flagellanın hareketi dıştaki çift mikrotübüllerin motor proteinleri ile kaydırılması sonucu gerçekleşir (Şekil 2.15) (Inaba, 2003; Cosson, 1996; Cosson, 2007b).



Şekil 2.15: Spermatozoon flagellasındaki aksonem ve mikrotübüller (Cosson, 1996)

2.2.6. Hormon Uygulamaları

Yetiştiricilik şartlarında gametlerin olgunlaşması doğal şartlardaki gibi gonadotropik hormonların etkisi ile sağlanır. Yetiştiricilik şartlarında, döllenme için uygun şartların düzenlenmesinin yanı sıra dişi ve erkek bireylerde gonadotropik hormonların kandaki seviyelerinin artırılması da gerekmektedir (Dettlaff ve diğ., 1993). Yetiştiricilik koşullarında üretilen mersin balıklarında üreme sezonunun başlangıcında erkek bireylerden elde edilen sperma miktarının az olması nedeni ile sperma üretimi hormon ile uyarılır (Van Eenennaam ve diğ., 1996).

Mersin balıklarının kontrollü üretiminde sperma ve yumurta elde etmek için çeşitli hormonlar kullanılmaktadır. Bu hormonlar; Sazan hipofizi (Gallis ve diğ., 1991; Billard ve diğ., 1999; Williot ve diğ., 2000; Linhart ve diğ., 2000; Urbanyi ve diğ., 2004; Horvath ve diğ., 2005; Park ve Chapman, 2005; Alavi ve diğ., 2008; Psenicka ve diğ., 2008a,b; Dzyuba ve diğ., 2010; Boryshpolets ve diğ., 2011), özel firmalar tarafından yapılan Ovopel ismi verilen GnRH ve metoclopremid içeren hormonlar (Glogowski ve diğ., 2002; Linhart ve diğ., 2002; Piros ve diğ., 2002; Rzemieniecki ve diğ., 2004; Sarosiek ve diğ., 2006), Mersin balığı hipofizi (Tsvetkova ve diğ., 1996; Alavi ve diğ., 2004a; Noveiri ve diğ., 2006; Alipour ve diğ., 2009) ve LH-RH hormonu'dur (Brown ve Mims, 1999; Cosson ve diğ., 2000; Linhart ve diğ., 2000; Linhart ve diğ., 2003; Horvath ve diğ., 2006; Linhart ve diğ., 2006; Liu ve diğ., 2006).

2.3. SPERMATOLOJİK ÖZELLİKLER

Balıklarda, spermatolojik özellikler incelendiğinde aynı familyanın türleri arasında görülen farklılıklar aynı türün bireyleri arasında da görülebilmektedir. Bu farklılıkların sebepleri olarak; spermanın değişik yöntemler ile elde edilmesi, sperma üretimini hızlandırmak için kullanılan hormonlar, bu hormonların uygulanış biçimi, sperma üretimi ve olgunlaşması süresinde endokrin sisteminin yapısı, anaç balıkların beslenme rejimi, sperma alımının sıklığı ve zamanı ve anaç stokların orijini gösterilmektedir (Rana, 1995a,b; Dabrowski ve Ciereszko, 2001; Piros ve diğ., 2002; Linhart ve diğ., 2003; Alavi ve diğ., 2005).

2.3.1. Spermanın Elde Edilmesi

Mersin balıklarında spermanın alınmasında genellikle spermanın su ve mukus salgısı ile kontaminasyonunu önleyecek teknikler uygulanmaktadır. En iyi sonuç; PVC materyalinden yada kırmızı kauçuktan yapılmış üretral kateter setlerinin kullanımındır. Basit bir set 5 farklı kalınlığı içeren 10 kateter'den oluşur. Sperma alımı için genital açıklıktan sokulan kateterin genital açıklık girişine zarar vermemesi için balığa uygun kalınlıkta seçilmesi gerekmektedir. Bu kateter büyük hacimli bir enjektörün ucuna takılır (Şekil 2.16) (Chebanov ve diğ., 2004).



Şekil 2.16: Mersin balıklarında sperma alımında kullanılan kateter

2.3.2. Sperma Rengi

Mersin balıklarında sperma rengi ile ilgili herhangi bir renk skalası bulunmamasına rağmen, “süt beyazı” ve “su rengi” olarak değerlendirilen spermada, spermatozoa yoğunluğu ile ilgili çıplak gözle gözlem yapmaya yarayan yöntem kullanılmaktadır. Renk olarak su benzeri bir yapıya benzeyen spermada 1 ml’de 1×10^9 ’dan daha az spermatozoa, süt benzeri renge sahip olan spermada $1-2 \times 10^9$ spermatozoa ve sarıya kaçan süt benzeri renge sahip olanlarda ise 2×10^9 spermatozoa bulunduğu bildirilmektedir (Dettlaff ve diğ., 1993).

2.3.3. Sperma Miktarı

Mersin balıklarında üreme sezonu süresince, birey başına düşen toplam sperma miktarı fazladır. Mersin balıklarında sperma miktarının türe bağlı olarak 25-1000 ml/birey arasında değiştiği bildirilmiştir (Ginzburg, 1972; Dettlaff ve diğ., 1993). Horvath ve diğ., (2009) sperma miktarının türe ve bireyin büyüklüğüne göre değiştiğini, *A. ruthenus* gibi küçük bireylerde 10-20 ml, *H. huso* gibi büyük bireylerde ise 500-800 ml sperma alınabileceğini rapor etmişlerdir.

2.3.4. Sperma pH’sı

Spermanın pH ölçümünde “pH indikatör kağıdı” veya “Elektronik pH metre” kullanılmaktadır. Spermanın pH’sının bilinmesi spermaya uygulanacak işlemler için önemlidir. Balıklarda sperma pH’sı genel olarak 5,50 - 9,50 arasında değişirken Mersin

balıklarında bu değer 7,00-8,50 arasındadır. *A. baeri*, *A. ruthenus*, *A. brevirostrum* türleri ile yapılan çalışmalarda taze sperma pH'sının 7,50-8,13 arasında değiştiği bildirilmiştir (Gallis ve diğ., 1991; Williot ve diğ., 2000; Park ve Chapman, 2005; Psenicka ve diğ., 2008b).

2.3.5. Seminal Plazma'nın Ozmotik Basıncı

Seminal plazmanın ozmotik basıncı donma noktalı ozmometre (Gallis ve diğ., 1991; Alavi ve diğ., 2004b) ya da gaz basınçlı ozmometre ile (Linhart ve diğ., 2003; Horvath ve diğ., 2005; Psenicka ve diğ., 2008b) ölçülebilmektedir.

Yapılan çalışmalarda, seminal plazmanın ozmotik basıncının balık bireyleri ve türleri arasında farklı olmasının nedenlerinin farklı hormonlar kullanılması ve değişen yetiştiricilik uygulamalarından kaynaklanabileceği ifade edilmektedir (Piros ve diğ., 2002; Alavi ve diğ., 2006). Gallis ve diğ., (1991) mersin balıklarında seminal plazmadaki ozmotik basıncın spermatozoa motilitesi üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada, seminal plazmanın ozmotik basıncının motilite üzerinde herhangi bir olumsuz etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Linhart ve diğ., (2003) aynı üreme döneminde *P. spathula*'da spermanın belirli aralıklarla alınmasının seminal plazmanın ozmotik basıncını ve spermatozoa hızını düşürmüş olmasına rağmen motilite üzerinde herhangi bir etki yaratmadığını ifade etmişlerdir.

Mersin balıklarında seminal plazmanın ozmotik basıncı 38-100 mOsmol.kg⁻¹ arasındadır (Gallis ve diğ., 1991; Williot ve diğ., 2000). *A. baeri* türünde seminal plazmanın ozmotik basıncı 30-77 mOsmkg⁻¹ (Gallis ve diğ., 1991; Williot ve diğ., 2000; Psenicka ve diğ., 2008b), *A. ruthenus* türü için 50-79,1 mOsmkg⁻¹ (Piros ve diğ., 2002; Psenicka ve diğ., 2008b), *A. brevirostrum* türü için 70-92 mOsmkg⁻¹ (Park ve Chapman, 2005) olarak bildirilmiştir.

P. spathula türünde LH-RH hormonunun uygulandığı bireylerde seminal plazmanın ozmotik basıncı 48-62 mOsmkg⁻¹, sazan hipofizinin uygulandığı bireylerde ise 33-46 mOsmkg⁻¹ olarak rapor edilmiştir (Linhart ve diğ., 2003).

2.3.6. Spermatozoa Yoğunluğu

Spermatozoa yoğunluğunun bilinmesi yapay döllemede spermatozoa aktivasyonu için olduğu kadar spermatozoa ile yumurta oranının belirlenmesinde de önemlidir (Hatef ve diğ., 2007). Spermatozoa yoğunluğu 1 ml spermada bulunan spermatozoa sayısını ifade eder. Sperm konsantrasyonu olarak da geçen spermatozoa yoğunluğunun bilinmesi dölleme için önemli olmasının yanı sıra aynı zamanda sperma kalitesini belirleyici parametrelerden biridir. Hacmi bilinen sperma içerisinde spermatozoa yoğunluğunun belirlenmesinde “Hemositometrik”, “Spermatokrit (Mikrohematokrit)” ve “Spektrofotometrik” yöntemleri kullanılır (Ciereszko ve Dabrowski, 1993; Alavi, 2008; Cabrita ve diğ., 2009).

Spermatokrit yönteminde, hematokrit tüpleri sperma örneği ile doldurulduktan sonra türe özgü belirlenen prosedürde santrifüj edilerek, spermatozoanın seminal plazmadan ayrılması sağlanır. Spermatokrit sonucu “%” olarak ifade edilir ve toplam hücre hacminin toplam spermaya oranının 100 ile çarpılması ile hesaplanır (Cabrita ve diğ., 2009). Spermatokrit yönteminden daha hızlı ve uygulanabilir olanı Spektrofotometrik yöntemdir (Ciereszko ve Dabrowski, 1993; Cabrita ve diğ., 2009). Hemositometrik yöntem ise Neubauer, Thoma gibi hücre sayım kamaraları ve mikroskop kullanılarak yapılan ölçüm metodudur. Ölçümden önce sperma, belli oranda sulandırılmalı ve hücre sayım kamarası üzerinde homojen bir dağılım göstermesi sağlanmalıdır. Pipetlemeden ya da spermanın akışkanlığından dolayı örneklerdeki homojen olmayan sulandırma, aynı örnek içerisinde bile ölçüm sonuçlarını farklı değerlerde verebilir. Üç defa ya da daha fazla tekrarlanan sayımlarda her bir örnek için ölçümlerin ortalaması alınarak spermatozoa yoğunluğu belirlenir. Sulandırma solüsyonu olarak genellikle %0,5 veya %0,7 M NaCl kullanılmaktadır (Cabrita ve diğ., 2009).

Hemositometrik yöntemde ayrıca “Akışlı Hücre Ölçer” ya da “Coulter Sayıcısı” denilen elektronik alet ile sayım yapılabilmektedir. Ancak bu cihazlar pahalı olduğundan yaygın bir kullanım alanına sahip değildir (Fauvel ve diğ., 2010).

Spektrofotometrik yöntem ise geniş bir kullanım alanına sahip değildir ve mersin balıklarında *A. baeri* ve *A. ruthenus* türlerinde spermatozoa yoğunluğu hesaplamak için kullanılmıştır (Sarosiek ve diğ., 2004).

Mersin balıkları bir defada seminal plazmanın 1 ml'sine $1-1,5 \times 10^9$ spermatozoa vermektedirler ve bu sayı diğer tatlı su balıkları ile karşılaştırıldığında daha azdır. Mersin balıklarında spermada spermatozoa yoğunluğu genellikle $1-4 \times 10^9/\text{ml}$ oranında belirtilmektedir (Dettlaff ve diğ., 1983; Linhart ve diğ., 2000; Piros ve diğ., 2002; Horvath ve diğ., 2009). Ginzburg (1972) ise mersin balıklarında spermatozoa yoğunluğu $0,14-7,55 \times 10^9/\text{ml}$ olarak saptamıştır.

2.3.7. Spermatozoa Motilitesi ve Süresi

Spermatozoa motilitesi, spermanın kalitesi ve dölleme kabiliyetinin ortaya konmasında en önemli parametredir (Billard, 1978; Stoss, 1983; Bromage and Roberts, 1995; Jahnichen ve diğ., 1999). Motilitenin ölçülmesinde birçok yöntem kullanılır. Son zamanlarda yapılan birçok çalışmada hareketli spermatozoa yüzdesi görsel olarak hesaplanmaktadır (Billard ve diğ., 1995a; Cosson, 2004; Ingermann ve diğ., 2002). Bununla beraber, spermatozoa motilitesinin ölçülmesinde bilgisayar destekli sperma analiz (CASA) sistemleri (Billard ve diğ., 1995a,b; Toth ve diğ., 1995; Christ ve diğ., 1996; Kime ve diğ., 1996; Lahnsteiner ve diğ., 1996a,b,1997; Dreanno ve diğ., 1998) ya da “Hobson Hücre Ölçücü” denilen ve balık spermatozoa analizine adapte edilmiş olan sistemler (Kime ve diğ., 1996; Elofsson ve diğ., 2003) ve spermatozoa hızının ölçülmesini de sağlayan “Otomatik Sperma Analizi” sistemleri kullanılmaktadır (Krasznai ve diğ., 2003; Alavi ve Cosson, 2005).

Mersin balıkları spermatozoası, teleostlar ile benzer bir şekilde testislerde ve seminal plazma içerisinde hareketsizdir (Ginzburg, 1972). Seminal plazma içerisinde spermatozoanın hareketini kısıtlayan en önemli etkenin K^+ iyonunun konsantrasyonu ve kısmen seminal plazmanın ozmotik basıncı olduğu ifade edilmiştir. Na^+ ve K^+ iyonlarının konsantrasyonları, Na^+ : K^+ oranı veya ozmotik basıncın değişmesi ile beraber spermatozoa motilitesi başlamaktadır (Gallis ve diğ., 1991; Linhart ve diğ., 1995; Cosson ve Linhart, 1996; Toth ve diğ., 1997; Billard ve diğ., 2000; Cosson ve diğ., 2000; Linhart ve diğ., 2002; Alavi ve diğ., 2004a,b).

Mersin spermatozoasının aktivasyonunda genellikle “Aktivasyon solüsyonu” adı verilen (10 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM $CaCl_2$ pH: 8,5) solüsyon kullanılmaktadır (Jahnichen ve diğ., 1999). Alınan taze ve dondurulmuş-çözdürülmüş spermada spermatozoa

aktivasyonu için düşük tuz konsantrasyonlarına sahip solüsyonların yanı sıra kuluçkahane suyuda kullanılmaktadır (Linhart ve diğ., 2009). Aktivasyon solüsyonu ile kuluçkahane suyu karşılaştırıldığında, aktivasyon solüsyonunun motilite ve fertilizasyonda çok daha başarılı olduğu rapor edilmiştir (Billard ve diğ., 2004; Boryshpolets ve diğ., 2011). Mersin balıklarında spermadaki spermatozoanın aktivasyonu için Aktivasyon solüsyonu ve kuluçkahane suyundan başka “Yüzme solüsyonu” olarak ifade edilen ve 20 mM NaCl ve 20 mM Tris-HCl, pH: 8,2 kimyasal içerikli solüsyonda kullanılmaktadır Mersin balıkları spermasının aktivasyon solüsyonu ile sulandırma oranı genellikle 1:50 (sperma:aktivasyon solüsyonu)’dir (Cosson ve diğ., 2000; Linhart ve diğ., 2003; Linhart ve diğ., 2009).

Mersin spermatozoasının motilitesinin ölçülmesinde hareket eden her spermatozoon motil kabul edilmemektedir. Aktivasyondan sonra spermatozoonların hareket biçimine göre 5 skala yöntemi kullanılarak ölçüm yapılmaktadır (Morisawa ve Morisawa, 1986; Dettlaff ve diğ., 1993; Cosson, 2007a).

Buna göre;

- 5 nolu skala (%100-75)= Tüm spermatozoonlar ileri doğru hızlı hareket eder.
- 4 nolu skala (%75-50)= Birçok spermatozoon ileri doğru hızlı hareket eder; bununla beraber bazı spermatozoolar da yavaş hareket, zigzag hareket, titreme hareketi de görülebilir.
- 3 nolu skala (% 50-25)= Bazı spermatozoonlar ileri doğru hızlı hareket eder, bazı spermatozoonlar da zigzag ve titreme hareketi görülebilir, bazı spermatozoonlar hareket etmezler.
- 2 nolu skala (% 25-5)= İleri doğru hareket nadirdir. Bazı spermatozoonlar titreme hareketine sahiptir.
- 1 nolu skala (% 5-0)= Spermatozoonlar hareketsizdir.

Hareketli spermatozoa yüzdesi ve spermatozoon yüzme hızı, aktivasyonun gerçekleştiği andan itibaren en yüksek değerini kazanır. Aktivasyondan sonra spermatozoa hareketliliği ve spermatozoon hızı düşmeye başlar (Cosson ve diğ., 2000). Mersin balıkları (*Acipenseridae*) ve kürek balıkları (*Polyodontidae*) ile ilgili yapılan çalışmalarda taze spermada saptanan motilite oranları (%) Tablo 2.2’de verilmiştir.

Tablo 2.2: Bazı Mersin balığı türlerinde taze spermada motilite oranları (%)

Çalışılan Tür	Taze Spermada Spermatozoa Motilitesi (%)	Yazar ve Yıl
	100	Dzyuba ve diğ., 2010
	97	Boryshpolets ve diğ., 2011
Çoka Balığı (<i>A. ruthenus</i>)	90-80	Urbanyi ve diğ., 2004
	88	Tsevetkova ve diğ., 1996
	80	Glogowski ve diğ., 2002
	76	Psenicka ve diğ., 2008a
Kısa Burun, Mersin Balığı (<i>A. brevirostrum</i>)	90	Park ve diğ., 2005
	77	Horvath ve diğ., 2005
	77	Horvath ve diğ., 2008
	90	Billard ve diğ., 1999
Sibiry Mersin Balığı (<i>A. baerii</i>)	88	Billard ve diğ., 2000
	72-30	Williot ve diğ., 2000
	70	Urbanyi ve diğ., 2004
	68	Tsevetkova ve diğ., 1996
İran Mersini (<i>A. persicus</i>)	86	Alipour ve diğ., 2009
	86	Imanpoor ve diğ., 2011
Kolan, Baltık Mersini (<i>A. sturio</i>)	90-80	Urbanyi ve diğ., 2004
Rus Mersini (<i>A. gueldenstaedtii</i>)	100-80	Mirzoyan ve diğ., 2006
	50	Urbanyi ve diğ., 2004
	100	Linhart ve diğ., 2002
Amerikan Kaşıkağız (<i>P. spathula</i>)	100-90	Cosson ve diğ., 2000
	98	Linhart ve diğ., 2006
	83,4	Linhart ve diğ., 2000
	83,4	Linhart ve diğ., 2003

Mersin balıklarında spermatozoanın motil kalma süresi, alabalık ve sazan gibi tatlı su Teleost'larına göre daha uzundur. Alabalık ve sazan balıklarının spermatozoaları aktivasyondan sonra ancak 1-2 dakika motil kalma ve dölleme yeteğine sahipken, bu süre mersin balıklarında 1-2 saat'tir (Ginzburg, 1972; Dettlaff ve diğ., 1993). Spermanın kimyasal yapısına bağlı olarak, spermatozoa motil kalma süresi tür içi veya türler arası farklılık gösterebilmektedir (Alavi ve diğ., 2008; Lahnsteiner ve Patzner, 2007).

Taze spermada spermatozoa motil kalma süresinin, *P. spathula*, *H. huso*, *A. persicus*, *A. stellatus*, *A. brevirostrum*, *A. gueldenstaedtii* türleri için 190 ile 780 saniye arasında değiştiği bildirilmektedir (Ginzburg, 1972; Mims, 1991; Linhart ve diğ., 1995; Billard ve diğ., 1999; Cosson ve diğ., 2000; Park ve Chapman, 2005; Alipour ve diğ., 2009; Imanpoor ve diğ., 2011).

2.4. SPERMANIN KRİYOPREZERVASYONU (SULANDIRMA, DONDURMA VE ÇÖZDÜRME İŞLEMLERİ)

Doğal stoklardaki mersin balıklarının azalması ve mersin balığı yetiştiriciliğinin günümüzde önem kazanması, mersin balığı spermasının saklanması ve saklanmış olan bu spermanın üretimde kullanılmasını önemli hale getirmiştir. Balık sperması dondurulmadan kısa süreli olarak veya "Kriyoprezervasyon" adı verilen işlem doğrultusunda dondurularak sıvı nitrojen içerisinde uzun süreli saklanabilmektedir. Taze spermanın kısa süreli olarak saklanma süresi 1 saat'ten 1 haftaya kadar değişebilmektedir (Stoss, 1983; Rana, 1995a,b; Kopeika ve diğ., 2007).

Alınan spermanın kısa süreli olarak düşük sıcaklıkta saklanması sürecinde sperma hücrelerinin canlılığını koruması ve dölleme yeteneğini muhafaza edebilmesi spermanın kalitesine bağlıdır. Mersin balığı spermaları hiçbir koruyucu madde içermeden +4 °C'lik ortamda 5-6 gün süre ile saklanabilmektedir. Oda sıcaklığında ise 1-2 gün süre ile canlılığını koruyabilmektedir (Dettlaff ve diğ., 1993).

Günümüzde, alabalık, sazan, yayın ve mersin balıkları gibi bazı tatlı su balıklarında sperma kriyoprezervasyonunda protokol oluşturulabilecek çalışmalar yapılmış ve bu türler ile yapılan çalışmalara deniz balığı türleri de eklenmiştir (Fabbrocini ve diğ., 2000; Chao ve Liao, 2001; Kopeika ve diğ., 2007; Cabrita ve diğ., 2008).

Sperma dondurulması işlemi Salmonid'ler arasında en yaygın olarak gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) (Lahnsteiner ve diğ., 1995; Lahnsteiner ve diğ., 1996a; Lahnsteiner ve diğ., 1996b; Baulny ve diğ., 1997; Babiak ve diğ., 1998; Cabrita ve diğ., 1998; Glogowski ve diğ., 2000; Cabrita ve diğ., 2001; Lahnsteiner ve diğ., 2002; Silveria ve diğ., 2002), kahverengi alabalık (*Salmo trutta*) (Martinez ve diğ., 2009), kaynak alabalığı (*Salvelinus fontinalis*), alp alabalığı (*Salvelinus alpinus*) (Richardson ve diğ., 2000), dere alabalığı (*Salmo trutta fario*) (Lahnsteiner ve diğ., 1995), göl alabalığı (*Salmo trutta lacustris*) (Lahnsteiner ve diğ., 1995; Cabrita ve diğ., 1998; Martinez ve diğ., 2009), kafkas alabalığı (*Salmo trutta caspius*) (Sarvi ve diğ., 2006) türlerinde yapılmaktadır.

Türkiye'de de tatlı su balıklarından, alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) (Çevik ve Daşkın, 2003; Tekin ve diğ., 2003; Bozkurt ve diğ., 2005) ve sazan balığının (*Cyprinus carpio*) (Akçay ve diğ., 2004) sperma dondurulması çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Kriyoprezervasyonun temeli dondurma işlemi sırasında izotonik bir ortamda ısının düşmesine bağlı olarak su moleküllerinin sayısının azalması, ortamın ozmolaritesinin artması ve oluşan hipertonic ortamda hücrenin su kaybetmesidir. Hücrenin su kaybetmesi sırasında dondurma işleminden önce eklenen kriyoprotektan maddeler su ile yer değiştirir ve bu durum hücreye zarar verecek buz kristallerinin oluşumunu engeller. Kriyoprezervasyon süresince esas amaç spermatozoanın dondurma işleminden sonra morfolojik ve biyolojik karakterlerini koruyabilmesini sağlamaktır. Kriyoprezervasyon işleminin başarılı olarak değerlendirilmesinde ya da başka bir deyişle dondurulan spermatozoa canlılığını ve dölleyebilirliğini korumasında önemli etkenler vardır. Bu etkenler, sulandırıcı içerisinde bulunan kriyoprotektan maddeler ve bu maddelerin oranı, sulandırıcının kimyasal yapısı, sulandırma oranı, dondurma ve çözündürme yöntemidir (Billard ve Zhang., 2001; Kopeika ve diğ., 2007; Kopeika ve Kopeika, 2007).

2.4.1. Sulandırıcı ve Sulandırma Oranı

“Sulandırıcı” organik ve inorganik maddeleri içeren, pH’sı ayarlanmış yapay seminal plazmadan ve dondurulma esnasında hücreleri soğuk şokunun zararlarına karşı koruyan hücre içi kristal oluşumunu indirgeyici olarak eklenen “Kriyoprotektan” maddelerden oluşan kimyasal sıvılardır. Kriyoprotektanın eklenmesinden önce tuz ve şeker alt yapılı olarak hazırlanan sıvılar motiliteyi engelleyici özellikte olmalıdır. Sulandırıcı seçimi tamamen üzerinde çalışılan türe bağlı olarak yapılmaktadır. Kriyoprotektan eklenmemiş sulandırıcı ile spermanın sulandırılması, spermatozoa yoğunluğunun seyreltilmesine ve spermanın +4 °C’ de kısa süreli olarak tutulmasını sağlar (Rana, 1995a,b; Kopeika ve diğ., 2007; Linhart ve diğ., 2009).

Sulandırıcı içerisinde mutlaka bulunması gereken kriyoprotektan maddelerin esas görevi ise dondurma işlemi süresince spermatozoanın canlı kalma yüzdesini arttırmaktır. Kriyoprotektan maddelerin en belirleyici özelliği düşük molekül ağırlığına sahip olmalarıdır. Bu maddelerin oranı belli seviyelerin üzerinde hücreye toksik etki yapabilmektedir. Etkili bir kriyoprotektanın toksititesi koruyuculuğundan çok daha düşük olmak zorundadır. Kriyoprotektanlar, hücre membranından geçebilenler (permeabl) ve geçemeyenler (non-permeabl) olmak üzere ikiye ayrılmaktadırlar. Geçebilen kriyoprotektanlar difüzyon hızını düşürerek hücre içinden hızlı su çıkışını ve hücreye zarar verecek buz kristallerinin oluşumunu engeller. Hücre hacmindeki değişim oranını yavaşlatarak hücre içi sıcaklığı düşürür ve buz kristallerinin oluşumunu azaltır (Woods ve diğ., 2004; Kopeika ve diğ., 2007; Linhart ve diğ., 2009). Bu kriyoprotektanlara örnek olarak gliserol, metanol (Glogowski ve diğ., 2002; Urbanyi ve diğ., 2004; Horvath ve diğ., 2005), 1-2 Propanediol, etilen glikol (Jahnichen ve diğ., 1999), Dimetilsülfoksit (DMSO) (Tsvejkova ve diğ., 1996; Squet ve diğ., 2000; Kopeika ve diğ., 2007) ve Dimetilasetamid verilebilir (Leung, 1991; Cıncık, 2003; Billard ve diğ., 2004; Bucak ve Tekin, 2007; Kopeika ve diğ., 2007).

Hücre membranından geçemeyen kriyoprotektanlar ise sukroz, glukoz gibi sakkaritleri, dektran, polivinilpirrolidon gibi polimerleri ve yumurta sarısı, az yağlı süt gibi proteinleri içermektedir. Hücre dışı kriyoprotektan olarak da adlandırılan bu maddeler, hücre zarının sıvı ve katyonlara karşı geçirgenliğini arttırarak bu zararın ozmotik basınç yüzünden oluşacak strese karşı esnekliğini ve direncini sağlarlar (Leung, 1991).

Spermanın sulandırıcı ile sulandırıldıktan sonra 4-5 °C’de 10-60 dakika bekletilmesi işlemine “Ekilibrasyon” denir. Bu işlem sürecinde kriyoprotektanın sperma içerisine dengeli bir şekilde geçişi sağlanır (Kopeika ve diğ., 2007; Zhang ve Lubzens, 2009). Ekilibrasyon süresinin uzamasının yumurta ile spermanın döllenmesini olumsuz etkilediği bildirilmektedir (Stoss ve Holtz, 1983; Chao ve diğ., 1987; Holtz, 1993; Kopeika ve diğ., 2007).

Mersin balıklarında, sperma dondurulmasında ekilibrasyon işlemi genellikle uygulanmamakta, sperma ve sulandırıcı sulandırılıp direkt olarak dondurma işlemine geçilmektedir (Billard ve diğ., 2004). Ekilibrasyonun uygulanmaması kullanılan kriyoprotektan maddelerin oluşturduğu toksik etkiyi engellemektedir (Jamieson, 1991). Bununla birlikte ekilibrasyon işleminin uygulandığı çalışmalarda mevcuttur (Jahnichen ve diğ., 1999; Kopeika ve diğ., 2000; Alipour ve diğ., 2009).

Mersin balıklarında sperma dondurulmasında “Modifiye Tsvetkova” olarak isimlendirilen sulandırıcı yaygın olarak kullanılmaktadır (Tsvetkova ve diğ., 1996; Horvath ve diğ., 2008). Tsvetkova ve diğ., (1996)’nin kullandığı ve literatüre kazandırdığı sulandırıcı “Orjinal Tsvetkova Sulandırıcısı” ismi ile kullanılmakta iken 2002 yılında Glogowski ve diğ., (2002) tarafından revize edilerek içeriğine sukroz ilave edilmiş (30 mM Tris, 23.4 mM sukroz, 0,25 mM KCL, pH:8) ve ‘Modifiye Tsvetkova Sulandırıcısı’ ismi ile mersin balıkları spermalarının dondurulmasında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Mersin balıkları, teleost balıklar ile karşılaştırıldığında birey başına elde edilen sperma miktarı daha fazla olmasına rağmen, sperma içerisindeki spermatozoa yoğunluğu daha azdır ($1-10 \times 10^9$). Teleost balıklarda ise elde edilen sperma miktarı daha düşük ancak sperma içerisindeki spermatozoa yoğunluğu daha fazladır (Ginzburg, 1972). Bu sebeple, teleost balıkların spermalarının dondurulmasında sulandırma oranı 1:3-1:9 (sperma:sulandırıcı) arasında değişirken (Stoss, 1983) mersin balıklarında bu oran 1:1’dir (Tsvetkova ve diğ., 1996; Brown ve Mims, 1999; Boryshpolets ve diğ., 2011).

Mersin balıklarının spermalarının dondurulmasında yukarıda bahsedilen sulandırıcı ile beraber çeşitli sulandırıcılarda kullanılmaktadır. Kopeika ve diğ., (2000) *A. gueldenstaedtii*, *A. stelatus* türleri ile yapmış olduğu çalışmada sukroz, gliserol ve yumurta sarısını içeren sulandırıcıyı denemişlerdir. *A. gueldenstaedtii* türünde Mirzoyan ve diğ., (2006) tarafından sulandırıcı olarak yumurta sarısı, sukroz ve DMSO; Dzyuba ve diğ., (1999) tarafından ise Tris-HCl ile birlikte yumurta sarısı ve DMSO denenmiştir. Urbanyi ve diğ., (2004) Tris, sukroz, KCl, ve methanol içeren sulandırıcıyı *A. gueldenstaedtii*, *A. ruthenus*, *A. sturio* türlerinde, Glogowski ve diğ., (2002) ise *A. baeri* türünde denemişlerdir. Horvath ve diğ., (2005) *A. brevirostrum*'da; Horvath ve diğ., (2006) *P. spathula* türünde, Psenicka ve diğ., (2008a) *A. ruthenus* türünde Tris, sukroz, KCl ile hazırladıkları sulandırıcıyı DMSO ve methanol kullanarak denemişlerdir. *A. baeri* ve *A. ruthenus* ile yapılan bir çalışmada sulandırıcı olarak sakkaroz, Tris-HCl, yumurta sarısı ve DMSO kullanılmıştır (Tsvetkova ve diğ., 1996).

Tris, sukroz, yumurta sarısı ve DMSO kullanılarak hazırlanan sulandırıcı *A. persicus* ve *A. stellatus* spermasının dondurulmasında kullanılmıştır (Alipour ve diğ., 2009). Liu ve diğ., (2006) *A. sinensis* spermasını NaCl, NaHCO₃, KCl ve DMSO kullanılarak hazırlanan sulandırıcı ile dondurmışlardır. *P. spathula* ile yapılan bir çalışmada tris, sukroz ve KCl bazlı sulandırıcıda kriyoprotektan olarak farklı oranlarda DMSO ve methanol denenmiştir (Linhart ve diğ., 2006). *A. baerii* ile yapılan bir çalışmada Tris-HCl, sakkaroz, yumurta sarısı ve DMSO denenmiştir (Billard ve diğ., 2000). *A. ruthenus* ile yapılan bir çalışmada KCl, Tris-HCl, Sukroz ve kriyoprotektan olarak farklı oranlarda methanol ve DMSO içeren sulandırıcı kullanmışlar ve çözündürme sonrası motilite elde etmişlerdir (Boryshpolets ve diğ., 2011). *A. ruthenus*'ta sukroz, KCl, Tris-HCl ve methanol içeren sulandırıcı denenmiş ve fertilizasyonda başarı elde edilmiştir (Dzyuba ve diğ., 2010). *A. gueldenstaedtii* ile yapılmış olan çalışmada sulandırıcı olarak sukroz, Tris-HCl ve methanol kullanılmıştır (Grunina ve diğ., 2006). Sakkaroz, Tris-HCl, yumurta sarısı ve DMSO kullanılarak hazırlanan sulandırıcı *A. baeri* ve *A. ruthenus* türlerinde denemiştir (Tsvetkova ve diğ., 1996).

2.4.2. Spermanın Dondurulma ve Çözdürülme Prosedürü

Balık spermalarının dondurulmasında çeşitli dondurma metotları ve ekipmanları kullanılmaktadır. Sperma kuru buz blokları üzerinde pellet şeklinde dondurularak, sıvı

azot'ta kriyotüplerin içerisinde depolanabildiği gibi, “Payet” içerisinde de depolanabilmektedir. Payet kullanılarak yapılan dondurma işleminde payetler sıvı azot buharında dondurulmakta ve daha sonra sıvı azot içerisine aktarılmaktadır. Her iki yöntemde de sıcaklığın (-70°C)- (-110°C)'ye düşürülmesinden sonra pellet ve payetler direkt olarak sıvı nitrojen içerisine (-196°C) aktarılır (Büyükhatipoğlu ve Holtz, 1978; Billard ve diğ., 1995a; Rana, 1995a,b; Kopeika ve diğ., 2007).

Dondurma hızı dondurulacak hücreleri iki şekilde etkiler. Dondurma işlemi sırasında hücreler çok hızlı olarak soğutulur ise hücre içinde hücreye zarar verecek öldürücü buz kristalleri oluşabilir. Hücrelerin çok yavaş bir hızla soğutulması kriyoprotektan madde ile uzun süre temas halinde bulunması sebebi ile hücre için toksiktir. Bu sebeple hücreler dondurulurken dondurma hızı kademeli olarak ayarlanmalıdır (Karayücel, 1995; Beaumont ve Hoare, 2003).

Mersin balıklarının spermalarının dondurulmasında yaygın olarak payet ile yapılan dondurma işleminde, sıvı azot seviyesinden 3-5 cm yukarıda 3-20 dakika bekletilen örnekler ardından sıvı azot içerisine aktarılır. Sıvı azot buharında bekletilme süresi ve örneklerin sıvı azot buharına uzaklığı kullanılan payet hacmine (0,25 ya da 0,5 ml) göre değişebilmektedir (Glogowski ve diğ., 2002; Billard ve diğ., 2004; Urbanyi ve diğ., 2004; Horvath ve diğ., 2005; Horvath ve diğ., 2008; Dzyuba ve diğ., 2010; Boryshpolets ve diğ., 2011). Payet yöntemine göre spermanın dondurulmasında sıcaklık düşüşünün ayarlanabildiği, programlanabilir otomatik soğutucularda kullanılmaktadır (Billard ve diğ., 2004). Mersin balıklarının spermaları 5 ml gibi büyük hacimdeki payetlerde de dondurulabilmektedir. Bunun sebebi, örneklerin çözündürme sonrası dölleme çalışmalarında kullanılmasında kolaylık sağlaması olarak bildirilmiştir (Brown ve Mims, 1999; Horvath ve diğ., 2009).

Mersin balıkları türlerinin spermalarının dondurulmasında 5 ml'lik payetlerin kullanılmasında kriyoprotektan seçiminin önemli olduğu ve Methanol'ün DMSO' ya göre daha iyi sonuç verdiği bildirilmektedir (Glogowski ve diğ., 2002; Horvath ve diğ., 2006; Linhart ve diğ., 2006).

Payet yöntemine göre dondurulan spermanın çözündürme işlemi payetlerin sıvı azottan çıkarıldıktan sonra 40 °C'de 6-13 saniye tutulması ile gerçekleşir. Örneklerin 40 °C'de tutulma süresi kullanılan payet hacmine göre değişebilmektedir. Sperma örnekleri motilite tayini ya da fertilizasyon için çözündürme işleminin hemen sonrasında kullanılmalıdır (Rana, 1995b; Kopeika ve diğ., 2007; Horvath ve diğ., 2009).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. MALZEME

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Balıklar

Çalışmada İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Sapanca İçsu Ürünleri Üretimi Araştırma ve Uygulama Birimi'ne Ocak 2001 tarihinde Rusya Krasnodar Balıkçılık Araştırma Enstitüsü'nden getirilen döllenmiş Mersin balığı yumurtalarından büyütülen toplam 12 adet erkek rus mersin balığı kullanılmıştır. 9+ ve 10+ yaşa sahip balıkların ortalama ağırlığı 7702 ± 2300 g ve ortalama boyu $116,9 \pm 9,9$ cm'dir.

Çalışma, 22 Haziran 2010 ve 5 Haziran 2011 tarihlerinde olmak üzere iki farklı dönemde yürütülmüştür. Her iki yılın üreme döneminde farklı anaç balıklarla çalışılmıştır. 2010 yılı yaz döneminde 10 adet balığa hormon uygulanmıştır. Ancak bazı balıklarda su benzeri görünüme sahip taze spermada motilitenin %70'den az bulunması ve bazı bireylerin yeterli miktarda sperma (<10 ml) vermemesi nedeni ile 6 adet birey sperması dondurma çalışmasında kullanılmıştır.

2011 yılı üreme döneminde 12 adet balığa hormon uygulanmıştır. Ancak taze sperma ile yapılan motilite tayininde %70'ten az motilitiye sahip ve yeterli miktarda sperma veremeyen 6 adet birey bu dönemdeki çalışmada kullanılmamıştır.

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar; masa üstü hassas terazi (Scaltec SBA 31), oksijenmetre (Oxyguard), masa tipi pH metre (Orion 3 star), masaüstü santrifüj (Universal 32R), masaüstü mikro-ozmometre (Fiske 210), mikroskop ve arazi tipi terazi'dir.

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- Hormon uygulaması için; Luteinizing Hormon [Des-Gly 10 (D-Ala6) LH-RH ethylamide acetate salt hydrate](LHRH-a Analog, Sigma L4513) kullanılmıştır.
- Spermatozoa aktivasyon solüsyonu için: NaCl (Merck 106404), Tris (Merck 108282), CaCl₂ (Sigma 223506) kullanılmıştır.
- Sperma sulandırılması ve dondurulması için: Dimethyl Sulfoxide: $\geq 99,7$ (Sigma D 2650), Sukroz (Sigma S 0389), NaHCO₃(Sigma, 5761) NaCl, Tris, CaCl₂, KCl (Merck 104935), NaHCO₃, Metanol (Merck 106009), Glutasyon (Sigma 6013), KHCO₃ (Sigma 60339), HCl (Merck 30721), Likit azot gazı (Tam Oksijen) kullanılmıştır.

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Sulandırıcılar

Sulandırıcılar ve aktivasyon solüsyonu için verilen gramajlar 100 ml içindir.

Taze spermada kullanılan Aktivasyon Solüsyonu (Gallis ve diğ., 1991)

0,0584 g NaCl

0,12114 g Tris

0,0147 g CaCl₂

Sulandırıcı I (Liu ve diğ., 2006)

0,885 g NaCl

0,02 g KCl

0,04 g NaHCO₃

12 ml Dimetil Sülfoksit (DMSO)

Sulandırıcı II (Glogowski ve diğ., 2002)

0,363 g Tris

0,8 g Sukroz

0,01 g KCl

10 ml Metanol

Sulandırıcı III (Tsvetkova ve diğ., 1996)

<u>0,8 g</u>	<u>Sukroz</u>
<u>1,4 g</u>	<u>Tris</u>
<u>15 ml</u>	<u>DMSO</u>
<u>20 ml</u>	<u>Tavuk yumurtasının sarısı</u>

Sulandırıcı IV

<u>2,73 g</u>	<u>Sukroz</u>
<u>0,17 g</u>	<u>Glutasyon</u>
<u>0,01 g</u>	<u>KHCO₃</u>
<u>10 ml</u>	<u>Dimetil Sülfoksit (DMSO)</u>

3.2. YÖNTEM**3.2.1. Balıkların Bakımı ve Beslenmesi**

Çalışmada kullanılan balıklar, İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Sapanca İçsu Ürünleri Üretimi Araştırma ve Uygulama Birimi'nde bulunan dikdörtgen şekilli (10x12m) üstü kapalı iki adet beton havuzda bakılmıştır. Balıkların bulundukları havuzların üzeri 2007 yılına kadar açık iken (Şekil 3.1), 2007 yılında yapılan TOVAG/1070301 nolu proje kapsamında kapatılmıştır (Şekil 3.2). Havuzların kapatılması ile anaç adayı balıkların olgunlaşma süresince direkt güneş ışığı almalarının engellenmesi amaçlanmıştır (Memiş ve diğ., 2011).



Şekil 3.1: Çalışmada kullanılan balıkların bulunduğu havuzların üzeri açık halde görünümü



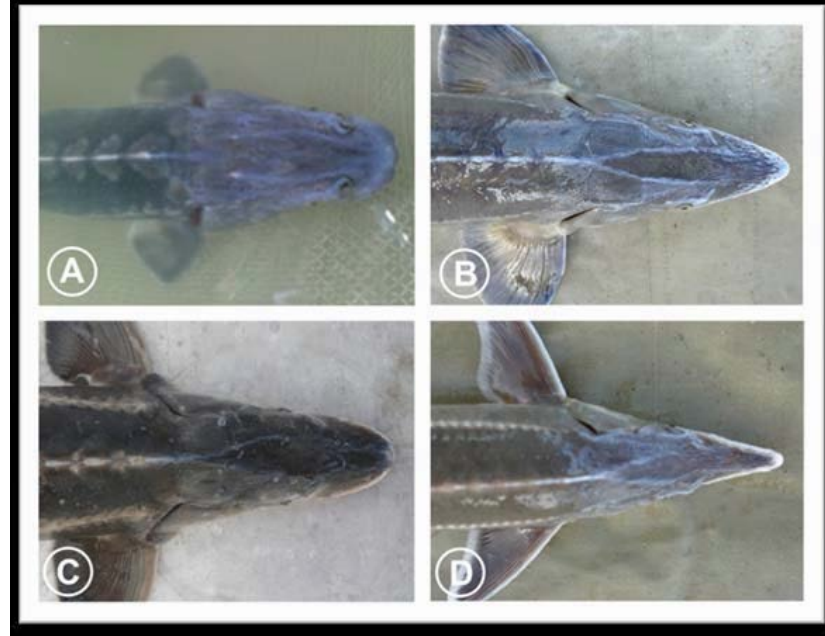
Şekil 3.2: Çalışmada kullanılan balıkların bulunduğu havuzların üzeri kapatılmış görünümü

Balıkların bulunduğu havuzlara Araştırma Birimin'deki iki kaynaktan su alınmaktadır. Bunlardan biri sabit sıcaklığa sahip ($11,8^{\circ}\text{C}$) kuyu suyu diğeri dere suyudur ($5-20^{\circ}\text{C}$). Havuzlardaki su sıcaklığı Mayıs ayından itibaren takip edilmiş, sıcaklığın $16-17^{\circ}\text{C}$ 'ye ulaştığı üreme döneminde anaçlardan sperma alımı çalışmalarına başlanmıştır. Denemeden 30 gün önce ve çalışma süresince havuzlara gelen suyun çözünmüş oksijen miktarı, sıcaklığı ve pH'sı balıklara yem verilmeden önce sabah (10:00) günlük olarak ölçülmüştür.

Sapanca Araştırma Birimi'nde bakılan anaç adayları 2008 yılına kadar farklı büyüklüklerde (8-10 mm) ekstrude Alabalık ve Mersin yemi ile beslenmiştir. Çalışmanın yürütüldüğü her iki dönemde de (2010-2011) sperma alınmadan iki gün önce balıklara yem verilmemiştir.

3.2.2. Balıkların Genel Muayenesi, Seçimi ve Markalanması

Havuzlardaki balıklar arasından baş üzerinde beyazımsı yapı görülenler seçilerek, hormon uygulanması ve sperma alımı için hazır hale getirilmiştir (Şekil 3.3 ve Şekil 3.4) (Chebanov ve diğ., 2004).



Şekil 3.3: Mersin balıklarında üreme elbisesi A, B- *A.gueldenstaedtii*, C- *A.nudiventris*, D- *A.ruthenus* (Chebanov ve diğ., 2004).



Şekil 3.4: Denemede kullanılan erkek bireylerde görülen “üreme elbisesi” denilen beyaz yapı

Sperma alımında mersin balıkları için özel hazırlanmış ayaklı sedye kullanılmıştır. Sedyeye yatırılan balıkların stresini azaltmak için gözleri ıslak havlu ile kapatılmıştır. Karın ve genital bölgesi bez ile kurulandıktan sonra sperma alımı denenmiştir. Sperma alım çalışmasında 60 ml’lik şırınganın ucuna takılan 5 mm çapında ve 5 cm uzunluğundaki plastik hortum (kateter) kullanılmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5: Balıklardan enjektörün ucuna takılan plastik hortum (kateter) ile sperma alımı

Spermanın alınacağı tespit edilen bireylerin ağırlıkları (Şekil 3.6) ve toplam boy uzunlukları (Şekil 3.7) belirlendikten sonra “Küpe” adı verilen markalama tekniği ile sol pektoral yüzgeçlerinden markalanmışlardır (Şekil 3.8 ve Şekil 3.9). Ağırlığı ve toplam boyu tespit edilen balıklar her birine numara verilerek markalanmışlardır.



Şekil 3.6: Denemede kullanılan balıkların ağırlıklarının ölçülmesi



Şekil 3.7: Denemede kullanılan balıklarda toplam boyun ölçülmesi



Şekil 3.8: Denemede kullanılan balıkların “küpe” ismi verilen marka ile markalanması



Şekil 3.9: Denemede kullanılan balıkların sol pektoral yüzgeçlerine takılan ve numaralandırılan marka

3.2.3. Balıklara Hormon Uygulaması

Çalışmada her bir balığa 30 $\mu\text{g/kg}$ oranında LH-RH hormonu uygulanmıştır (Linhart ve diğ., 2000). Terazı ile ağırlığı tespit edilen ve markalanan bireylerin toplam ağırlıklarına göre uygulanacak hormone miktarı hesaplanarak belirlenmiştir. Hormon enjeksiyonundan önce anestezi uygulanmamıştır. İzotonik solüsyon ile 1:10 oranında sulandırılan hormon karışımı, buz üzerine oturtulmuş cam behere aktarılmış ve 10 ml’lik insülin enjektörünün iğne ucu değiştirilerek balıklara enjekte edilmiştir. Enjektörler, uygulamadan önce +4 °C’de tutulmuşlardır. Uygulama sabah saatlerinde gerçekleştirilmiştir. Hormon, balığın baş kısmı sol tarafa bakacak şekilde V. dorsal

plaka pulunun altına, kas içerisine 45°'lik açı ile tek doz olarak uygulanmıştır (Şekil 3.10).



Şekil 3.10: Denemede kullanılan balıklara hormon enjeksiyonunun uygulanması

Çalışmada 2010 ve 2011 yılı üreme dönemlerine ait bireylerin toplam boyları ve ağırlıklarına göre hesaplanan hormon miktarları Tablo 3.1 ve Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.1: 2010 yılı üreme döneminde kullanılan balıkların ağırlıkları, toplam boy uzunlukları ve uygulanan hormon miktarları

Birey numarası	Ağırlık (g)	Toplam boy (cm)	Hormon miktarı (µg)
1	8080	121	240
2	8700	131	261
3	7770	124	231
4	11500	128	330
5	6110	111	180
6	4500	102,5	180

Tablo 3.2: 2011 yılı üreme döneminde kullanılan balıkların ağırlıkları, toplam boy uzunlukları ve uygulanan hormon miktarları

Birey numarası	Ağırlık (g)	Toplam boy (cm)	Hormon miktarı (µg)
7	12000	125	360
8	7800	125	240
9	7600	111	240
10	4655	103	150
11	6780	108	210
12	6940	114	210

3.2.4. Markalanan Anaç Balıklardan Spermanın Alınması

Hormonun uygulandığı saat göz gönünde bulundurularak bireylerin her biri sırasıyla 24 saat dolduktan sonra sperma alımı için anestezi uygulanmadan sedyeye alınmıştır. Sperma, balıklar sedyeye yatırıldıktan ve vücudun ventral tarafı tamamen kurulandıktan sonra 60 ml'lik enjektörün ucuna takılan 5 mm çapında ve 5 cm uzunluğundaki plastik hortum ile genital açıklıktan enjektörlere toplanmıştır (Şekil 3.11). Her bir balığın numarasının yazıldığı enjektörler strafor kutuda, buz üzerinde (+4°C) laboratuvara taşınmıştır.



Şekil 3.11: Denemede kullanılan anaç balıklardan spermanın alınması

3.2.5. Spermatolojik Özelliklerin İncelenmesi

3.2.5.1. Sperma Miktarının Hesaplanması

Enjektörlerden ölçekli cam beherlere aktarılan spermanın toplam miktarı ml olarak belirlenmiştir.

3.2.5.2. Spermanın pH Değeri ve Seminal Plazmanın Ozmolaritesi

Spermanın pH'sı masa tipi pH metre kullanılarak ölçülmüştür (Şekil 3.12). Seminal plazmanın ozmolaritesi taze spermadan ölçülmüştür. Her bir balığın spermasından alınan 1 ml'lik örnek 10 000 G'de, 4°C' de 10 dakika santrifüj edilmiştir (Dzyuba ve diğ., 2010). Santrifüjden sonra ependorf tüpteki süpernatant örneğinden 2 µl alınarak mikro-ozmometre ile ölçüm yapılmıştır (Şekil 3.13). Ölçümler her bir örnek için 3 tekerrürlü yapılmıştır.



Şekil 3.12: Denemede kullanılan masa tipi pH metre



Şekil 3.13: Denemede kullanılan mikro-ozmometre

3.2.5.3. *Spermatozoa Yoğunluğu*

Spermatozoa yoğunluğunun hesaplanması hemositometrik yöntem ile gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem için alınan örneklerden sayım kamarası yardımı ile hücre sayımı yapılmıştır. Thoma lamının ortasındaki 5 büyük karenin içerisinde yer alan toplam 80 küçük kare içerisine düşen spermatozoon sayısı saptanmıştır.

Birim hacimdeki spermatozoa yoğunluğunu belirlemek amacı ile 1 µl sperma, 1 µl %3'lük NaCl solüsyonu ile ependorf tüp içerisinde karıştırılmıştır. Sulandırılmış spermadan örnek alınarak mikroskop altında Thoma lamında incelenmiştir. İncelenen örneğin yoğunluğuna göre tekrar sulandırma gereken durumlarda sulandırma oranı örneğe göre belirlenmiş ve her birey için kullanılan sulandırma oranı kaydedilmiştir. Thoma lamında sayımı ve hesaplaması yapılan spermanın yoğunluğu ml cinsinden hesaplanarak $\times 10^9/\text{ml}$ olarak belirlenmiştir. Hesaplamaadaki formülasyon aşağıda verilmiştir (İleri ve diğ., 2000).

$$\text{Yoğunluk } (/mm^3) = \frac{\text{Sayılan spermatozoon sayısı}}{\text{Sayılan toplam küçük kare sayısı} \times \text{Bir küçük karenin hacmi} \times \text{Sulandırma oranı}}$$

3.2.5.4. *Spermatozoa Motilitesi*

Örneklerden 0,5 µl sperma alınarak lam üzerine konulmuş ve 49,5 µl aktivasyon solüsyonu ile aktive edilerek, ışık mikroskobunda $\times 200$ büyütmede incelenmiştir. Sperma aktivasyon solüsyonu ile 1:100 oranında sulandırılmıştır. Sulandırma oranı bireye göre değişiklik göstermiştir. Bu oranlar bireylerde 1:500 yada 1:1000 olarak değişmiştir. Üzerine aktivasyon solüsyonu eklenmiş spermanın üzeri lamel ile kapatılmıştır. Spermatozoa motilitesi ileri yönde hareket eden hücreler dikkate alınarak aktivasyonun 10. saniyesin de saptanmıştır. Motilite tayini her bir birey için 3 defa ve aynı gözlemci tarafından yapılmıştır.

3.2.5.5. *Spermatozoa Motilite Süresi*

Aktivasyon sonrası başlayan ileri doğru hareket süresi mikroskop altında 200x büyütmede, en son spermatozoonun ileri doğru hareketinin bitişine kadar elektronik kronometre ile ölçülmüş ve saniye olarak ifade edilmiştir.

3.2.5.6. *Sperma Rengi*

Çalışmada, hormon uygulamasından sonra alınan sperma rengi değerlendirilmiştir. Rengi süt beyaza yakın olmayan, su benzeri yapı gösteren sperma örnekleri dondurma işlemine tabii tutulmamıştır (Şekil 3.14).



Şekil 3.14: Denemede kullanılan balıklarda kullanılan spermadaki renk farklılıkları

3.2.6. Spermanın Sulandırılması ve Dondurulması

3.2.6.1. *Sulandırıcıların Hazırlanması*

Sulandırıcıların hazırlanmasında kullanılan saf su günlük olarak hazırlanmış ve +4 °C' de tutulmuştur.

Aktivasyon Solüsyonunun hazırlanması

Hassas terazide tartılan 0,12114 g Tris, 0,0584 g NaCl ve 0,0147 g CaCl₂ 50 ml saf su içerisinde çözündürülmüştür. pH'sı HCl ile 8,5'a ayarlanmış ve karışım 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Sulandırıcı I'in Hazırlanması

Hassas terazide tartılan 0,885 g NaCl, 0,02 g KCl, 0,04 g NaHCO₃, 50 ml saf su içerisinde çözündürülmüştür. 12 ml DMSO eklendikten sonra saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Sulandırıcı II'nin hazırlanması

Hassas terazide tartılan 0,363 g Tris 50 ml saf su içerisinde çözündürülmüştür. HCl ile pH 8'e ayarlandıktan sonra 0,8 g sukroz, 0,01 g KCl tartılarak karışıma eklenmiş, 10 ml Metanol eklendikten sonra saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Sulandırıcı III'ün hazırlanması

Hassas terazide tartılan 1,4 g Tris, 50 ml saf su içerisinde çözündürülmüştür. HCl ile pH 8'e ayarlandıktan sonra 0,8 g sukroz eklenmiştir. Günlük olarak temin edilen yumurta, etil alkol ile silindikten sonra kurutma kağıdının üzerinde kurumaya bırakılmış, kabuğu kırıldıktan sonra steril kurutma kağıdı ile akı uzaklaştırılmış ve yumurta sarısı huni ile cam behere aktarılmıştır. 20 ml yumurta sarısının eklenmesinden sonra 15 ml DMSO eklenmiş ve en son saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Sulandırıcı IV'ün hazırlanması

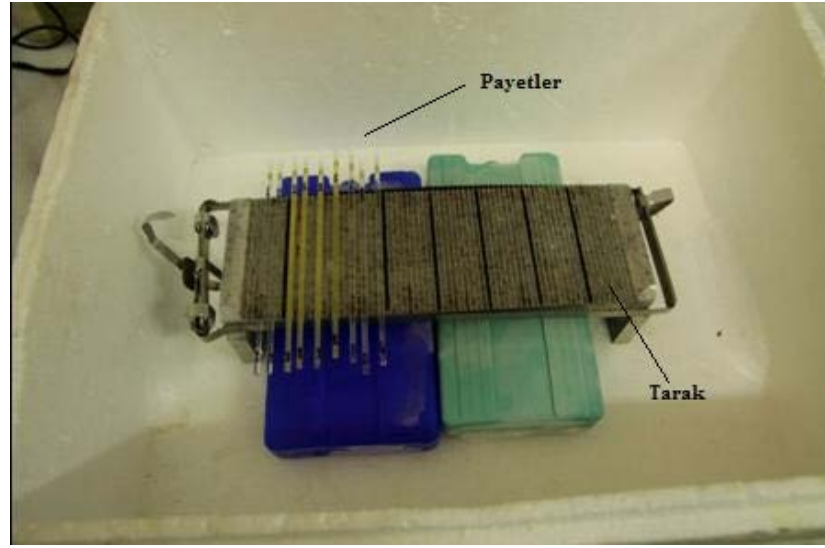
Hassas terazide tartılan 2,73 g sukroz, 0,17 g glutatyon, 0,1 g KHCO₃, 50 ml saf su içerisinde çözündürülmüştür. pH NaOH ile 8'e ayarlandıktan sonra 10 ml DMSO eklenmiş, saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

3.2.6.2. Spermanın Dondurulması

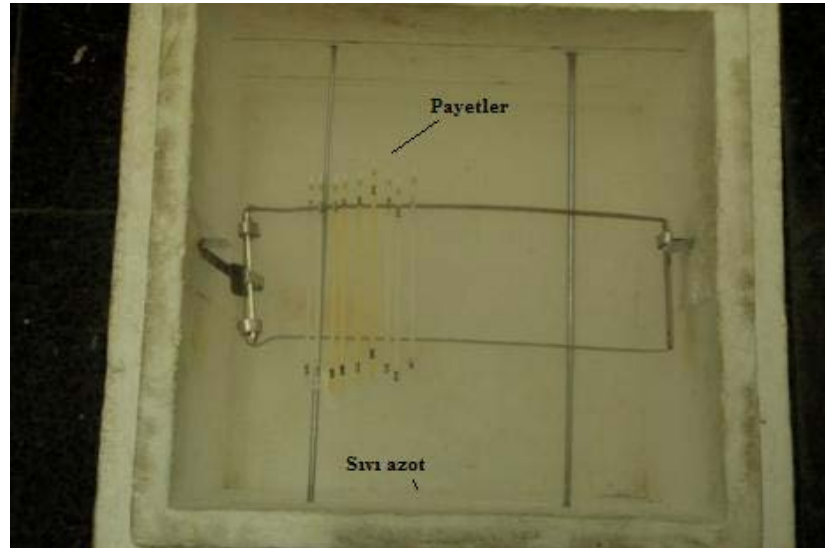
Spermatolojik özelliklerin incelenmesinden sonra her bir sperma örneği sulandırıcı I, II, III, ve IV ile oda sıcaklığında (14°C) 1 sperma:1 sulandırıcı oranında sulandırılmıştır. Sulandırma işlemi sulandırıcılar ve sperma örneklerinin direkt buz ile teması önlenerek, buz kaseti üzerinde strafor kutuda gerçekleştirilmiştir. Sulandırma işlemi yapılırken sulandırıcı ile spermanın ısısının aynı olmasına dikkat edilerek, sulandırıcı spermaya kademeli olarak katılmıştır. Sulandırma işlemi sonrası ekilibrasyon uygulanmamıştır.

Dört farklı sulandırıcı ile sulandırılmış olan her bir bireye ait sperma örneği, farklı işaretler ile işaretlenmiş 0,5 ml'lik payetlere otomatik pipet yardımı ile çekilmiş ve payetlerin uçları açık bırakılmıştır. Doldurulan payetler buz üzerindeki payet taraklarına

dizilmiş (Şekil 3.15) ve tüm örneklerin bitiminden sonra, tarak, sıvı azot dolu strafor kutuya, azot gazından 3 cm yukarıda olacak şekilde yerleştirilmiştir (Linhart ve diğ., 2009). Daha sonra kutunun ağzı kapatılmıştır (Şekil 3.16). Sıvı azot buharında 20 dakika (-110) bekletilen payetler sürenin bitiminde sıvı azot içerisine aktarılmışlardır (-196°C). Payetler daha sonra sırası ile gobletler ve kanisterlere konarak saklama tankına yerleştirilmiştir (Şekil 3.17).



Şekil 3.15: Payetlerin üzerine dizildiği buz kasetleri üzerindeki tarağın görünümü



Şekil 3.16: Tarağın strafor kutu içerisindeki sıvı azot buharından 3 cm yukarıya yerleştirilmesinin görünümü



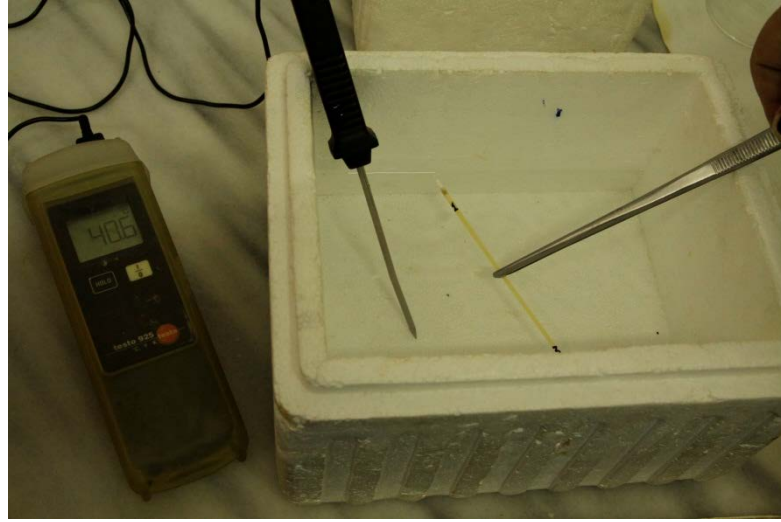
Şekil 3.17: Payetlerin yerleştirildiği goblet, kanister ve sıvı azot tankının görünümü

3.2.7. Dondurulmuş Spermanın Çözdürülmesi

Örnekler sıvı azotta 24 saat süre ile tutulmuşlardır. Daha sonra dondurulmuş sperma ile dolu olan payetler pens yardımı ile gobletlerden çıkartılmış ve sıvı azot ile doldurulmuş olan strafor kutuya konulmuştur (Şekil 3.18). Çözdürme sonrası spermatolojik özelliklerin belirlenmesinde payetlerin sıvı azottan çıkarılması rastgele yapılmış, herhangi bir sıra göz önünde bulundurulmamıştır. Her bir payet örneği 40°C 'de 7 saniye tutularak çözdürülmüştür (Şekil 3.19). Kapatılmamış olan ucundan makas yardımı ile kesilerek spermanın ependorf tüpe akması sağlanmıştır. Örneklerin aktarıldığı ependorf tüpler raklara yerleştirilerek buz üzerine konmuştur. Motilite tayini için ependorf tüpten alınan sperma örneği lam üzerinde aktivasyon solüsyonu ile aktive edildikten sonra motilite yüzde olarak, motil kalma süresi saniye olarak ölçülmüş ve kaydedilmiştir. Her bir sulandırıcı için her bir balıktan 3 adet payet çözdürülmüştür.



Şekil 3.18: Payetlerin strafor kutudaki sıvı azottan çıkarılması



Şekil 3.19: Payetlerin sıvı azottan çıkarıldıktan sonra 40°C'de çözündürülmesi

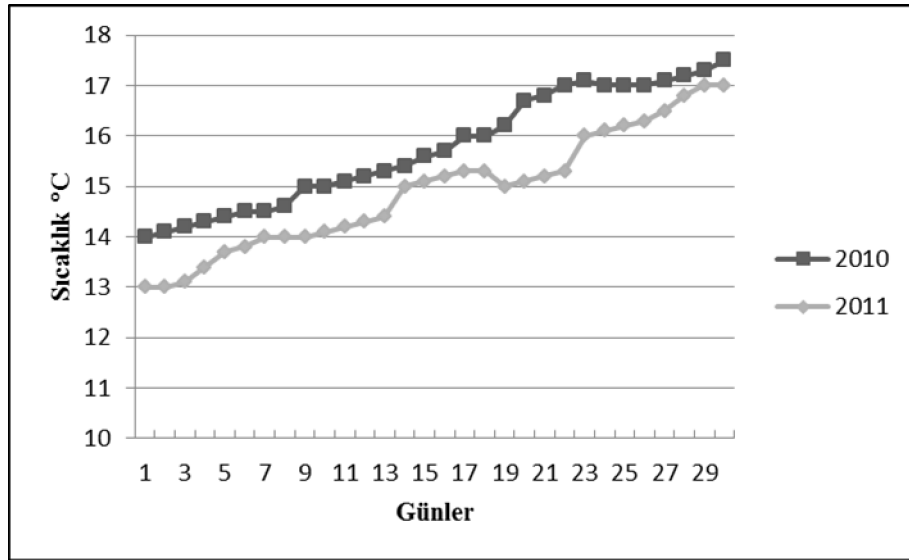
3.2.8. İstatistiksel Analizler

Çalışmada elde edilen tüm veriler ortalama değerlerdir ve standart sapmalarıyla ($\pm$ SD) birlikte sunulmuştur. Değerler arasındaki farklar değerlendirilmiştir. İki dönem arasındaki değerlerin anlamlılık düzeyleri %95 güvenilirlik aralığında t-testi ile analiz edilmiştir. Taze sperma ve farklı sulandırıcılarla dondurulup çözündürülen sperma örneklerinin hem motilite yüzdeleri hem de motilite sürelerinin farklı olup olmadığı önce tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile istatistiksel olarak teste tabi tutulmuş, anlamlı farklılık gözlenmesi durumunda ise örnekler ayrı ayrı t-testiyle sınanmıştır (Zar, 1996). Deney süresince elde edilen verilere ait istatistiksel hesaplamalar STATISTICA v.8 programı kullanılarak hesaplanmıştır.

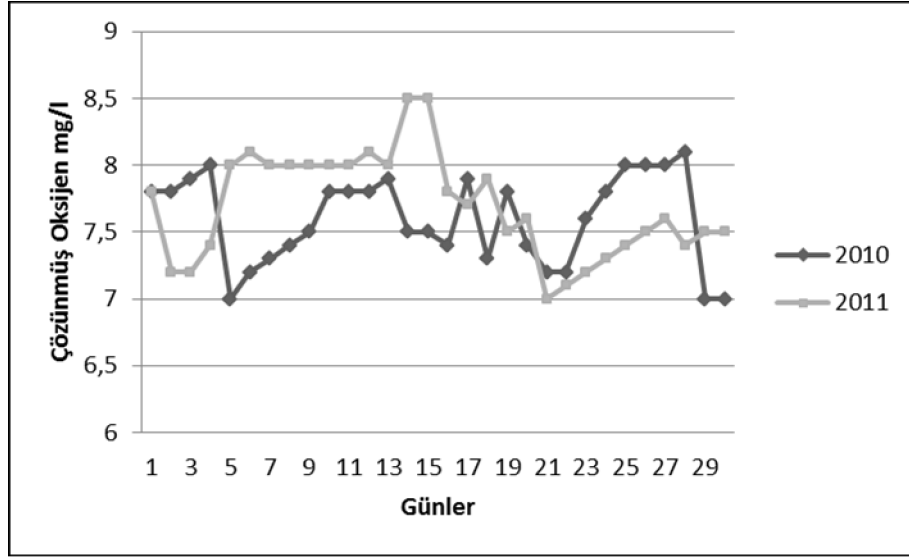
4. BULGULAR

4.1. DENEME HAVUZLARINDA KULLANILAN SUYUN FİZİKSEL VE KİMYASAL DEĞERLERİ

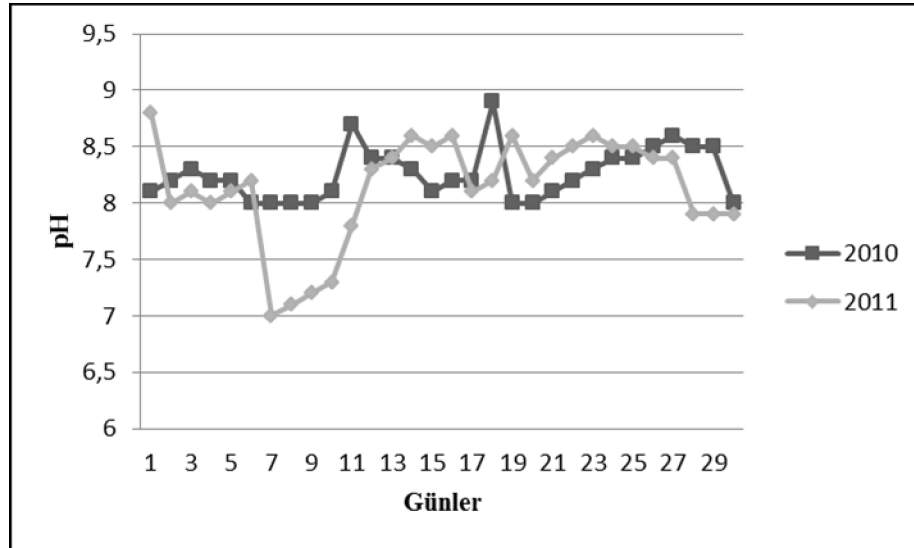
Haziran 2010 ve Haziran 2011 tarihlerinde balıklardan sperma elde edilmeden 1 ay önce havuzlara gelen suyun sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$), çözünmüş oksijen (mg/l) ve pH ölçüm değerleri sırası ile Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te verilmiştir. Balıklardan sperma alımı denemesinin gerçekleştiği tarihte 2010 üreme dönemi için su sıcaklığı $17,5^{\circ}\text{C}$, pH 7,9 ve çözünmüş oksijen 7,1 mg/l; 2011 üreme dönemi için ise su sıcaklığı $17,1^{\circ}\text{C}$, pH 7,7 çözülmüş oksijen miktarı ise 7,5 mg/l olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.1: Deneme öncesi 2010 ve 2011 yılları üreme dönemlerine ait 30 günlük su sıcaklık değerleri (Mayıs-Haziran)



Şekil 4.2: Deneme öncesi 2010 ve 2011 yılları üreme dönemlerine ait 30 günlük çözünmüş oksijen değerleri (Mayıs-Haziran)



Şekil 4.3: Deneme öncesi 2010 ve 2011 yılları üreme dönemlerine ait 30 günlük pH değerleri (Mayıs-Haziran)

4.2. DONDURMA ÖNCESİ TAZE SPERMAYA AİT SPERMATOLOJİK ÖZELLİKLER

Balıkların üreme dönemi olan 2010 ve 2011 yılı yazında yapılan çalışmalarda, toplam 12 adet Mersin balığından alınan spermada sperma miktarı, sperma pH'sı, seminal plazmanın ozmotik basıncı, spermatozoa yoğunluğu, spermatozoa motilite yüzdesi ve motil kalma süresi tespit edilmiştir.

4.2.1. Taze Sperma Miktarı

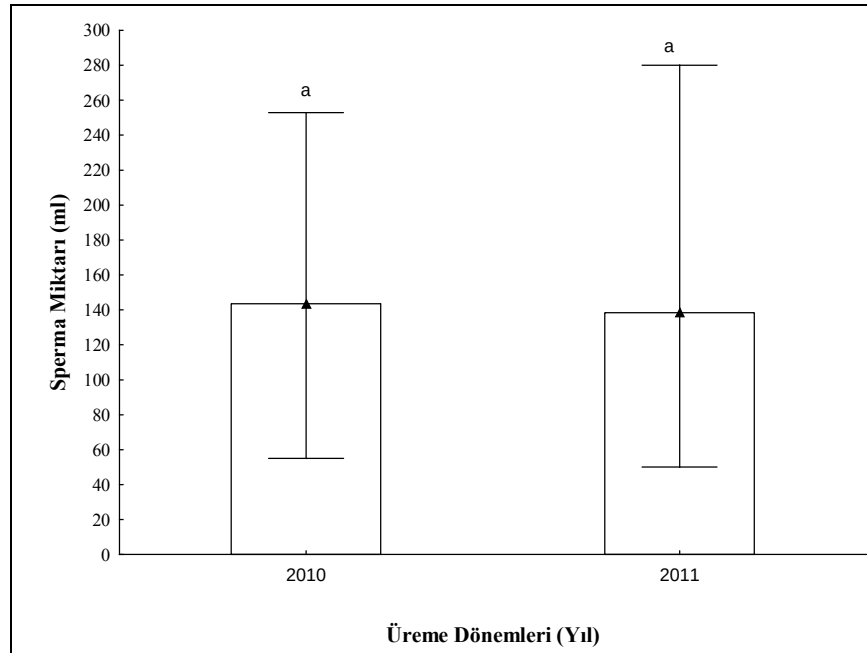
2010 yılı yaz döneminde en fazla sperma miktarı 253 ml ile dördüncü bireyden en az sperma miktarı ise 61 ml ile altıncı bireyden elde edilmiştir. 2011 yılı üreme döneminde en az sperma üretimi 50 ml ile onuncu bireyde en fazla ise 280 ml ile sekizinci bireyde tespit edilmiştir. 2010 yılı üreme döneminde ortalama sperma miktarı 143 ± 68 ml; 2011 yılı üreme dönemi için 138 ± 91 ml olarak hesaplanmıştır. Çalışma sonucunda her iki yılın üreme dönemleri için birey başına alınan sperma miktarı ortalama 140 ± 84 ml olarak bulunmuştur. 2010 ve 2011 yılı üreme dönemlerinde hormon uygulanarak elde edilen toplam sperma miktarları sırası ile Tablo 4.1 ve Tablo 4.2'de verilmiştir. Denemeye alınan erkek anaç balıklarının toplam sperma miktarında her iki yılın üreme dönemleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark görülmemiştir ($p > 0,05$) (Şekil 4.4).

Tablo 4.1: 2010 yılı üreme döneminde kullanılan bireylerden elde edilen toplam ve nispi sperma miktarları ve ortalaması ($\pm$ SD)

Birey numarası	Birey ağırlığı (g)	Toplam sperma miktarı (ml)	Nispi sperma miktarı (ml/kg)
1	8080	55	6,80
2	8700	150	17,20
3	7770	172	22,33
4	11500	253	22,00
5	6110	170	27,00
6	4500	61	13,50
Ortalama	7776 $\pm$ 2380	143 $\pm$ 68	18,13 $\pm$ 7,23

Tablo 4.2: 2011 yılı üreme döneminde kullanılan bireylerden elde edilen toplam ve nispi sperma miktarları ve ortalaması ($\pm$ SD)

Birey numarası	Birey ağırlığı (g)	Toplam sperma miktarı (ml)	Nispi sperma miktarı (ml/kg)
7	12000	250	20,83
8	7800	280	35,89
9	7600	60	7,89
10	4655	50	10,86
11	6780	105	15,67
12	6940	85	12,31
Ortalama	7630 $\pm$ 2415	138 $\pm$ 91	17,24 $\pm$ 10,15



Şekil 4.4: 2010 ve 2011 üreme dönemlerinde kullanılan balıklardan elde edilen taze sperma miktarları ($p>0,05$)

4.2.2. Taze Sperma pH'sı

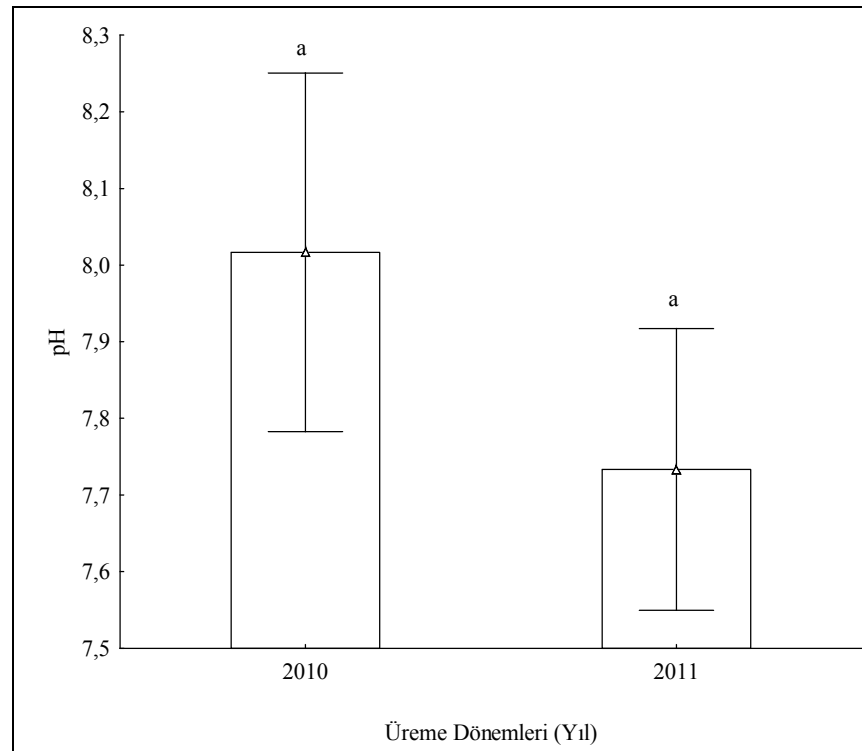
2010 yılı üreme döneminde kullanılan erkek anaç bireylerden elde edilen spermada en düşük pH değeri 7,7 ile birinci bireyde, en yüksek olarak ise 8,4 ile ikinci bireyde görülmüştür. 2011 yılı üreme döneminde ise en düşük pH değeri 7,5 ile dokuzuncu bireyde, en yüksek pH değeri ise 8,0 olarak onbirinci bireyde tespit edilmiştir. 2010 yılı üreme döneminde ortalama pH değeri $8,0 \pm 0,20$ ve 2011 üreme döneminde pH değeri $7,7 \pm 0,16$ olarak ölçülmüştür. Her iki dönem için 12 adet bireye ait taze spermada ortalama pH değeri $7,8 \pm 0,23$ olarak tespit edilmiştir. 2010 ve 2011 yılı üreme dönemlerinde alınan spermanın pH değerleri Tablo 4.3 ve Tablo 4.4'de verilmiştir. Her iki yılın üreme döneminde elde edilen spermanın pH ölçüm sonuçları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0,05$) (Şekil 4.5).

Tablo 4.3: 2010 yılı üreme döneminde kullanılan bireylere ait taze spermada pH değerleri ve ortalaması ($\pm$ SD)

Birey Numarası	Sperma pH
1	7,7
2	8,4
3	8,0
4	8,0
5	8,0
6	8,0
Ortalama	8,0 $\pm$ 0,2

Tablo 4.4: 2011 yılı üreme döneminde kullanılan bireylere ait taze spermada pH değerleri ve ortalaması ($\pm$ SD)

Birey Numarası	Sperma pH
7	7,8
8	7,8
9	7,5
10	7,6
11	8,0
12	7,7
Ortalama	7,7 $\pm$ 0,2



Şekil 4.5: 2010 ve 2011 üreme dönemlerinde kullanılan balıklardan elde edilen taze spermanın pH değerleri ($p > 0,05$)

4.2.3.Taze Spermada Seminal Plazmanın Ozmotik Basıncı

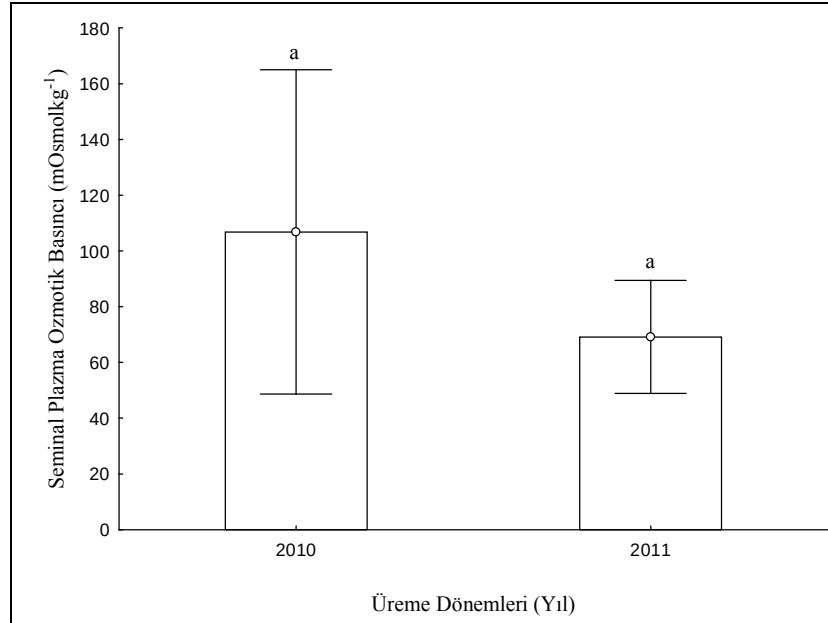
2010 yılı üreme döneminde spermanın seminal plazmasındaki en yüksek ozmotik basınç $216 \text{ mOsmolkg}^{-1}$ ile altıncı bireyde, en düşük ise 66 mOsmolkg^{-1} ile birinci bireyden elde edilmiştir. 2011 yılı üreme döneminde ise en düşük 45 mOsmolkg^{-1} ile dokuzuncu bireyde en yüksek 97 mOsmolkg^{-1} ile onuncu bireyde tespit edilmiştir. 2010 yılı üreme döneminde spermadaki seminal plazmanın ozmotik basınç ortalaması $106 \pm 50 \text{ mOsmolkg}^{-1}$, 2011 yılı üreme döneminde ise $69 \pm 17 \text{ mOsmolkg}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Her iki yılın üreme dönemlerinde kullanılan 12 adet bireye ait taze spermada seminal plazmanın ortalama ozmotik basınç değeri $88 \pm 44 \text{ mOsmolkg}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Her iki yılın üreme döneminde elde edilen spermada seminal plazma ozmotik basınç ölçüm sonuçları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0,05$) (Şekil 4.6). 2010 ve 2011 yılı üreme dönemlerine ait ozmotik basınç değerleri ve ortalaması Tablo 4.5 ve Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.5: 2010 yılı üreme döneminde kullanılan bireylere ait taze spermada seminal plazmanın ozmotik basınç değerleri ve ortalaması ($\pm$ SD)

Birey Numarası	Seminal plazma ozmotik basınç (mOsmolk g^{-1})
1	66
2	98
3	92
4	100
5	69
6	216
Ortalama	106 $\pm$ 50

Tablo 4.6: 2011 yılı üreme döneminde kullanılan bireylere ait taze spermada seminal plazmanın ozmotik basınç değerleri ve ortalaması ($\pm$ SD)

Birey	Seminal plazma ozmotik basınç (mOsmolk g^{-1})
7	61
8	82
9	45
10	97
11	76
12	54
Ortalama	69 $\pm$ 17



Şekil 4.6: 2010 ve 2011 üreme dönemlerinde kullanılan balıklardan elde edilen taze spermanın seminal plazmasında ozmotik basınç değerleri ($p>0,05$)

4.2.4. Taze Spermada Birim Hacimde Belirlenen Spermatozoa Yoğunluğu

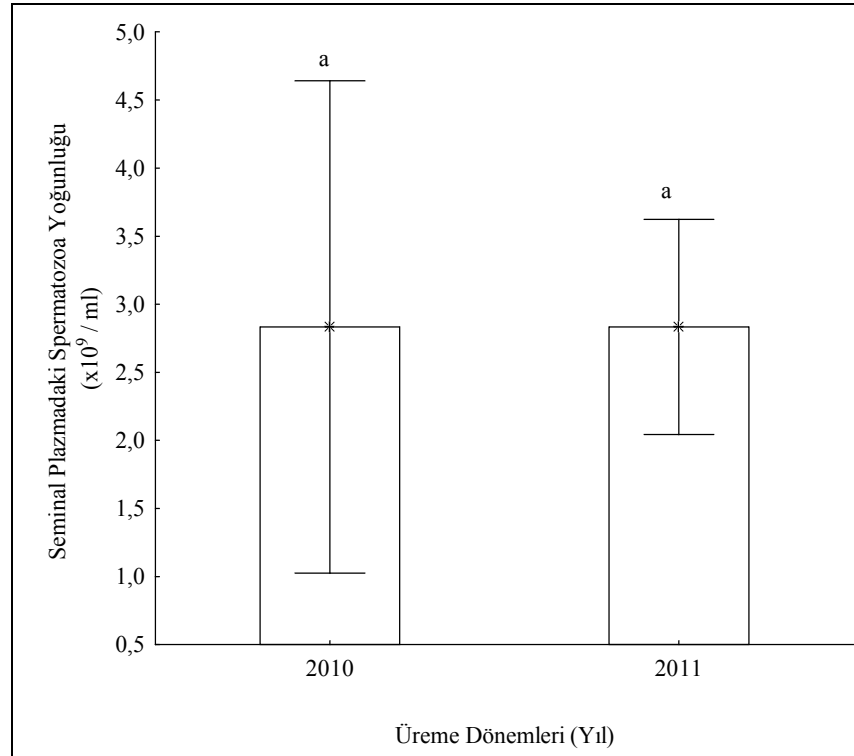
2010 yılı üreme döneminde kullanılan bireylerden elde edilen spermada en yüksek spermatozoa yoğunluğu $6,6 \times 10^9/\text{ml}$ ile dördüncü bireyde, en düşük ise $0,9 \times 10^9/\text{ml}$ ile birinci bireyde tespit edilmiştir. 2011 yılı üreme döneminde ise en düşük $2,4 \times 10^9/\text{ml}$ ile yedinci bireyden, en yüksek $4,0 \times 10^9/\text{ml}$ ile dokuzuncu bireyden elde edilmiştir. 2010 yılı üreme döneminde elde edilen spermatozoa yoğunluğu ortalama $3,0 \pm 1,7 \times 10^9/\text{ml}$, 2011 yılı üreme döneminde ise $3,0 \pm 0,5 \times 10^9/\text{ml}$ olarak hesaplanmıştır. Her iki dönem için 12 adet bireye ait elde edilen taze spermada spermatozoa yoğunluğu ortalama $3,03 \times 10^9/\text{ml}$ olarak bulunmuştur. 2010 ve 2011 yılı üreme dönemlerinde kullanılan bireylere ait spermatozoa yoğunluğu Tablo 4.7 ve Tablo 4.8’de verilmiştir. Her iki dönem karşılaştırıldığında spermatozoa yoğunluğu arasında istatistiksel bir fark olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0,05$) (Şekil 4.7).

Tablo 4.7: 2010 yılı üreme döneminde kullanılan bireylere ait taze spermada spermatozoa yoğunluğu ve ortalaması ($\pm$ SD)

Birey Numarası	Spermatozoa yoğunluğu ($\times 10^9/\text{ml}$)
1	0,9
2	3,1
3	2,3
4	6,6
5	2,3
6	3,1
Ortalama	3,0 $\pm$ 1,7

Tablo 4.8: 2011 yılı üreme döneminde kullanılan bireylere ait taze spermada spermatozoa yoğunluğu ve ortalaması ($\pm$ SD)

Birey	Spermatozoa yoğunluğu ($\times 10^9/\text{ml}$)
7	2,4
8	3,1
9	4,0
10	2,6
11	3,0
12	3,1
Ortalama	3,0 $\pm$ 0,5



Şekil 4.7: 2010 ve 2011 üreme dönemlerinde kullanılan balıklardan elde edilen taze spermada spermatozoa yoğunluğu ($p>0,05$)

4.2.5. Taze Spermada Spermatozoa Motilitesi

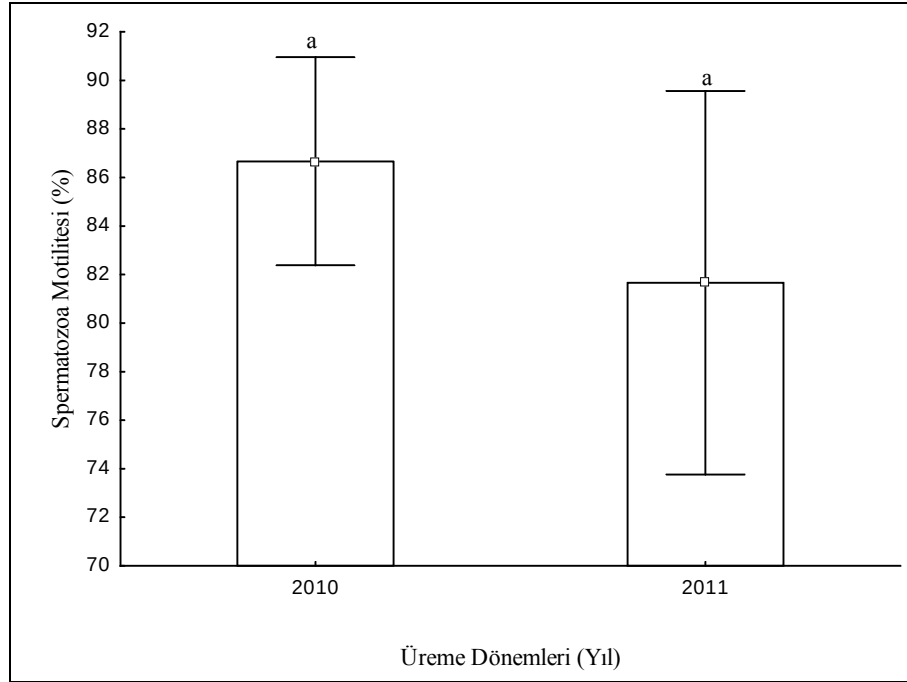
2010 yılı üreme döneminde taze spermada en düşük spermatozoa motilitesi %80 ile ikinci bireyde, en yüksek ise %90 ile birinci, üçüncü ve beşinci bireylerde tespit edilmiştir. 2011 yılı üreme döneminde en düşük spermatozoa motilitesi %70 ile dokuzuncu bireyde, en yüksek ise %90 ile sekizinci ve onbirinci bireylerde belirlenmiştir. 2010 yılı üreme döneminde ortalama spermatozoa motilitesi 86 ± 3 , 2011 yılı üreme döneminde ise 81 ± 6 olarak hesaplanmıştır. Her iki yılın üreme dönemleri için 12 adet bireye ait taze spermanın spermatozoa motilitesi ortalama 84 ± 6 olarak bulunmuştur. 2010 ve 2011 yılı üreme dönemlerine ait spermatozoa motiliteleri birey bazında Tablo 4.9 ve Tablo 4.10'da verilmiştir. Her iki üreme dönemine ait spermatozoa motilitesi ölçüm sonuçları karşılaştırıldığında elde edilen motilite değerleri arasında istatistiksel bir önem saptanmamıştır ($p > 0,05$) (Şekil 4.8).

Tablo 4.9: 2010 yılı üreme döneminde kullanılan bireylere ait taze spermada spermatozoa motilite değerleri ve ortalaması ($\pm$ SD)

Birey Numarası	Spermatozoa motilitesi (%)
1	90
2	80
3	90
4	85
5	90
6	85
Ortalama	86 $\pm$ 3

Tablo 4.10: 2011 yılı üreme döneminde kullanılan bireylere ait taze spermada spermatozoa motilite değerleri ve ortalaması ($\pm$ SD)

Birey Numarası	Spermatozoa motilitesi (%)
7	80
8	90
9	70
10	80
11	90
12	80
Ortalama	81 $\pm$ 6



Şekil 4.8: 2010 ve 2011 üreme dönemlerinde kullanılan balıklardan elde edilen taze spermada spermatozoa motiliteleri ($p > 0,05$)

4.2.6. Taze Spermada Spermatozoa Motil Kalma Süresi

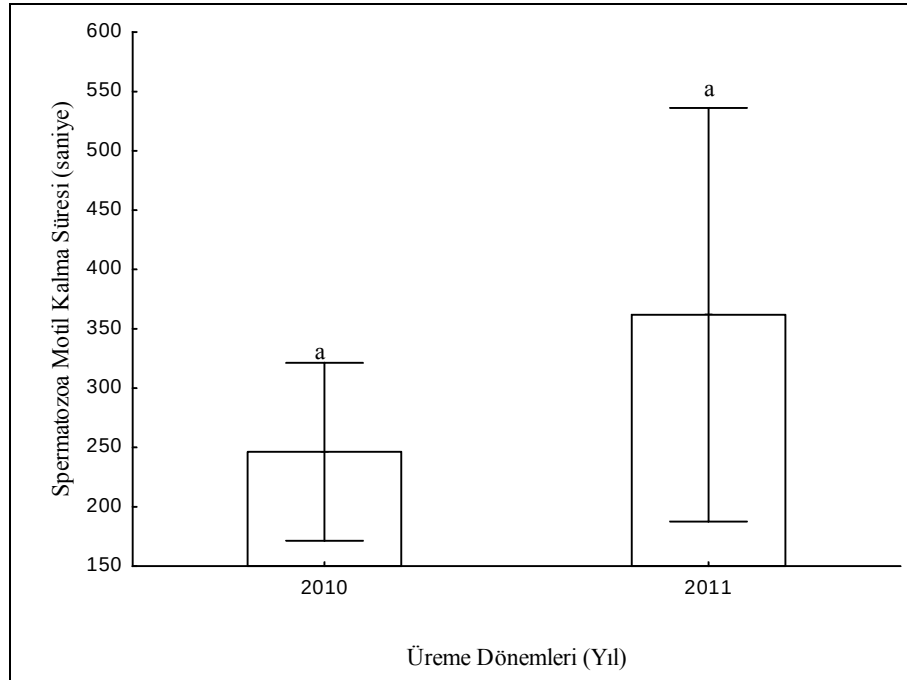
2010 yılı üreme döneminde taze spermada spermatozoa'nın motil kalma süresi en kısa 157 saniye ile üçüncü bireyde, en uzun ise 348 saniye ile altıncı bireyde tespit edilmiştir. 2011 yılı üreme döneminde taze spermada spermatozoa'nın motil kalma süresi en kısa 106 saniye ile dokuzuncu bireyde, en uzun ise 537 saniye ile onikinci bireyde belirlenmiştir. 2010 yılı üreme döneminde taze spermada spermatozoa'nın motil kalma süresi ortalama olarak 246 ± 65 saniye, 2011 döneminde ise 361 ± 151 saniye olarak hesaplanmıştır. Her iki yılın üreme dönemleri için 12 adet bireye ait taze spermada spermatozoa motil kalma süresi ise 304 ± 135 saniye olarak belirlenmiştir. 2010 ve 2011 yılı üreme dönemlerine ait taze spermada spermatozoa motil kalma süreleri birey bazında Tablo 4.11 ve Tablo 4.12' de verilmiştir. Her iki yılın üreme dönemleri arasındaki spermatozoa motil kalma süreleri sonuçları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p > 0,05$) (Şekil 4.9).

Tablo 4.11: 2010 yılı üreme döneminde kullanılan bireylere ait taze spermada spermatozoa motil kalma süreleri ve ortalaması ($\pm$ SD)

Birey Numarası	Spermatozoa motil kalma süresi (sn)
1	310
2	248
3	157
4	200
5	215
6	348
Ortalama	246 $\pm$ 65

Tablo 4.12: 2011 yılı üreme döneminde kullanılan bireylere ait taze spermada spermatozoa motil kalma süreleri ve ortalaması ($\pm$ SD)

Birey Numarası	Spermatozoa motil kalma süresi (sn)
7	320
8	250
9	106
10	478
11	480
12	537
Ortalama	361 $\pm$ 151



Şekil 4.9: 2010 ve 2011 üreme dönemlerinde kullanılan balıklardan elde edilen taze spermada spermatozoa motil kalma süreleri ($p > 0,05$)

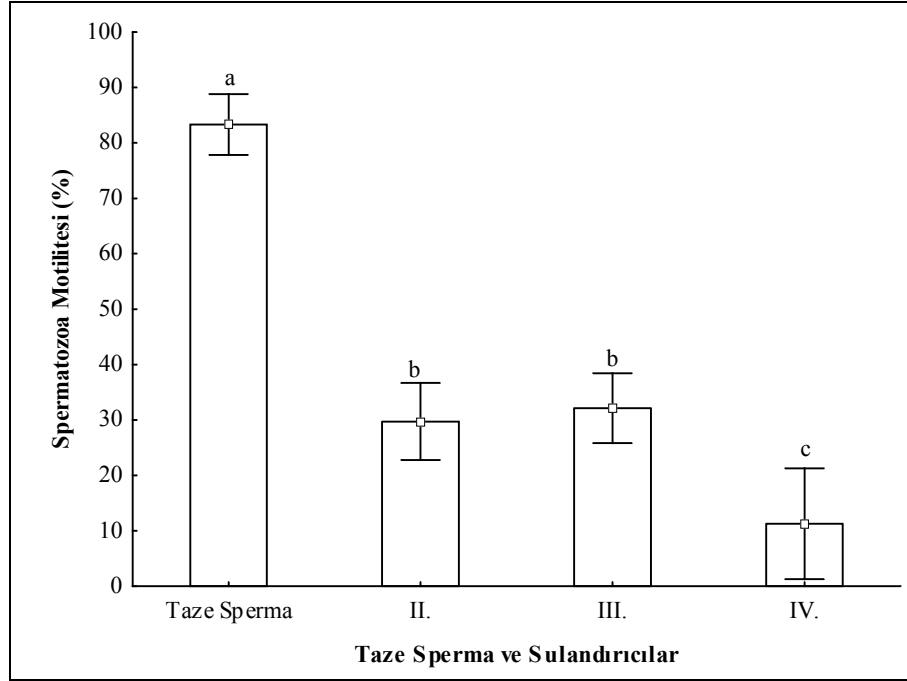
4.3. ÇÖZDÜRME SONRASI SAPTANAN SPERMATOLOJİK ÖZELLİKLER

Yapılan bu tez çalışmasında, her iki yılın üreme döneminde birbirinden farklı rus mersini bireyleri kullanılmıştır. Araştırmada kullanılan bireylere ait elde edilen taze spermanın spermatolojik özelliklerden spermatozoa motilitesi ve spermatozoa motil kalma süresi karşılaştırıldığında, bu parametrelerin her iki üreme dönemine ait değerleri arasında fark olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). Bu nedenle araştırmamızda kullandığımız farklı sulandırıcıların çözündürme sonrası spermada spermatozoa motilitesi ve motil kalma süreleri üzerine etkileri, dönem farkı gözetmeksizin ortalama veriler üzerinden incelenmiş ve istatistiksel karşılaştırma bu doğrultuda yapılmıştır.

4.3.1. Çözdürme Sonrası Spermatozoa Motilitesi

$\%84 \pm 6$ motiliteye sahip taze spermanın, farklı sulandırıcılar ile çözündürme sonrası elde edilen spermatozoa motilite yüzdeleri belirlenmiştir. Sulandırıcı I ile sulandırılıp dondurulduktan sonra çözdürülen spermada, 2010 ve 2011 döneminde çözündürme sonrası spermatozoa'da motilite elde edilememiştir. Sulandırıcı II ile işleme tabi tutulan örneklerde çözündürme sonrası spermatozoa motilitesi $\%28 \pm 15$, Sulandırıcı III için ise $\%30 \pm 12$ olarak tespit edilmiştir. Sulandırıcı IV ile dondurulan sperma örneklerinde çözündürme sonrası motilite $\%11 \pm 6,2$ olarak elde edilmiştir.

Taze spermanın spermatozoa motilitesi ile Sulandırıcı II, III ve IV'e ait çözündürme sonrası spermatozoa motilitesi karşılaştırıldığında, aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.10).



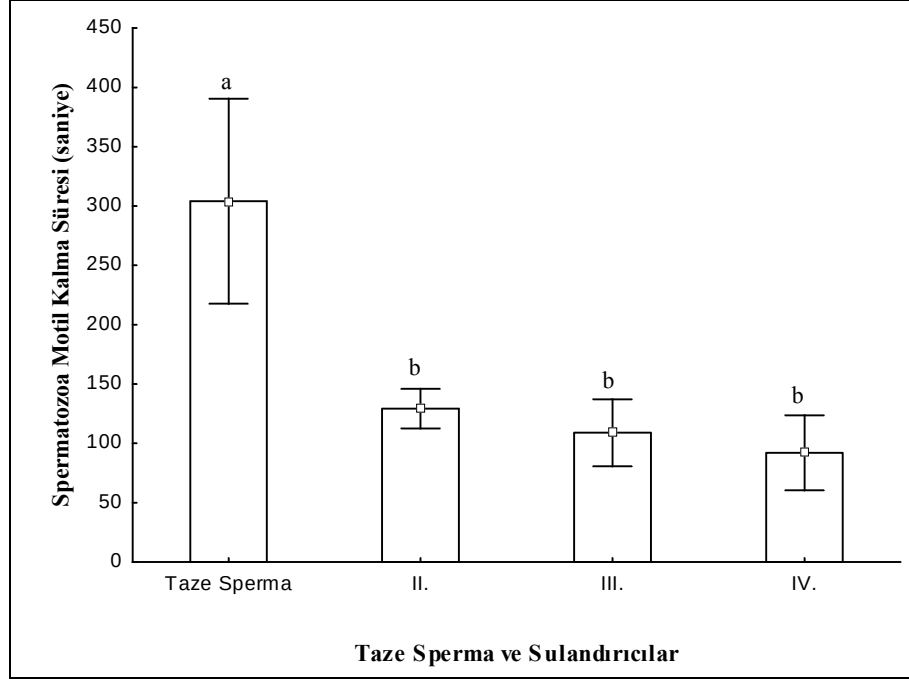
Şekil 4.10: Taze sperma ve her iki üreme dönemine ait örneklerde çözündürme sonrası motilite yüzdeleri

Sulandırıcıların çözündürme sonrası spermatozoa motilitesi bakımından kendi aralarında değerlendirilmeleri sonucunda, Sulandırıcı II ve Sulandırıcı III için çözündürme sonrası motilite yüzdelerindeki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p>0,05$). Bununla birlikte Sulandırıcı II ve Sulandırıcı IV için çözündürme sonrası motilite yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$). Sulandırıcı III ve Sulandırıcı IV arasında yapılan çözündürme sonrası spermatozoa motilitesi yönünden oluşan farklılık anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) (Şekil 4.7).

4.3.2. Çözündürme Sonrası Spermatozoa Motil Kalma Süresi

Çözündürme sonrası spermada spermatozoa motilite süresi, aktivasyon solüsyonu ile sulandırıldıktan sonra belirlenmiştir. Taze spermada motil kalma süresi ortalama 304 ± 135 saniyedir. Sulandırıcı I ile sulandırılıp dondurulduktan sonra çözündürülen sperma örneklerinde, her iki üreme döneminde de çözündürme sonrası motilite tespit edilmediğinden motilite süresi hesaplanmamıştır. Sulandırıcı II için çözündürme sonrası spermatozoa motil kalma süresi 129 ± 45 saniye, Sulandırıcı III için 103 ± 63 saniye, Sulandırıcı IV için 61 ± 49 saniye olarak tespit edilmiştir.

Taze spermanın spermatozoa motil kalma süresi ile Sulandırıcı II, III ve IV'e ait çözündürme sonrası spermatozoa motil kalma süreleri karşılaştırıldığında, aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.11).



Şekil 4.11: Taze sperma ve her iki üreme dönemine ait örneklerde çözündürme sonrası spermatozoa motil kalma süreleri

Taze spermanın, dondurma öncesi tespit edilen motil kalma süresi ile her bir sulandırıcı için elde edilen çözündürme sonrası motil kalma süreleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmasına rağmen, sulandırıcıların kendi aralarında yapılan değerlendirilmesinde Sulandırıcı II, Sulandırıcı III ve Sulandırıcı IV için çözüm sonrası spermatozoa motil kalma süreleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p>0,05$) (Şekil 4.11).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Doğal stoklardan yakalanmış ya da yetiştiricilik şartları altında anaç durumuna getirilmiş balıklardan kaliteli gamet elde edilebilmesi için, yetiştirilen türe özgü optimum su parametrelerinin sağlanması gerekmektedir.

Rus mersini balıklarının yumurtalarının açılması için 16°C, larvaların gelişimi için 19°C, balıkların türlerine göre, büyütme için 10-20°C ve pazar boyuna getirmek için 20-26°C su sıcaklığına ihtiyaç duydukları belirtilmektedir. Mersin balıkları için gerekli optimum pH değerinin alkali değere eğilimli ve 6,5-8,5 arasında; suda çözünmüş oksijen değerinin ise her dönemde 5 mg/l'nin üzerinde olması gerektiği bildirilmektedir (Dettlaff ve diğ., 1993; Mims ve diğ., 2002; Nathanailides ve diğ., 2002).

Sapanca Araştırma Birimi koşullarında beslenen anaç balıklardan sperma alımı denemesinin gerçekleştiği tarihlerde (2010-2011 üreme dönemi) su sıcaklığı ortalama 16-17°C, pH 7-8,5 ve çözünmüş oksijen değeri 7-9 mg/l olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.1, 4.2, 4.3). Deneme süresince belirlenen bu değerler mersin balıklarının üreme dönemleri için belirtilen optimum su parametreleri (sıcaklık, pH, çözünmüş oksijen) ile benzerlik göstermiştir.

Başarılı bir su ürünleri yetiştiriciliği için, balık üreticileri genellikle yumurta ve larva kalitesini göz önünde bulundururlar. Fakat üretimin istenilen verimde olabilmesi, yumurta kalitesinin yanı sıra döllemede kullanılan spermanın kalitesine de bağlıdır (Hoar, 1969; Ginzburg, 1972; Bromage, 1995; Rurangwa ve diğ., 2004; Mananos ve diğ., 2009). Döllemede kullanılacak spermanın kalitesini belirleyen parametreler; seminal plazmanın kimyasal içeriği, pH'sı, ozmolaritesi, spermatozoa motilitesi, motil kalma süresi, spermatozoa yoğunluğu, enzimatik aktiviteler, spermatozoon yapısı ve ATP konsantrasyonu olarak bildirilmektedir (Billard ve Cosson, 1992; Ciereszko ve

Dabrowski, 1993; Billard ve diğ., 1995a,b; Ciereszko ve diğ., 1996; Lahnsteiner ve diğ., 1996a, 1998; Geffen ve Evans, 2000; Chowdhury ve Joy, 2001; Fauvel ve diğ., 2010).

Döllemede kullanılacak taze spermanın kalitesini belirleyen spermatolojik özellikleri etkileyen bazı faktörler vardır. Bu faktörler; yetiştiricilik şartlarındaki fotoperiyod ortamı ve su sıcaklığı, anaç balıkların beslenme rejimi, anaç balıkların maruz kaldığı stres, anaç balıkların yaşı, üreme sezonu, hormon ve anestezi uygulamaları olarak sayılabilir (Billard ve diğ., 1995a; Glogowski ve diğ., 2002; Rurangwa ve diğ., 2004; Mananos ve diğ., 2009; Bobe ve Lable, 2010).

Başarılı bir su ürünleri yetiştiriciliği anaç bireylerin iyi yönetimi ve alınan gametlerin verimliliği ile sağlanmaktadır. Erkek anaç stoğunun oluşturulmasında kaliteli sperma veren bireylerin kullanılması üretimin sürekliliği için önemlidir. Bu nedenle Türkiye’de ilk defa Rus mersin balıkları sperması ile yapılan bu araştırmada; taze sperma miktarı, sperma pH’sı, seminal plazmanın ozmolaritesi, spermatozoa yoğunluğu, motilitesi ve motil kalma süresi belirlenmiştir. Yapılan araştırmada iki üreme döneminde farklı bireylerden sperma alınmış ve taze spermada belirlenen spermatolojik özelliklerin her iki dönem arasında istatistiksel olarak fark olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.4; 4.5; 4.6; 4.7; 4.8; 4.9) ($P>0,05$).

Mersin balıklarında üreme sezonu süresince bireylerden elde edilen toplam sperma miktarı fazladır ve Rus mersin balıklarından bir üreme döneminde elde edilen sperma miktarı 25-500 ml olarak rapor edilmiştir (Ginzburg, 1972; Dettlaff ve diğ., 1993). Hormon uygulamaksızın *A. fulvescens* anaç bireylerinden 4-32 ml (Toth ve diğ., 1997), *A. sturio*’dan 35 ml (Kopeika ve diğ., 2000) sperma elde edildiği bildirilmiştir. Park ve Chapman (2005) *A. brevirostrum* türü ile yapmış oldukları çalışmada elde edilen sperma miktarını 100-200 ml olarak belirtmişlerdir. Balıklarda üreme döneminin öncesinde hormon uygulaması sperma miktarını arttırmaktadır. *P. spathula* ve *A. transmontanus* balıklarından sperma elde etmek için yapılan çalışmada, sperma miktarının az olması nedeni ile sperma alımı için balıkların hormonla uyarılmak zorunda olduğunu ve LH-RH ve sazan hipofizi kullanarak sperma üretiminin arttırılabileceği bildirilmiştir (Mims, 1991; Van Eenennaam ve diğ., 1996; Linhart ve diğ., 2000). Linhart ve diğ., (2000) *P. spathula* türünde, sazan hipofizinin ve LH-RH

hormonunun sperma miktarı üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada, sperma miktarını sazan hipofizi uygulanmış bireylerde ortalama 24 ml, LH-RH uygulanmış bireylerde ortalama 66,7 ml olarak saptamışlardır. Brown ve Mims (1999) ise aynı türde LH-RH uygulanarak ortalama 20-30 ml sperma elde edildiğini rapor etmişlerdir. *A. baeri* ile yapılan çalışmalarda bazı araştırmacılar sperma miktarını ortalama 160 ml olarak ifade etmişken (Williot ve diğ., 2000) bazı araştırmacılar 8-295 ml arasında değiştiğini bildirmişlerdir (Glogowski ve diğ., 2002). Hormon olarak sazan hipofizi kullanılan *A. baeri* türünde sperma miktarı birey başına ortalama 20-100 ml arasında (Gallis ve diğ., 1991), mersin hipofizi uygulanan diğer bir çalışmada ise sperma miktarı 50 ml; *A. ruthenus*’ta ise 30 ml olarak belirlenmiştir (Tsevetkova ve diğ., 1996).

Araştırmamızda her iki üreme döneminde de LH-RH hormonu kullanarak birey başına ortalama 140 ± 84 ml sperma elde edilmiştir (Tablo 4.1; 4.2). İki üreme döneminde farklı bireylerden sperma alınmış ve taze sperma miktarı arasında istatistiksel olarak fark olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.4) ($P > 0,05$). Elde edilen sperma miktarının Ginzburg, (1972) ve Dettlaff ve diğ., (1993)’nin *A. gueldenstaedtii* ile yaptıkları çalışmalarda belirttikleri sperma miktarı (25-500 ml) ile benzer olduğu tespit edilmiştir.

Mersin balıklarında spermanın pH’sı 7-8,5 arasında değişim gösterdiği bildirilmektedir (Ginzburg, 1972; Dettlaff ve diğ., 1993). *A. baeri* yapılan bir çalışmada taze sperma pH’sı 7,5-8,1 arası değişim göstermiştir (Gallis ve diğ., 1991; Williot ve diğ., 2000). Psenicka ve diğ., (2008b) tarafından *A. baeri* ve *A. ruthenus* ile yapılmış olan çalışmada, elde edilen taze spermanın pH değerleri 8,16 ve 8,13 olarak bulunmuştur. Park ve Chapman (2005) *A. brevirostrum* ile yapmış oldukları çalışmada sperma pH’sını 7,9-8,2 olarak belirtmişlerdir.

Araştırmamızda her iki üreme döneminde 12 adet bireyden alınan spermanın pH değeri ortalama $7,8 \pm 0,23$ bulunmuştur. Bu değer diğer araştırmacıların çalışmaları ile benzerlik göstermektedir. Yapılan çalışmada her iki döneme ait spermanın pH değerleri arasında istatistiksel olarak fark olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.5) ($P > 0,05$).

Mersin balıklarında seminal plazmanın ozmotik basıncı sazan, alabalık ve deniz balıklarına nazaran daha düşüktür. Tatlı su teleostlarının seminal plazmasının ozmotik

basıncı 232 ile 400 mOsmol.kg⁻¹ arasında değişirken (Billard ve diğ., 1992; Suquet ve diğ., 1994; Tan-Fermin ve diğ., 1999; Linhart ve diğ., 2003), mersin balıklarında 38-100 mOsmol.kg⁻¹ arasındadır (Gallis ve diğ., 1991; Williot ve diğ., 2000). *A. baeri* türü ile yapılan çalışmalarda seminal plazmanın ozmolaritesi; 38 mOsmkg⁻¹ (Gallis ve diğ., 1991); 77 mOsmkg⁻¹ (Psenicka ve diğ., 2008b) olarak tespit edilmiştir. *A. ruthenus* türünde 69,7-79,1 mOsmkg⁻¹ (Piros ve diğ., 2002); 50 mOsmkg⁻¹ (Psenicka ve diğ., 2008b) olarak rapor edilmiştir. *A. brevirostrum* ile yapılmış bir çalışmada seminal plazmanın ozmotik basıncı 70-92 mOsmkg⁻¹ olarak belirtilmiştir (Park ve Chapman, 2005). *A. baeri* ile yapılan başka bir çalışmada seminal plazmanın ozmolaritesi (30-70 mOsmkg⁻¹) ile spermatozoa motilitesi arasında bir ilişki olmadığı rapor edilmiştir (Williot ve diğ., 2000). *P. spathula* türünde LH-RH hormonunun uygulandığı bireylerde spermanın ozmotik basıncı 48-62 mOsmkg⁻¹, sazan hipofizinin uygulandığı bireylerde ise 33-46 mOsmkg⁻¹ olarak rapor edilmiştir (Linhart ve diğ., 2003).

Seminal plazmanın ozmotik basıncı türler arasında farklılık gösterdiği gibi aynı türün bireyleri arasında da değişebilmektedir. Bu çalışmada her iki üreme döneminde 12 adet bireyden alınan spermanın ortalama ozmotik basıncı 88±44 mOsmkg⁻¹ olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.5; 4.6). Bu değer diğer araştırmacıların yapmış olduğu çalışmalar ile benzerlik göstermektedir. Yapılan çalışmada her iki döneme ait spermanın seminal plazmanın ozmolarite değeri arasında istatistiksel olarak fark olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.6) (P>0,05).

Mersin balıklarında polispermi görüldüğünden, başarılı bir dölleme için yumurta:spermatozoon oranının optimum şartlarda olması gerekmektedir (Ginzburg 1972; Dettlaff ve diğ., 1993; Hatef ve diğ., 2007).

A. persicus ile yapılan farklı çalışmalarda seminal plazmada spermatozoa yoğunluğu 8,34x10⁹/ml (Imanpoor ve diğ., 2011); 2,93x10⁹ /ml ve 2,22x10⁹/ml (Alipour ve diğ., 2009) olarak hesaplanmıştır. *A. brevirostrum* ile yapılmış olan çalışmalarda spermatozoa yoğunluğu 1,2-8,5x10⁹/ml (Park ve Chapman, 2005); 1,3x10⁹/ml (Horvath ve diğ., 2005) olarak rapor edilmiştir. *A. stellatus*'ta spermatozoa yoğunluğu 2,2x10⁹/ml (Alipour ve diğ., 2009) olarak hesaplanmıştır. *A. baeri*'de spermatozoa yoğunluğu 0,61x10⁹/ml; *A. ruthenus*'ta ise 0,41x10⁹/ml olarak hesaplanmıştır (Psenicka ve diğ.,

2008b). *A. baeri* ile yapılan bir çalışmada mersin hipofizi uygulanmış bireylerde spermatozoa yoğunluğu $0,2-1,5 \times 10^9$ arasında değişiklik göstermiştir (Glogowski ve diğ., 2002).

P. spathula türünde LH-RH hormonu uygulanmış bireylerde ml'deki spermatozoa yoğunluğu $0,1-4,0 \times 10^9$ (Cosson ve diğ., 2000) ve $6,9-8,5 \times 10^9$ olarak hesaplanmıştır (Horvath ve diğ., 2006). Linhart ve diğ., (2000) *P. spathula* ile LH-RH uygulayarak yaptıkları çalışmada spermatozoa yoğunluğunu $4,9-5,5 \times 10^9$ /ml hesaplamış ve bu değer, hormon uygulanmayan balıklardan hesaplanan spermatozoa miktarının 5 kat fazlası olduğunu rapor etmişlerdir. Rzemieniecki ve diğ., (2004) tarafından *A. ruthenus* ile yapılan çalışmada, GnRH hormonu uygulanan balıklarda spermatozoa yoğunluğu $6,4 \times 10^9$ /ml olarak belirtilirken; LH-RH uygulanmış bireylerde spermatozoa yoğunluğu $5,3 \times 10^9$ /ml olarak rapor edilmiştir. Aynı araştırmacı GnRH ve LH-RH hormonu uygulanarak alınan sperma örneklerinde, GnRH uygulanmış bireylerde sperma miktarını LH-RH uygulanmış bireylere göre daha az bulmalarına rağmen, spermatozoa motilitesi ve spermatozoa yoğunluğunu GnRH uygulanmış bireylerde daha fazla bulmuşlardır. Mirzoyan ve diğ., (2006) Gn-RH uygulanarak alınan Rus mersini spermasında spermatozoa yoğunluğunu $1,0 \times 10^9$ /ml olarak bildirmiştir.

Araştırmamızda her iki dönemde de LH-RH uygulanarak alınan spermada 12 adet bireye ait spermatozoa yoğunluğu ortalaması $3,03 \times 10^9$ olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.7; 4.8). Her iki döneme ait spermanın spermatozoa yoğunluğu arasında istatistiksel olarak fark olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.7) ($P > 0,05$). Farklı türlerden elde edilen spermatozoa yoğunluğunun farklı olmasının sebebi olarak; yetiştiricilik şartları, spermatozoa yoğunluğunun hesaplanmasında farklı metotlar, ölçüm metotlarına hazırlık aşamasında ki farklı yöntemler (Rurangwa ve diğ., 2004; Alavi ve diğ., 2007), farklı hormonların uygulanması (Linhart ve diğ., 2000; Piros ve diğ., 2002; Alavi ve diğ., 2006) gibi etkenler sıralanabilir.

Sperma dondurma çalışmalarında çözündürme sonrası spermatozoa motilitesi, dondurulmuş sperma ile yapılacak dölleme çalışmalarından önce dondurma çalışmasının başarısının kriteri olarak değerlendirilmektedir. Taze spermada %70'den az spermatozoa motilitesine sahip örnekler genellikle dondurma çalışmalarında

kullanılmamaktadır (Billard ve diğ., 1995b; Ciereszko ve diğ., 1996; Ballard ve diğ., 2000; Kopeika ve diğ., 2007; Kopeika ve Kopeika, 2007; Cabrita ve diğ., 2009).

Mersin balıklarında hem taze spermanın hem de işlem uygulanmış ve çözdürülmüş spermanın spermatozoa motilite yüzdesi ve motil kalma süresi hakkında yapılan çalışmaların sonuçları türe bağlı olarak ve tür içerisinde değişebilmektedir (Billard ve diğ., 2000). Mersin balıklarının taze spermasında spermatozoa motilitesi genellikle %100 olarak rapor edilmektedir (Di Lauro ve diğ., 1994; Brown ve Mims, 1995; Linhart ve diğ., 1995). Rus mersini spermasında spermatozoa motilitesi Mirzoyan ve diğ., (2006) tarafından %80-100; Urbanyi ve diğ., (2004) tarafından ise %50 olarak rapor edilmiştir.

Araştırmamızda her iki üreme döneminde 12 adet bireyden alınan spermada spermatozoa motilitesi ortalama 84 ± 6 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.9; 4.10). Her iki döneme ait spermada spermatozoa motilitesi yüzdeleri arasında istatistiksel olarak fark olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.8) ($P > 0,05$). Araştırmamızda belirlenen motilite yüzdesi Mirzoyan ve diğ., (2006)'nın elde ettiği spermatozoa motilite yüzdesi ile benzer, Urbanyi ve diğ., (2004) bildirdiği spermatozoa motilitesi yüzdesinden yüksek bulunmuştur.

P. spathula türünde LH-RH hormonu uygulanarak alınan spermada spermatozoa motil kalma süresinin 300-540 (Cosson ve diğ., 2000) ve 240-300 saniye olduğu rapor edilmiştir (Mims, 1991; Linhart ve diğ., 1995). Imanpoor ve diğ., (2011) tarafından yapılmış olan çalışmada *A. persicus* türüne ait taze spermada motilite süresi 316 saniye bulunmuştur. Ginzburg (1972), *H. huso*'da taze spermada spermatozoa motilite süresinin 180-300 saniye, Tsevetkova ve diğ., (1996) *A. ruthenus*'da 300-1200 saniye olarak belirtmişlerdir. Ballard ve diğ., (1999) *A. gueldenstaedtii* türü ile yaptıkları çalışmada spermatozoa motil kalma süresini 180-360 saniye olarak bildirmişlerdir.

Araştırmamızda her iki üreme döneminde 12 adet bireyden alınan spermada spermatozoa motil kalma süresi ortalama 304 ± 135 saniye olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.11; 4.12). Her iki üreme dönemine ait elde edilen spermada spermatozoa motil kalma süreleri arasında istatistiksel olarak fark olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.9) ($P > 0,05$).

Yaptığımız bu araştırmada, Sapanca Araştırma Biriminde beslenen Rus mersini erkek anaç balıkların spermasında spermatozoa motil kalma süreleri ile diğer mersin balıkları için literatürde belirtilen spermatozoa motil kalma süreleri arasında benzerlik olduğu tespit edilmiştir.

Sperma dondurulma çalışmalarında kriyoprezervasyonun başarısı, çözündürme sonrası spermatozoa motilitesinin yüzdesi ve dölleme başarısı ile belirtilmekte ve sperma dondurma işleminin başarısının, kullanılan sulandırıcı içeriğine ve kriyoprotektan'a bağlı olarak değiştiği farklı araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (Ciereszko ve diğ., 1996; Tsevetkova ve diğ., 1996; Babiak ve diğ., 2000; Billard ve diğ., 2000; Billard ve Zhang, 2001; Billard ve diğ., 2004; Kopeika ve diğ., 2007; Kopeika ve Kopeika, 2007; Horvath ve diğ., 2009).

Araştırmamızda kullanılan sulandırıcı I, II ve III, daha önce mersin balıklarında yapılan sperma dondurma çalışmalarında kullanılan ve en yüksek çözündürme sonrası motilite yüzdesi elde edilen sulandırıcılardır. Sulandırıcı IV ise araştırmamızda belirlenmiş ve mersin balıklarında ilk defa denenmiştir.

Sulandırıcı ve sperma sulandırıldıktan sonra türe ve sulandırıcı içeriğine bağlı olarak değişen ekilibrasyon sürelerine tabi tutulmaktadır. Mersin balıklarında ekilibrasyon süresi genellikle uygulanmamaktadır (Billard ve diğ., 2004). Jahnnichen ve diğ., (1999) *A. ruthenus* ile yapmış oldukları çalışmada, 15 dakikalık ekilibrasyon süresi uygulanan ve bu sürenin uygulanmadığı çalışma arasında dölleme sonuçlarında herhangi bir farklılık bulamamıştır. Alipour ve diğ., (2009) *A. persicus* ile yapmış oldukları çalışmada ekilibrasyon zamanını kullanmış ve çözündürme sonrası motilitede herhangi bir farklılık tespit edilmemiştir.

Yapılan araştırmamızda “**Sulandırıcı I**” olarak isimlendirilen sulandırıcının içeriği NaCl, KCl, NaHCO₃, %12 DMSO maddelerinden oluşmaktadır. Liu ve diğ., (2006) %90 motiliteye sahip *A. sinensis* sperması ile yapmış oldukları çalışmada Sulandırıcı I'i kullanmışlar ve çözündürme sonrası motiliteyi %80 olarak tespit etmişlerdir. Yapılan bu araştırmada, sperma örnekleri 1:3 (sperma:sulandırıcı) oranında sulandırma ile, 2,5 ml'lik ampuller içerisinde ve 0,5-2 saat arasında ekilibrasyon süresi uygulanarak

dondurulmuştur. Bizim araştırmamızda Sulandırıcı I, 0,5 ml'lik payetlerde 1:1 (sperma:sulandırıcı) sulandırma oranı ile ekilibrasyon süresi uygulanmadan kullanılmıştır. Araştırma sonunda Sulandırıcı I ile dondurulan örneklerde her iki dönemde de çözündürme sonrası motilite elde edilememiştir. Kullandığımız Sulandırıcı I ile çözündürme sonrası motilite elde edilememesinin nedeni olarak dondurma prosedürü, sulandırma oranı ve dondurma işleminin türler arası ve tür içindeki bireylerde yarattığı farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir (Billard ve Zhang, 2001; Billard ve diğ., 2004).

Araştırmamızda kullandığımız “**Sulandırıcı II**” olarak isimlendirilen (Sukroz, Tris, KCI ve %10 metanol) sulandırıcının mersin balıklarında kullanılan ideal bir sulandırıcı olduğu ifade edilmektedir (Tsevetkova ve diğ., 1996; Glogowski ve diğ., 2002; Horvath ve diğ., 2008).

Horvath ve diğ., (2006) tarafından *P. spathula* ile %100 motiliteye sahip spermada yapılan çalışmada 0,5 ml payet, sıvı azot buharı ve Sulandırıcı II kullanılmış ve örneklerde çözündürme sonrası motilite %85 bulunmuştur. Aynı araştırmacı sulandırıcı içeriğindeki kriyoprotektan olarak %5 metanol kullandığında çözündürme sonrası motiliteyi %50 olarak belirlemişlerdir. Kriyoprotektan olarak DMSO'yu %5 ve %10 oranında kullandığında ise motiliteyi sırası ile %30 ve %20 olarak saptamışlardır.

Horvath ve diğ., (2005) ekilibrasyon uygulamaksızın, *A. brevirostrum* ile yapmış oldukları çalışmada 0,5 ml'lik payet ve sıvı azot buharı kullanarak, %77 motiliteye sahip taze spermada 1:1 sulandırma oranı ile çalışmamızdaki Sulandırıcı II'yi kullanmışlar ve çözündürme sonrası motiliteyi %13 bulmuşlardır. Araştırmacılar Sulandırıcı II içerisinde kriyoprotektan olarak metanolün yerine DMSO'yu %5, %10 ve %15 oranında kullandıklarında ise çözündürme sonrası motiliteyi sırası ile %26, %17 ve %2 olarak rapor etmişlerdir. Aynı araştırmacılar daha sonra yaptıkları diğer bir çalışmalarında payet ve sıvı azot buharı yöntemi ile Sulandırıcı II'yi kullanmışlar ve çözündürme sonrası en yüksek motiliteyi %11 olarak saptamışlardır (Horvath ve diğ., 2008).

A. baeri türünde %80 motiliteye sahip sperma ile ekilibrasyon zamanı uygulamadan 0,25 lik payetler ile sıvı azot buharında Sulandırıcı II kullanılarak yapılan çalışmada çözündürme sonrası motilite %15 bulunmuştur (Glogowski ve diğ., 2002). *A. ruthenus* 'ta, taze spermada spermatozoa motilitesi %90 ve %80 olan bireylerin spermaları Sulandırıcı II ile dondurulup çözündürüldüğünde çözündürme sonrası motilite sırası ile %70 ve %40 bulunmuştur. *A. baeri* 'de %70 olan spermatozoa motilitesi sulandırıcı II ile dondurulduktan sonra %40'a düşmüştür. *A. sturio* 'da ise %90 motiliteye sahip bireylerin taze spermaları Sulandırıcı II ile dondurulduktan sonra çözündürme sonrası motilite %70; taze spermada %85 motiliteye sahip bireylerin spermalarının ise motilitesinin %60 olduğu rapor edilmiştir (Urbanyi ve diğ., 2004).

Urbanyi ve diğ., (2004) tarafından *A. gueldenstaedtii* türü ile yapılmış olan çalışmada dondurma prosedürü olarak 0,5 ml'lik payet ve sıvı azot buharı kullanılmış, %50 motiliteye sahip taze spermanın Sulandırıcı II kullanarak sulandırılıp dondurulması sonucu çözündürme sonrası motilite %30 olarak bulunmuştur.

Sulandırıcı II kullanılarak yapılan çalışmalara ek olarak bazı araştırmacılar sulandırıcı içeriğinde bulunan kimyasal malzemeleri sabit tutmak şartı ile kimyasalların konsantrasyonlarını değiştirerek kullanmışlardır. Psenicka ve diğ., (2008a) *A. ruthenus* 'ta %76 motiliteye sahip spermanın dondurulmasında KCl oranında değişiklik yaparak, 0,25 ml payet ve sıvı azot buharı kullanmış, çözündürme sonrası motiliteyi %48 olarak elde etmişlerdir. Aynı araştırmacılar sulandırıcı içerisinde kriyoprotektan olarak metanol yerine %10 DMSO kullandığında çözündürme sonrası motiliteyi %40 oranında belirlemişlerdir. *A. baeri* 'de %80 motiliteye sahip taze spermanın 10 mM tris, 25 mM NaCl, %10 oranında metanol içeren sulandırıcı ile dondurulması sonucu çözündürme sonrası motilite %15 ve 20 mM tris, 400 mM sukroz, %10 metanol kullanılarak hazırlanan sulandırıcı da çözündürme sonrası motilite ise %14 olarak tespit edilmiştir (Glogowski ve diğ., 2002). *P. spathula* 'da %98 motiliteye sahip sperma ile yapılan bir çalışmada, 20 mM tris, 30 mM sukroz ve 0,5 mM KCl bazlı sulandırıcıda kriyoprotektan olarak %8 ve %10 oranında metanol'ün kullanıldığı sulandırıcının çözündürme sonrası motilitesi sırası ile %64 ve %75 olarak tespit edilmiştir (Linhart ve diğ., 2006). Aynı araştırmacılar sulandırıcı içerisinde %8 ve %10 oranında DMSO'yu 1:1 sulandırma oranı ile kullanmış ve çözündürme sonrası sırası ile %70 ve %86 motilite

elde etmişlerdir. Boryshpolets ve diğ., (2011)'nin %97 spermatozoa motilitesine sahip *A. ruthenus* sperması ile yaptıkları çalışmada, 1:1 oranında, 1 mM KCl+ 25 mM tris-HCl+ 30 mM sukroz ve kriyoprotektan olarak sırası ile %5 metanol, %10 metanol, %5 DMSO ve %10 DMSO içeren sulandırıcı denemiş ve çözdüme sonrası motiliteyi sırası ile; %28, % 46, %30 ve %45 olarak bulmuşlardır. Dzyuba ve diğ., (2010) *A. ruthenus* türünde %100 motil spermatozoa içeren spermada 30 mM sukroz, 1 mM KCl, 25 mM tris-HCl ve %5 metanol içeren sulandırıcı ile 1:1 oranında sulandırılan örneklerde çözdüme sonrası motiliteyi %20-30 arasında bulmuşlardır.

Yapılan bu araştırmada Sulandırıcı II ile sulandırıldıktan sonra dondurulan ve çözdümlenen örneklerde çözdüme sonrası motilite 28 ± 15 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.7). Tespit edilen motilite yüzdesi diğer araştırmacıların sonuçları ile karşılaştırıldığında, Psenicka ve diğ., (2008a) ile Horvath ve diğ., (2006)'nin elde ettikleri sonuçlardan düşük, Glogowski ve diğ., (2002) ile Horvath ve diğ., (2005)'in elde ettikleri motilite değerinden ise yüksek bulunmuştur. Urbanyi ve diğ., (2004)'nin elde ettiği sonuçla benzerlik göstermiştir. Yukarıda belirtilen araştırmalarda çözdüme sonrası farklı motilite elde edilmesi sebebi olarak, farklı mersin türlerinin kullanılması veya sulandırıcı içerisindeki maddelerin değişik oranlarda kullanılması olarak gösterilebilir. Sulandırıcı II içeriğinde kullanılan maddelerin oranının değiştirilmesi ile yapılan dondurma çalışmalarının sonuçları ile, araştırmamızda kullanılan Sulandırıcı II'ye ait çözdüme sonrası motilite yüzdesi, sulandırıcı içeriği farklılığının dondurma işleminin sonuçlarını etkilediği bildirildiğinden (Liu, 1997; Babiak ve diğ., 2000; Lahnsteiner ve diğ., 2004; Liu ve diğ., 2006) mukayese edilmemiştir.

Araştırmamızda “**Sulandırıcı III**” olarak isimlendirilen sukroz, Tris-HCl, %20 Yumurta Sarısı, %15 DMSO içerikli sulandırıcı kullanılmıştır. Mirzoyan ve diğ., (2006) %80-100 değişen motiliteye sahip *A. gueldenstaedtii* spermasını 2 ml'lik kriyotüplerde Sulandırıcı III'ü kullanarak, 20 dakika ekilibrasyon süresi ile dondurmışlardır. Çözdüme sonrası motiliteyi %20-40 arasında elde etmişlerdir. Dzyuba ve diğ., (1999) yaptıkları çalışmada *A. gueldenstaedtii* spermasının dondurulmasında sulandırıcı III içeriğinde bulunan sukrozu çıkararak çözdüme sonrası %20-40 arasında motilite elde etmişlerdir. Aynı araştırmacılar *H. huso* spermasında çözdüme sonrası motiliteyi %25-40, *A. stelattus* türünde %55-60, *A. ruthenus*'ta ise %35-50 olarak tespit etmişlerdir.

Alipour ve diğ., (2009) %86 motiliteye sahip taze *A. persicus* sperması ile yapmış oldukları çalışmada spermayı, Sulandırıcı III'ü kullanarak, 1:1 sulandırma oranı ile, 0,5 ml payetler ve programlanabilir otomatik soğutucu kullanarak dondurmuşlardır. Örneklerde çözündürme sonrası motilite %32 olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada %73 motiliteye sahip *A. stellatus* sperması denenmiş ve çözündürme sonrası motilite %37 olarak saptanmıştır. Billard ve diğ., (2000) %88 motiliteye sahip *A. baerii* sperması ile yaptıkları çalışmada, spermaları 2,5 ml'lik kriyotüplerde ekilibrasyon zamanı kullanmadan dondurmuşlar ve çözündürme sonrası motiliteyi %23 elde etmişlerdir.

Tsevetkova ve diğ., (1996) 0,5 ml payet ve Sulandırıcı III'ü kullanarak yaptıkları dondurma çalışmasında, spermatozoa motilitesi %88 olan *A. ruthenus* spermasında çözündürme sonrası motiliteyi %23 olarak rapor etmişlerdir. Aynı araştırmacılar sulandırıcıyı %68 motiliteye sahip taze *A. baeri* sperması ile denediklerinde çözündürme sonrası motiliteyi %25 olarak tespit etmişlerdir.

Araştırmamızda sulandırıcı III ile dondurulan örneklerde çözündürme sonrası motilite 30 ± 12 olarak bulunmuştur. Mirzoyan ve diğ., (2006) *A. gueldenstaedtii* ile yaptığı çalışmada bizim araştırmamızdan farklı olarak payet yerine kriyotüp ve ekilibrasyon uygulamış olmasına rağmen elde ettiğimiz çözündürme sonrası motilite değeri bu çalışma sonucu ile benzerlik göstermektedir.

Mersin balıkları spermasının dondurulmasında kullanılan kriyoprotektan eklenmemiş sulandırıcılar, izotonik ortam yaratması, içerdikleri besin maddeleri, kullanılması tercihe kalmış antioksidanlar ve antibakteriyel maddeler ile sperma için uygun bir ortam yaratırlar (Stoss, 1983).

Araştırmamızda “**Sulandırıcı IV**” olarak isimlendirilen (sukroz, glutatyon, KHCO_3 , DMSO) sulandırıcı diğer 3 sulandırıcıdan farklı olarak antioksidan (glutatyon) içeren tek sulandırıcıdır. Bu güne kadar hiçbir mersin balığı türünde kullanılmamış olan Sulandırıcı IV, *A. gueldenstaedtii* türünün spermasının dondurulmasında ilk defa denenmiştir. 2010 üreme döneminde kullanılan sperma örneklerinde bu sulandırıcı ile dondurulan örneklerin çözündürme sonrası motilite elde edilmemiştir. Bir sonraki üreme döneminde tekrarlanan araştırmada ise motilite elde edilmiştir. Aynı türün farklı

bireyleri ile çalışıldığında dondurma-çözdürme işleminden sonra elde edilen motilite yüzdeleri arasında farklılık olmadığı belirtilmektedir (Linhart ve diğ., 2006). Oysa bizim araştırmamızda 2010 ve 2011 üreme döneminde çözdürme sonrası elde edilen farklı motilite sonuçlarının bireylerin farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir (Liu ve diğ., 1997; Babiak ve diğ., 2000; Lahnsteiner ve diğ., 2004; Liu ve diğ., 2006).

Sulandırıcı IV ile dondurulan sperma örneklerinde çözdürme sonrası motilite 11 ± 6.2 olarak bulunmuştur. Mounib (1978), %90 spermatozoa motilitesine sahip Atlantik salmon spermasında bizim araştırmamızda kullandığımız sulandırıcı IV kullanarak çözdürme sonrası motiliteyi %22-33 arasında tespit etmiştir. Aynı araştırmacı sulandırıcı IV içindeki sukroz, glutatyon ve potasyum bikarbonat'ın dondurma işlemi sırasında spermatozoa'nın ileri doğru hareketini ve dölleme yeteneğini koruduğunu belirtmektedir. Araştırmamızda Sulandırıcı IV ile bulduğumuz çözdürme sonrası motilite yüzdesi düşük olmasına rağmen *A. gueldenstaedtii* balıklarında ilk defa denenmiş olması ve düşükte (11 ± 6.2) olsa sonuç vermesi bu sulandırıcının daha sonraki çalışmalarda modifiye edilerek kullanılabileceğini göstermektedir.

Balıklarda spermada spermatozoa, dondurma-çözdürme işlemi sırasında zarar görmekte ve taze spermada yüksek olan motilite oranı çözdürme sonrası azalmaktadır (Rana, 1995a,b; Tsevetkova ve diğ., 1996; Billard ve diğ., 2000; Kopeika ve Kopeika, 2007; Linhart ve diğ., 2009). Mersin balıklarının spermatozoonunda diğer tatlı su balıklarından farklı olarak akrozom bulunur ve akrozom reaksiyonu spermanın dondurulması işlemi sırasında aktive olur. Bu durum, mersin spermasının dondurulması-çözdürülmesi işlemlerinden sonra motilitede ve döllemede elde edilen düşük sonuçların sebeplerinden biri olarak görülmektedir (Psenicka ve diğ., 2008a).

Araştırmada taze spermada motilite (84 ± 6) ile II, III ve IV numaralı sulandırıcılara ait çözdürme sonrası motilite değerleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$) (Şekil, 4.10). Sulandırıcı II, III ve IV'ün çözdürme sonrası motilite değerlerinin kendi aralarında yapılan istatistiksel değerlendirmede Sulandırıcı II (28 ± 15) ve III (30 ± 12) arasında herhangi bir fark olmadığı ($p > 0,05$) tespit edilmiştir. En düşük çözdürme sonrası motiliteye sahip Sulandırıcı IV (11 ± 6.2),

Sulandırıcı II ve III ile karşılaştırıldığında ise aralarında önemli bir fark olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.10).

Araştırmamızda her iki üreme döneminde 12 adet bireyden alınan spermada ortalama 304 ± 135 saniye olan spermatozoa motil kalma süresi, Sulandırıcı II, III ve IV ile dondurulduktan sonra her bir sulandırıcı için düşmüştür. Spermatozoa motil kalma süresinin sonuçları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında taze sperma ile sulandırıcılar arasında anlamlı bir fark bulunduğu tespit edilmişken ($p<0,05$) sulandırıcıların kendi aralarında yapılan karşılaştırmada bir fark olmadığı görülmüştür (Şekil 4.11). Alipour ve diğ., (2009) *A. persicus* ve *A. stellatus*'ta yapmış oldukları sperma dondurma çalışmasında, araştırmamızda kullanılan Sulandırıcı III' ü kullanmış ve ortalama 310 saniye olan spermatozoa motil kalma süresini çözündürme sonrası 210 saniye olarak tespit etmişlerdir. Bizim araştırmamızda ise Sulandırıcı III ile dondurulup çözündürülen örneklerde spermatozoa motil kalma süresi 103 ± 63 saniye olarak saptanmıştır. Elde edilen bu sonuç yapılan diğer araştırma ile benzerlik göstermiştir.

Sonuç olarak bu araştırmada, mersin balıklarında günümüze kadar yaygın olarak kullanılan üç farklı sulandırıcının, *A. gueldenstaedtii* türünde kullanılabilirliği denenerek en etkili sulandırıcı tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu güne kadar Mersin balıkları spermalarının dondurulması ile ilgili yapılan çalışmalarda kullanılan sulandırıcıların içerikleri, kriyoprotektan maddeler, maddelerin konsantrasyonları, dondurma prosedürü birbirlerinden farklılık göstermiştir. Dondurma işleminin başarısını etkileyen ilk faktör olarak “sulandırıcı” ele alındığında, çözüm sonrası en iyi motiliteyi veren sulandırıcı, tür farklılığı gözetmeksizin, farklı araştırmalarda uygulanmıştır. Sulandırıcı çeşitliliğindeki farklılığın yanı sıra aynı sulandırıcının farklı dondurma prosedürleri ile denendiği çalışmalar da mevcuttur. Sulandırıcı içerisinde kimyasalların sabit tutulduğu ancak sperma hücrelerinin canlılığını devam ettirmesinde en önemli madde olan kriyoprotektanın değiştirildiği literatürlerde mevcuttur. Mersin balıklarının spermalarının dondurulmasında yapılan bütün bu araştırmalar mersin balıklarında türe özgü bir dondurma prosedürü oluşturmaya ve aynı zamanda en ideal kriyoprotektanın en etkili olduğu sulandırıcı içeriğini belirlemeye yöneliktir. *A. gueldenstaedtii* ile yapılan çalışmaların az oluşunun nedenleri; üreme olgunluk yaşının geç olması ve diğer mersin türlerine göre ağırlık ve boyunun daha fazla olması ile sperma alımındaki

zorluklar gösterilebilir. Türkiye’de *A. gueldenstaedtii* türünde dondurma-çözdürme sonrası yüksek motilite oranı elde etmek için sulandırıcılar üzerine yapılan benzer araştırmaların geliştirilmesi gerekmektedir. Özellikle Karadeniz havzasında bulunan mersin balıklarının korunması ve aynı zamanda genetik materyallerinin saklanmasına yönelik sperma dondurma tekniklerinin geliştirilmesi üzerine yapılacak çalışmalar ülkemiz açısından oldukça büyük önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- AKBULUT, B., ZENGİN, M., ÇİFTÇİ, Y., USTAOĞLU, T.S., MEMİŞ, D., ALKAN, A., ÇAKMAK, E., ÜSTÜNDAĞ, E., 2010, Mersin Balıkları Populasyonlarının Mevcut Durumlarının Belirlenmesi ve Yetiştiricilik İmkanlarının Araştırılması, Proje Sonuç Raporu, Proje No. TAGEM/HAYSÜD/2006/09/02/01, Trabzon.
- AKÇAY, E., BOZKURT, Y., SEÇER, S., TEKİN, N., 2004, Cryopreservation of Mirror Carp Semen, *Turk J Vet Anim Sci*, 28, 837-843.
- ALAVI, S.M.H., COSSON, J., KARAMI, M., MOJAZI, A.B., AKHOUNDZADEH, M.A., 2004a, Spermatozoa motility in the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*: Effect of pH, dilution rate, ions and osmolality, *Reproduction*, 128, 819-828.
- ALAVI, S.M.H., COSSON, J., KARAMI, M., ABDOULHAY, H., MOJAZI, A.B., 2004b, Chemical composition and osmolality of seminal plazma of *Acipenser persicus*, their physiological relationship with sperm motility, *Aquaculture Research*, 35, 38-43.
- ALAVI, S.M.H. and COSSON, J., 2005, Sperm motility in fishes: (I) Effectsof temperature and pH: a review, *Cell Biol. Int*, 29, 101–110.
- ALAVI, S.M.H., COSSON, J., 2006, Sperm motility in fishes: (II) Effectsof ions and osmolality, *Cell Biol. Int*, 30, 1–14.
- ALAVI, S.M.H., LINHART, O., COWARD, K., RODINA, M., 2007, *Fish spermatology:implications for aquaculture management*, In: ALAVI, S.M.H., COSSON, J.J., COWARD, K., RAFIEE, G., (ed.), *Fish Spermatology*, Chapter 12, Alpha Science International Ltd, Oxford, U.K, 397-461.
- ALAVI, S.M.H., RODINA, M., COSSON, J., PSENICKA, M., LINHART, O., 2008, Roles of extracellular Ca^{2+} and pH on motility and flagellar waweform parametres in sturgeon spermatozoa, *Cybium*, 32,2,124-126.
- ALIPOUR, A., BARADAN NOVEIRI, S., NOWRUZFASHKHAMI, M.R., POURKAZEMI, M., 2009, Fertilizing ability of cryopreserved spermatozoa in the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) and stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*), *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 8,1,1-12.
- ARTYUKHIN, E.N., SEMENKOVA, T.B., BAYUNOVA, L.V., LUNEV, G.E., BARANNIKOVA, I.A., 2006, Histological assessment of the testes coupled with

- determinations of sex steroid levels in *Acipenser gueldenstaedtii* males responding negatively to pituitary treatment, *Journal of Applied Ichthyology*, 22, 361-363.
- BABIAK, I., GLOGOWSKI, J., LUCZYNSKI, M., GORYCZKO, K., DOBOSZ, S., KUZMINSKI, H., 1998, The effect of individual male potency on fertilization ability of fresh and cryopreserved milt of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) *Aquaculture Research*, 29, 337-340.
- BABIAK, I., BRZISKA, E., PERKOWSKI, J., 2000, Fractional factorial design of screening experiments on cryopreservation of fish sperm, *Aquaculture research*, 31(3), 273-282.
- BARANNIKOVA, I.A., BAYUNOVA, L.V., SEMENKOVA, T.B., 2006, Serum sex steroids and their specific cytosol binding in the pituitary and gonads of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt) during final maturation, *Journal of Applied Ichthyology*, 22, 331-333.
- BAT, L., ERDEM, Y., TIRIL, S.U., YARDIM, Ö., 2008, *Balık Sistematiği*, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 978-605-395-127-8.
- BAULNY, O.B., VERN, Y.L., KERBOEUF, D., MAISSE, G., 1997, Flow Cytometric Evaluation of Mitochondrial Activity and Membrane Integrity in fresh and Cryopreserbed Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Spermatozoa, *Cryobiology*, 34, 2, 141-149.
- BAYNES, S.M., SCOTT, A.P., DAWSON, A.P., 1981, Rainbow trout, *Salmo gairdneri* spermatozoa: effects of cations and pH on motility, *Journal of Fish Biology*, 19, 259-267.
- BAYUNOVA, L., CANARIO, A.V.M., SEMENKOVA, T., DYUBIN, V., SVERDLOVA, O., TRENKLER, I., BARANNIKOVA, I., 2006, Sex steroids and cortisol levels in the blood of stellate sturgeon (*Acipenser stellatus* Pallas) during final maturation induced by LH-RH-analogue, *Journal of Applied Ichthyology*, 22, 334-340.
- BEAUMONT, A.R., HOARE, 2003, *Biotechnology and Genetics in Fisheries and Aquaculture*, Blackwell Science, USA, 0-632-05515-4.
- BEMIS, W.E., E. FINDEIS, E.K., and L. GRANDE, L., 1997, An overview of *Acipenseriformes*, *Environmental Biology of Fishes*, 48, 25-71.
- BILLARD, R., 1978, Changes in structure and fertilizing ability of marine and freshwater fish spermatazoa diluted in media of various salinities, *Aquaculture*, 14, 187-198.
- BILLARD, R. and COSSON, M.P., 1992, Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish, *Journal of Experimental Zoology*, 261, 2, 122-131.

- BILLARD, R., COSSON, J., CRIM, L.W., SUQUET, M., 1995a, *Sperm physiology and quality*, In: ROBERTS, R.J., BROMAGE, N.R. (Eds.), *Brood stock management and egg and larval quality*, Blackwell Science, Cambridge University Press Cambridge, 25-52.
- BILLARD, R., COSSON, J., PERCHEC, G., LINHART, O., 1995b, Biology of sperm and artificial reproduction in carp, *Aquaculture*, 124, 95–112.
- BILLARD, R., COSSON, J., FIERVILLE, F., BRUN, R., ROUAULT, T., WILLIOT, P., 1999, Motility analysis and energetics of the Siberian sturgeon *Acipenser baerii* spermatozoa, *Journal of Applied Ichthyology*, 15, 199-203.
- BILLARD, R., COSSON, J., LINHART, O., 2000, Changes in the flagellum morphology of intact and frozen/thawed Siberian sturgeon *Acipenser baeri*, Brand, sperm motility, *Aquaculture Research*, 30, 1-5.
- BILLARD, R. and LECOINTRE, G., 2001, Biology and conservation of sturgeon and paddlefish, *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10, 355-392.
- BILLARD, R. and ZHANG, T., 2001, *Techniques of Genetic Resource Banking in Fish*, In: WATSON, P.F and HOLT, W.V. (eds), *Cryobanking the Genetic Resource*, Chapter 9, Taylor & Francis Press, New York, USA, 143-170.
- BILLARD, R., COSSON, J., NOVEIRI, S.B., POURKAZEMI, M., 2004, Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review, *Aquaculture*, 236, 1-9.
- BOBE, J. and LABLE, C., 2010, Egg and sperm quality in fish, *Gen. Comp. Endocrinol*, 165, 1-3.
- BORYSHPOLETS, S., DZYUBA, B., RODINA, M., ALAVI, S.M.H., GELA, D., LINHART, O., 2011, Cryopreservation of sterlet (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa using different cryoprotectants, *Journal of Applied Ichthyology*, 27, 1147-1149.
- BOZKURT, Y., SEÇER, S., TEKİN, N., AKÇAY, E., 2005, Cryopreservation of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Mirror carp (*Cyprinus carpio*) sperm with glucose based extender, *Süleyman Demirel Üniversitesi, Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 1, 1, 21-25.
- BROMAGE, N., 1995, *Broodstock management and seed quality-general considerations*, In: ROBERTS, R.J, BROMAGE, N.R. (Eds.), *Broodstock management and Egg and Larval Quality*, Blackwell Science, Cambridge University Press Cambridge, 1-24.
- BROWN, G.G. and MIMS, S.D., 1995, Storage, transportation and fertility of undiluted and diluted paddlefish milt, *Prog.Fish-Cult*, 57, 64-69.

- BROWN, G.G. and MIMS, S.D., 1999, Cryopreservation of Paddlefish *Polyodon spathula* milt, *Journal of the World Aquaculture Society*, 30, 245-249.
- BÜYÜKHATİPOĞLU, S. and HOLTZ, W., 1978, Preservation of trout sperm in liquid or frozen state, *Aquaculture*, 14, 1, 49-56.
- BUCAK, M.N., TEKİN, N., 2007, Kryoprotektanlar ve gamet hücrelerinin dondurulmasında kryoprotektif etki, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 54, 67-72.
- CABRITA, E., ALVAREZ, R., ANEL, L., RANA, K.J., HERRAEZ, M.P., 1998, Sublethal Damage during Cryopreservation of Rainbow Trout Sperm, *Cryobiology*, 37, 245-253.
- CABRITA, E., ROBLES, V., ALVAREZ, R., HERRAEZ, M.P., 2001, Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization, *Aquaculture*, 201, 3-4, 301-314.
- CABRITA, E., ROBLES, V., HERRAEZ, P., 2008, *Sperm quality Assessment*, In: CABRITA, E., ROBLES, V., HERRAEZ, P. (ed), *Methods in Reproductive Aquaculture, Marine and Freshwater species*, Section III, CRC Press, Taylor & Francis Group, USA, pp. 93-148.
- CHAO, N.H., CHAO, W.C., LIU, K.C., LIAO, I.C., 1987, The properties of tilapia sperm and its cryopreservation, *Journal of Fish Biology*, 31, 2, 107-118.
- CHAO, N.H. and LIAO, I.C., 2001, Cryopreservation of Finfish and shellfish gametes and embryos, *Aquaculture*, 197, 161-189.
- CHEBANOV, M. and BILLARD, R., 2001, The culture of sturgeon in Russia: production of juveniles for stocking and meat for human consumption, *Aquatic Living research*, 14, 375-381.
- CHEBANOV, M.S., GALICH, E.V., CHMYR, N.Y., 2004, *Sturgeon Breeding and rearing Handbook*, Ministry of Agriculture of Russian Federation, Moscow.
- CHEBANOV, M. and GALICH, E., 2009, Ultrasound diagnostics for sturgeon broodstock management, *Krasnodor*, 978-5-93491-259-9.
- CHEBANOV, M. and GALICH, E., 2011, Mersin Balığı Kuluçkahane El Kitabı, Birleşmiş Milletler Tarım ve Gıda Örgütü, FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper, No:558, Ankara (Basım Aşamasında).
- CHOWDHURY, I. and JOY, K.P., 2001, Seminal vesicle and testis secretions in *Heteropneustes fossilis* (Bloch): composition and effects on sperm motility and fertilization, *Aquaculture*, 193, 3-4, 355-371.

- CHRIST, S.A., TOTH, G.P., MCCARTHY, H.W., TORSELLA, J.A., SMITH, M.K., 1996, Monthly variation in sperm motility in common carp assessed using computer-assisted analysis (CASA), *Journal of Fish Biology*, 48, 1210-1222.
- CIERESZKO, A. and DABROWSKI, K., 1993, Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique, *Aquaculture*, 109, 367-373.
- CIERESZKO, A., LIU, LI., DABROWSKI, K., 1996, Effects of season and dietary ascorbic acid on some biochemical characteristics of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen, *Fish Physiology and Biochemistry*, 15, 1, 1-10.
- CIERESZKO, A., 2007, *Chemical Composition of Seminal Plasma and its Physiological Relationship with Sperm Motility, Fertilizing Capacity and Cryopreservation Success in Fish*, In: ALAVI, S.M.H., COSSON, J.J., COWARD, K., RAFIEE, G., (Eds.), *Fish Spermatology*, Chapter 6, Alpha Science International Ltd, Oxford, U.K., 215-240.
- CINCIK, M., 2003, Sperm Kriyoprezervasyonu, *Gülhane Tıp Dergisi*, 45, 100-106.
- COSSON, J., 1996, A moving image of Flagella: news and views on the mechanisms involved in axonemal beating, *Cell Biol.Int.* 20, 83-94.
- COSSON, J. and LINHART, O., 1996, Paddlefish, *Polyodon spathula*, spermatozoa: Effects of Potassium and pH on motility, *Folia Zool*, 45, 361-370.
- COSSON, J., LINHART, O., MIMS, S., SHELTON, W., RODINA, M., 2000, Analysis of motility parameters from Paddlefish (*Polyodonspathula*) and sholvenose sturgeon (*Scaphirhynchusplatorynchus*) spetmatozoa, *Journal of Fish Biology*, 56, 1348-1367.
- COSSON, J., 2004, The Ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa, *Aquaculture International*, 12, 69-85.
- COSSON, J.J., 2007a, *Methods to Analyse the Movements of Fish Spermatozoa and their Flagella* , In: ALAVI, S.M.H., COSSON, J.J., COWARD, K., RAFIEE, G., (Eds.), *Fish Spermatology*, Chapter 2, Alpha Science International Ltd, Oxford, U.K., 64-102.
- COSSON, J.J., 2007b, *The Motility apparatus of Fish spermatozoa*, In: ALAVI, S.M.H., COSSON, J.J., COWARD, K., RAFIEE, G., (ed.), *Fish Spermatology*, Chapter 9, Alpha Science International Ltd, Oxford, U.K., 281-317.
- ÇELİKKALE, M.S., 2002, *İçsu Balıkları ve Yetiştiriciliği*, Trabzon, 975-6983-25-6 (TKNO) 26-4 (I.C).
- ÇELİKKALE, M.S., TİMUR, M., MEMİŞ, D., ERCAN, E., 2002, Influence of Acclimation to the Cold Water on Growth Rate of Russian sturgeon juveniles

- (*Acipenser gueldenstaedtii*, Brandt & Ratzenburg, 1833), *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2, 137-140.
- ÇEVİK, M. and DAŞKIN, A., 2003, Alabalık (Gökkuşluğu Alabalığı) Spermasının Dondurulması ve Değerlendirilmesi, *Lalahan Hay.Araşt.Enst.Dergisi*, 43,2,23-34.
- DABROWSKI, A. and CIERESZKO, A., 2001, Ascorbic acid and reproduction in fish: endocrine regulation and gamete quality, *Aquaculture Research*, 32,8, 623-638.
- DEBUS, L., WINKLER, M., BILLARD, R., 2008, Ultrastructure of the oocyte envelopes of some Eurasian acipenserids, *Journal of Applied Ichthyology*, 24, 57-64.
- DEMİR, N., 2006, *İhtiyoloji*, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 975-591-909-0.
- DETTLAFF, T.A., GINSBURG, A.S. and SCHMALHAUSEN, O.I., 1993, *Sturgeon Fishes, Development Biology and Aquaculture*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 3-540-54744-4.
- DI LAURO, M.N., KRISE, W.F., HENDRIX, M.A., BAKER, S.E., 1994, Short-term cold storage of Atlantic sturgeon sperm, *Prog. Fish-cult*, 56, 143-144.
- DOROSHOV, S.I., MOBERG, G.P., EENENNAAM, J.P., 1997, Observations on the reproductive cycle of cultured white sturgeon (*Acipenser transmontanus*), *Environ.Biol.Fishes*, 48, 265-278.
- DREANNO, C., SUQUET, M., DESBRUYERES, E., COSSON, J., LE DELLIOU, H., BILLARD, R., 1998, Effect of urine on semen quality in Turbot, *Psetta maxima*, *Aquaculture*, 169, 247, 262.
- DZYUBA, B.B., KOPEIKA, E.F., CHEREPANOV, V.V., DROKIN, S.I., 1999, Sturgeon sperm quality after 6 years of cryopreservation, *Journal of Applied Ichthyology*, 15, 4-5, 312.
- DZYUBA, B., BORYSHPOLETS, S., RODINA, M., GELA, D., LINHART, O., 2010, Spontaneous activation of spermatozoa motility by routine freeze-thawing in different fish species, *Journal of Applied Ichthyology*, 26, 720-725.
- EDWARDS, D., DOROSHOV, 1989, Appraisal of the Sturgeon and Seatrout Fisheries and Proposals for a Rehabilitation Programme Technical Cooperation Programme. F.A.O., Rome.
- ELOFSSON, H., MCALISTER, B.G., KIME, D.E., 2003, Long lasting stickleback sperm: is ovarian fluid a key to success in fresh water?, *Journal of Fish Biology*, 63(1), 240-253.
- FABBROCINI, A., LAVADERA, L., RISPOLI, S., SANSONE, G., 2000, Cryopreservation of sea bream (*Sparus aurata*) spermatozoa, *Cryobiology*, 40, 46-53

- FAO, 2010, The State of World Fisheries and Aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, ISSN: 1020-5489.
- FAUVEL, C., SUQUET, M., COSSON, J., 2010, Evaluation of fish sperm quality, *Journal of Applied Ichthyology*, 26, 636-643.
- GALLIS, J.L., FEDRIGO, E., JATTEAU, P., BONPUNT, E., BILLARD, R., 1991, *Siberian Sturgeon, Acipenser baeri, Spermatozoa: Effects of Dilution, pH, Osmotic pressure, Sodium and Potassium Ions on Motility*, Acipenser, Central National, France, 143-151.
- GEFFEN, A.J. and EVANS, J.P., 2000, Sperm traits and fertilization success of male and sex-reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquaculture*, 182, 1-2, 61-72.
- GELDİAY, R., BALIK, S., 1988, Türkiye Tatlı Su Balıkları, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi Kitaplar Serisi No:97, Bornova, İzmir, 519.
- GINZBURG, J.L., 1972, *Fertilization of fishes and the problem of polyspermy*, Moskow, Academy of Science USSR, Translation NOAA and National Science Foundation, New-York, p:354.
- GISBERT, E. AND WILLIOT, P., 2002, Advances in the larval rearing of Siberian sturgeon, *Journal of Fish Biology*, 60, 1071-1092.
- GLOGOWSKI, J., KWASNIK, M., PIROS, B., DABROWSKI, K., GORYCZKO, K., DOBOSZ, S., KUZMINSKI, H., CIERESZKO, A., 2000, Characterization of rainbow trout milt collected with a catheter: semen parameters and cryopreservation success, *Aquaculture Research*, 31, 289-296.
- GLOGOWSKI, J., KOLMAN, R., SZCZEPKOWSKI, M., HORVATH, A., URBANYI, B., SIECZYNSKI, P., RZEMIENIECKI, A., DOMAGALA, J., DEMIANOWICZ, W., KOWALSKI, R., CIERESZKO, A., 2002, Fertilization rate of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*, Brandt) milt cryopreserved with methanol, *Aquaculture*, 211, 367-373.
- GRUNINA, A.S., RECOUBRATSKY, A.V., TSVETKOVA, L.I., BARMINTSEV, V.A., 2006, Investigation on dispermicandrogenesis in sturgeon fish. The first successful production of androgenetic sturgeon with cryopreserved sperm, *International Journal of Refrigeration*, 29, 379-386.
- GWO, J-C., 2000, Cryopreservation of Aquatic Invertebrate Semen: A Review, *Aquaculture Research*, 31, 259-271.
- HATEF, A., NIKSİRAT, H., AMİRİ, B.M., ALAVİ, S.M.H., KARAMİ, M., 2007, Sperm density, seminal plazma composition and their physiological relationship in the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*), *Aquatic Research*, 38, 1175-1181.
- HOAR, W.S., 1969, *Reproduction*, In: HOAR, W.S., RANDALL, D.J. (Eds.), Fish

physiology, vol III, Academic Press, London, 1–72.

- HOCHLEITHNER, M. and GESSNER, J., 2000, *The Sturgeon and Paddlefishes (Acipenseriformes) of the World: Biology and Aquaculture*, AquaTech Publications, Kitzbuhl, 165.
- HOLTZ, W., 1993, Cryopreservation of rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*) sperm: practical recommendations, *Aquaculture*, 110, 97-100.
- HORVATH, A., WILLIAM, R.W., URBANYI, B., WARE, K.M., DEAN, J.C., TIERSCH, R.T., 2005, The relationship of the cryoprotectants methanol and dimethyl sulfoxide and hyperosmotic extenders on sperm cryopreservation of two North-American sturgeon species, *Aquaculture*, 247, 243-251.
- HORVATH, A., URBANYI, B., MIMS, S.D., WILLIAM, B.B., GOMELSKY, B., TIERSCH, T.R., 2006, Improved Cryopreservation of Sperm of Paddlefish (*Polyodon spathula*), *Journal of the World Aquaculture Society*, 37, 4, 356-362.
- HORVATH, A., WAYMAN, W.R., DEAN, J.C., URBANYI, B., TIERSCH, T.R., MIMS, S.D., JHONSON, D., JENKINS, J.A., 2008, Viability and fertilizing capacity of cryopreserved sperm from three North American acipenseriform species: a retrospective study, *Journal of Applied Ichthyology*, 24, 443-449.
- HORVATH, A., URBANYI, B., MIMS, S.D., 2009, *Cryopreservation of sperm from species of the order Acipenseriformes*, In: CABRITA, E., ROBLES, V., HERRAEZ, P. (ed), *Methods in Reproductive Aquaculture, Marine and Freshwater species*, Section V, CRC Press, Taylor & Francis Group, USA, pp. 409-415.
- HURVITZ, A., JACKSON, K., DEGANI, G., SIVAN, B.L., 2007, Use of endoscopy for gender and ovarian stage determinations in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) grown in aquaculture, *Aquaculture*, 270, 158-166.
- IMANPOOR, M.R., KORDJAZI, M., FENDERESKI, F., 2011, Seminal plasma and coelomic fluid compositions in Persian sturgeon (*Acipenser persicus* Borodin 1897), *Journal of Applied Ichthyology*, 27, 706-708.
- INABA, K., 2003, Molecular architecture of sperm flagella: molecules for motility and signaling, *Zool Sci*, 20, 1043-1056.
- INGERMANN, R.L., HOLCOMB, M., ROBINSON, M.L., CLOUD, J.G., 2002, Carbondioxide and pH affect sperm motility of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*), *Journal of Experimental Biology*, 205, 2885-2890.
- İLİRİ, K.İ., AK, K., PAPUÇÇUOĞLU, S., BİRLER, S., 2000, *Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama*, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını, İstanbul, 112.

- JACKSON, K., HURVITZ, A., DIN, S.Y., GOLDBERG, D., PEARLSON, O., DEGANI, G., SIVAN, B.L., 2006, Anatomical, hormonal and histological descriptions of captive Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) with intersex gonads, *General and Comparative Endocrinology*, 148, 359-367.
- JAHNICHEN, H., WARNECKE, D., TROLSCH, E., KOHLMANN, K., BERGLER, H., PLUTA, H.J., 1999, Motility and fertilizing capability of cryopreserved *Acipenser ruthenus* L., *Journal of Applied Ichthyology*, 15, 204-206.
- JAMIESON, B.G.M., 1991, *Fish evolution and systematics: Evindence from Spermatozoa*, Cambridge University Press, Cambridge, G.B, 0521413044.
- KARAYÜCEL, İ., 1995, *Prefreezing Toxicity of Cryoprotectants to Oyster (Crassostrea gigas Thunberg) Embryo*, Thesis (Master), University of Stirling Scotland.
- KIME, D.E., EBRAHIMI, M., NYSTEN, K., ROELANTS, I., RURANGWA, E., MOORE, H.D.M., 1996, Use of computer assisted sperm analysis (CASA) for monitoring the effect of pollution on sperm quality of fish application to the effects of heavy metals, *Aquatic Toxicology*, 36, 223-237.
- KOPEIKA, E.F., WILLIOT, P., GONCHAROV, B.F., 2000, Cryopreservation of Atlantic sturgeon *Acipenser sturio* L. 1758 sperm: First result and associated problem, *Bol. Inst. Esp. Oceanogr*, 16, 1-4, 167-173.
- KOPEIKA, E.F., KOPEIKA, J., ZHANG, T., 2007, *Cryopreservation of Fish Sperm*, In: DAY, G.J., STACEY, G.N. (Eds.), *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*, Chapter 14, Humana Press, Totowa-New Jersey, 203-225.
- KOPEIKA, E.F. and KOPEIKA, J., 2007, Variability of Sperm Quality after Cryopreservation in Fish, In: ALAVI, S.M.H., COSSON, J.J., COWARD, K., RAFIEE, G., (ed.), *Fish Spermatology*, Chapter 12, Alpha Science International Ltd, Oxford, U.K, 347-396.
- KRASZNAI, Z., MORISAWA, M., MORISAWA, S., KRASZNAI, Z.T., TRON, L., GASPAR, R., 2003, Role of ion channels and membrane potential in the initiation of carp sperm motility, *Aquatic Living Research*, 16, 445-449.
- KYNARD, B. and KIEFFER., M., 2002, Use of a borescope to determine the sex and egg maturity stage of sturgeons and the effect of borescope use on reproductive structures, *Journal of Applied Ichthyology*, 18, 505-508.
- LAHNSTEINER, F., WEISMANN, T., PATZNER, R.A., 1995, A uniform method for cryopreservation of semen of the salmonid fishes *Oncorhynchus mykiss* (Waibaum), *Salmo trutta* f. *fario* L., *Salmo trutta* f. *lacustris* L., *Coregonus* sp, *Aquaculture Research*, 26, 801-807.
- LAHNSTEINER, F., BERGER, F., WEISMANN, T., PATZNER, R., 1996a, The influence of various cryoprotectants on semen quality of the rainbow trout

- (*Oncorhynchus mykiss*) before and after cryopreservation, *Journal of Applied Ichthyology*, 12, 99-106.
- LAHNSTETNER, F., PATZNER, R.A., WEISMANN, T., 1996b, Semen cryopreservation of salmonid fishes: influence of handling parameters on the postthaw fertilization rate, *Aquaculture Research*, 27, 659-671.
- LAHNSTEINER, F., BERGER, B., WEISMANN, T., PATZNER, R.A., 1997, Sperm motility and seminal composition in the turbot, *Lota lota*, *Journal of Applied Ichthyology*, 13, 113-119.
- LAHNSTEINER, F., BERGER, B., WEISMANN, T., PATZNER, R.A., 1998, Determination of semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters and spermatozoal metabolism, *Aquaculture*, 163, 163-181.
- LAHNSTEINER, F., MANSOUR, N., WEISMANN, T., 2002, A new technique for insemination of large egg batches with cryopreserved semen in the rainbow trout, *Aquaculture*, 209, 359 – 367.
- LAHNSTEINER, F., 2003, Morphology, fine structure, biochemistry and function of spermatid duct in marine fish, *Tissue and Cell*, 35, 363-373.
- LAHNSTEINER, F., BERGER, B., HORVATH, A., URBANYI, B., 2004, Studies on the semen biology and sperm cryopreservation in the sterlet, *Acipenser ruthenus* L., *Aquaculture Research*, 35(6), 519-528.
- LAHNSTEINER, F. and PATZNER, R.A., 2007, *Sperm Morphology and Ultrastructure in Fish*, In: ALAVI, S.M.H., COSSON, J.J., COWARD, K., RAFIEE, G., (ed.), *Fish Spermatology*, Chapter 1, Alpha Science International Ltd, Oxford, U.K., 1-61.
- LEUNG, L.K.P., 1991, *Principles of Biological Cryopreservation*, Fish evolution and systematics: Evidence from Spermatozoa, Cambridge University Press, Cambridge, G.B., 0521413044, 231-244.
- LI, P., HULAK, M., LINHART, O., 2009, Sperm proteins in teleostean and chondrosteian (sturgeon) fishes, *Fish Physiol Biochem*, 35, 567–581.
- LINHART, O., MIMS, S.D., SHELTON, W.L., 1995, Motility of Spermatozoa from Shovel-nose sturgeon (*Scaphirhynchus platyrhynchus*) and Paddlefish (*Polyodon spathula*), *Journal of Fish Biology*, 47, 902-909.
- LINHART, O., MIMS, S.D., GOMELSKY, B., HIOTT, A.E., SHELTON, W.L., COSSON, J., RODINA, M., GELA, D., 2000, Spermiogenesis of paddlefish (*Polyodon spathula*) stimulated with injection of LHRH analogue and carp pituitary extract, *Aquat. Living Resour*, 13, 1–6.

- LINHART, O., MIMS, S.D., SHELTON, W.L., RODINA, M., 2002, Effects of ions on the motility of fresh and demembrated paddlefish, *Polyodon spathula*, *Reproduction*, 124, 713-719.
- LINHART, O., MIMS, S.D., GOMELSKY, G., HIOTT, A.E., SHELTON, L.W., COSSON, J., RODINA, M., GELA, D., BASTL, J., 2003, Ionic composition and osmolality of Paddlefish (*Polyodon spathula*, Acipenseriformes) seminal fluid, *Aquaculture International*, 11, 357-368.
- LINHART, O., MIMS, S.D., GOMELSKY, B., CVETKOVA, L.I., COSSON, J., RODINA, M., HORVATH, A., URBANYI, B., 2006, Effects of cryoprotectants and male on motility parameters and fertilization rate in paddlefish (*Polyodon spathula*) frozen-thawed spermatozoa, *Journal of Applied Ichthyology*, 22, 389-394.
- LINHART, O., ROSENTHAL, H., LIU, LING., 2009, Cryopreservation of Sturgeon Sperm, *6th International Symposium on sturgeon*, 25-31 Ekim 2009, Wuhan, Çin Halk Cumhuriyeti.
- LIU, L., 1997, Summary of studies on sperm and embryo cryopreservation in fish, *Freshwater fisheries*, 3, 13-17.
- LIU, L., WEI, Q., GUA, F., ZHANG, J., ZHANG, T., 2006, Cryopreservation of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) sperm, *Journal of Applied Ichthyology*, 1, 384-388.
- MALEKZADEH VIAYEH, R., WEBB, M.A.H., HALLAJIAN, A., KAZEMI, R., PAHLAVAN YALI, M., 2006, Biochemical and morphometric parameters as indicators of sex and gonadal stages in maturing Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, *Journal of Applied Ichthyology*, 22(1), 364-369.
- MANANOS, E., DUNCAN, N., MYLONAS, C., 2009, *Reproduction and Control of ovulation, spermiation and Spawning in cultured Fish*, In: CABRITA, E., ROBLES, V., HERRAEZ, P. (ed.), *Methods in Reproductive Aquaculture*, Chapter 1, CRC Press, Taylor & Francis Group, USA, pp. 3-80.
- MARTINEZ, P.S., CEREZALES, P.S., ROMANO, G.F., BLANCO, G., SANCHEZ, J.A., HERRAEZ, M.P., 2009, Cryobanking as tool for conservation of biodiversity: effect of brown trout sperm cryopreservation on the male genetic potential, *Theriogenology*, 71, 594-604.
- MEMİŞ, D., ÇELİKKALE, M.S., ERCAN, E., 2007, Effects of different diets on growth performance and body composition of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*, Brandt & Ratzenburg 1833), *Journal of Applied Ichthyology*, 22, 287-290.
- MEMİŞ, D., ERCAN, E., YAMANER, G., 2011, The effects of shaded pond on growth performance of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*), *Journal of Applied Ichthyology*, 27, 2, 571-575.

- MIMS, S.D., 1991, Evaluation of activator solutions, motility duration and short-term storage of paddlefish spermatozoa, *Journal World Aquaculture Society*, 22, 224-229.
- MIMS, S.D., LAZUR, A., SHELTON, W.L., GOMELSKY, B., CHAPMAN, F., 2002, Species Profile Production of sturgeon, Southern regional Aquaculture center publication, 7200, Stonville, 8.
- MIRZOYAN, A.V., NEBESIKHINA, N.A., VOYNOVA, N.V., CHISTYAKOV, V.A., 2006, Preliminary results on ascorbic acid lysine suppression of clastogenic effect of deep-frozen sperm of the Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*), *International Journal of Refrigeration*, 29, 374-378.
- MOHLER, W.R., 2003, Culture Manual for the Atlantic sturgeon (*A. oxyrinchus oxyrinchus*), U.S. Fish & Wildlife Service Publication, Hadley, Massachusetts, 1-66.
- MOUNIB, M.S., 1978, Cryogenic preservation of fish and mammalian spermatozoa, *J. Reprod. Fert.*, 53, 13-18.
- MORISAWA, M. and SUZUKI, K., 1980, Osmolality and Potassium ions: Their roles in initiation of sperm motility in Teleost, *Science*, 210, 1145-1147.
- MORISAWA, M., SUZUKI, K., MORISAWA, S., 1983, Effects of Potassium and Osmolality on Spermatozoan Motility of Salmonid Fishes, *J. exp. Biol.* 107, 105-113.
- MORISAWA, S. and MORISAWA, M., 1986, Acquisition Of Potential For Sperm Motility In Rainbow Trout And Chum Salmon, *J. exp. Biol.* 126, 89-96.
- NATHANAILIDES, C., TSOUMANI, M., PAPAZOGLIOY, A., PASCHOS, I., 2002, Hatching time and post-hatch growth in Russian sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii*, *Journal of Applied Ichthyology*, 18, 651-654.
- NOVEIRI, S.B., ALIPOUR, A. and POURKAZEMI, M., 2006, Sperm morphometry, density and spermatocrit study in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*), *Journal of Applied Ichthyology*, 22, 380-383.
- PALASZ, A.T. and MAPLETOFT, R.J., 1996, Cryopreservation of Mammalian embryos and oocytes: Recent advances, *Biotechnology Advances*, 14, 2, 127-149.
- PARK, C. and CHAPMAN, F., 2005, An Extender Solution for the Short-Term Storage of Sturgeon Semen, *North American Journal of Aquaculture*, 67, 52-57.
- PIROS, B., GLOGOWSKI, J., KOLMAN, R., RZEMIENIECKI, A., DOMAGALA, J., HORVATH, A., URBANYI, B., CIERESZKO, A., 2002, Biochemical characterization of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) and sterlet (*Acipenser ruthenus*) milt plasma and spermatozoa, *Fish Physiol Biochem*, 26, 3, 289.

- PODUSHKA, S.B., 1993a, The variability of the number of micropyles in the eggs of Volga Stellate Sturgeon *Acipenser stellatus*, *Journal of Applied Ichtiology*, 33, 152-155.
- PODUSHKA, S.B., 1993b, Variability in the number of micropyles in the eggs of *Acipenser persicus* in the Volga River, *Journal of Applied Ichtiology*, 33, 145-146.
- POLYANINOVA, A., KASHENSTEVA, L.N., MALINOVSKAYA, L.V., MOLODTSEVA, A.I., SMIRNOVA, L.V., 1999, Feeding conditions for sturgeons (Acipenseridae) in the Caspian Sea, *Journal of Applied Ichtiology*, 15, 293-294.
- POURKAZEMI, M., SIKIBINSKY, D.O.F., BEARDMORE, J.A., 1999, Application of mtDNA d-loop Region for the Study of Russian Sturgeon population Structure from Iranian Coastline of Caspian Sea, *Journal of Applied Ichtiology*, 15, 23-28.
- PSENICKA, M., DIETRICH, G., WOJTCZAK, M., NYNCA, J., RODINA, M., LINHART, O., COSSON, J., CIERESZKO, A., 2008a, Acrosom staining and motility characteristics of sterlet spermatozoa after cryopreservation with use of methanol and DMSO, *Cryobiology*, 56, 251-253.
- PSENICKA, M., ALAVI, S.M.H., RODINA, M., CICOVA, Z., GELA, D., COSSON, J., NEBESAROVA, J., LINHART, O., 2008b, Morphology, chemical contents and physiology of chondrosteian fish sperm: a comparative study between Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) and sterlet (*Acipenser ruthenus*), *Journal of Applied Ichthyology*, 24, 371-377.
- PSENICKA, M., VANCOVA, M., KOUBEK, P., TESITEL, J., LINHART, O., 2009, Fine structure and morphology of sterlet (*Acipenser ruthenus* L. 1758) spermatozoa and acrosin localization, *Animal Reproduction Science*, 111, 1, 3-16.
- RANA, K., 1995a, *Preservation of Gametes*. In: ROBERTS, R.J, BROMAGE, N.R., (Eds.), *Brood stock management and egg and larval quality*, Chapter 3, Blackwell Science, Cambridge University Press Cambridge, 53-76.
- RANA, K., 1995b, *Cryopreservation of Fish Spermatozoa*, In: Day, D.G., MCLELLAN, M.R. (ed.), *Cryopreservation and Freeze Drying Protocols*, The Humana Press Inc. New Jersey, 151-165.
- RICHARDSON, G.F., MILLER, T.L., MCNIVEN, M.A., 2000, Cryopreservation of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), semen in various extenders and in three sizes of straw, *Aquaculture Research*, 31,3, 307-315.
- RURANGWA, E., KIME, D.E., OLLEVIER, F., NASH, J.P., 2004, Measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish, *Aquaculture*, 234, 1-28.

- RZEMIENIECKI, A., DOMAGALA, J., GLOGOWSKI, J., CIERESZKO, A., TRZEBIATOWSKI, R., KOURIL, J., HAMACKOVA, J., BABIAK, I., 2004, Induced spermiation in 3-year-old starlet, *Acipenser ruthenus* L., *Aquaculture Research*, 35, 144-151.
- SAROSIEK, B., CIERESZKO, A., RZEMIENIECKI, A., DOMAGATA, J., GLOGOWSKI, J., 2004, The influence of semen cryopreservation on the release of some enzymes Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) and starlet (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa, *Archives of Polish Fisheries*, 12,1, 13-21.
- SAROSIEK, B., WYSOCKA, J., WYSOCKI, P., KOWALSKI, R., GLOGOWSKI, J., 2006, Characteristics of acid phosphatase from Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) spermatozoa, *Journal of Applied Ichthyology*, 22, 375-379.
- SARVI, K., NIKSIRAT, H., AMIRI, B.M., MIRTORABI, S.M., RAFIEE, G.R., BAKHTIYARI, M., 2006, Cryopreservation of semen from the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*), *Aquaculture*, 256, 564 – 569.
- SCHULZ, R.W. and MIURA, T., 2002, Spermatogenesis and its endocrine regulation, *Fish Physiol Biochem*, 26, 43–56.
- SECOR, D.H., AREFJEV, V., NIKOLAEV, A., SHAROV, A., 2000, Restoration of sturgeons: lessons from the Caspian Sea sturgeon ranching programme, *Fish and Fisheries I*, 215-230.
- SEMENKOVA, T.B., CANARIO, A.V.M., BAYUNOVA, L.V., COUTO, E., KOLMAKOV, N.N., BARANNIKOVA, I.A., 2006, Sex steroids and oocyte maturation in the sterlet (*Acipenser ruthenus* L.), *Journal of Applied Ichthyology*, 22, 340-346.
- SLASTENENKO, E., 1956, Karadeniz Havzası Balıkları, Et ve Balık Kurumu Umum Müdürlüğü Yayınları, İstanbul Matbası, 1-710.
- SILVEIRA, A.N., FOREST, F., TABATA, Y.A., RIGOLINO, M.G., SILVERIRA, R.V., 2002, Cryopreservation of Rainbow Trout Semen: Diluent, straw and vapor column, *Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo*, 28(2), 135 – 139.
- STOSS, J., 1983, *Fish gamete preservation and spermatozoan physiology*, Fish physiology IX B, New york Academic Press, United States of America, 305-350.
- STOSS, J. and HOLTZ, W., 1983, Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm: IV. The effect of DMSO concentration and equilibration time on sperm survival, sucrose and KCl as extender components and the osmolality of the thawing solution, *Aquaculture*, 32, 3-4, 321-330.
- SUQUET, M., BILLARD, R., COSSON, J., DORANGE, G., CHAUVAUD, L., MUGNIER, C., FAUVEL, C., 1994, Sperm features in turbot (*Scophthalmus maximus*): a comparison with other freshwater and marine fish species, *Aquatic Living Ressources*, 7, 283-294.

- SUQUET, M., DREANNO, C., FAUVEL, C., COSSON, J., 2000, Cryopreservation of sperm in marine fish, *Aquaculture Research*, 31, 231-243.
- TAN-FERMIN, J.D., MIURA, T., ADACHI, S., YAMAUCHI, K., 1999, Seminal plasma composition, sperm motility, and milt dilution in the Asian catfish *Clarias macrocephalus* (Gunther), *Aquaculture*, 171, 3-4, 323-338.
- TEKİN, N., SEÇER, S., AKÇAY, E., BOZKURT, Y., 2003, Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen, *The Israeli Journal of Aquaculture Bamidgeh*, 55(3), 197-201.
- TİMUR, M., 2006, *Balık Fizyolojisi*, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 975-591-943-0.
- TOTH, G.P., CHRIST, S.A., MCCARTHY, H.W., TORSELLA, J.A., SMITH, M.K., 1995, Computer-assisted motion analysis of sperm from the common carp, *Journal of Fish Biology*, 47, 986-1003.
- TOTH, G.P., CIERESZKO, A., CHRIST, S.A., DOBROWSKI, K., 1997, Objective analysis of sperm motility in the lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*): activation and inhibition conditions, *Aquaculture*, 154, 337-348.
- TSVETKOVA, L.I., COSSON, J., LINHART, O., BILLARD, R., 1996, Motility and fertilizing capacity of fresh and frozen-thawed spermatozoa in sturgeons *Acipenser baeri* and *Acipenser ruthenus*, *Journal of Applied Ichthyology*, 12, 107-112.
- URBANYI, B., HORVATH, A., KOVACS, B., 2004, Successful hybridization of *Acipenser* species using cryopreserved sperm, *Aquaculture International*, 12, 47-56.
- VAN EENENNAAM, A. L., VAN EENENNAAM, J. P., MEDRANO, J. F., DOROSHOV, S.I., 1996, Rapid verification of meiotic gynogenesis and polyploidy in white sturgeon (*Acipenser transmontanus* Richardson), *Aquaculture*, 147, 177-189.
- VECSEI, P., 2001, Threatened fishes of the world: *Acipenser gueldenstaedtii*, Brand & Ratzenburg, 1833 (Acipenseridae), *Environmental Biology of Fishes*, 60, 362.
- WILLIOT, P., KOPEIKA, E.F., GONCHAROV, B.F., 2000, Influence of testis state, temperature and delay in semen collection on spermatozoa motility in the cultured Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt), *Aquaculture*, 189, 53-61.
- WIRGIN, I.I., STABILE, J.E., WALDMAN, J.R., 1997, Molecular analysis in the conservation of sturgeons and paddlefish, *Environmental Biology of Fishes*, 48, 385-398.
- WOODS, E.J., BENSON, J.D., AGCA, Y., CRITSER, J.K., 2004, Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues, *Cryobiology*, 48, 146-156.

- WROBEL, K.H. and JOUMA, S., 2004, Morphology, development and comparative anatomical evaluation of the testicular excretory pathway in Acipenser, *Ann Anat*, 186, 99-113.
- WUERTZ, S., GRÖPER, B., GESSNER, J., KRUGER, T., LUCKAS, B., KRUGER, ANGELA., 2009, Identification of caviar from increasing global aquaculture production-Dietary capric acid as a labeling tool for CITES implementation in caviar trade, *Aquaculture*, 298, 1-2, 51-56.
- ZAR, J. H., 1996, Biostatistical analysis, 3rd Edition, Prentice-Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
- ZHANG, T. and LUBZENS, E., 2009, Cryopreservation of fish oocytes. In: CABRITA, T., ROBLES, V., HERRÁEZ, P. (Eds.), *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species*. CRC Press, Boca Ration etc, pp. 251 –263.
- <http://www.iucnredlist.org/>, 2001 IUCN Red List Categories and Criteria version 3.1., 2011.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Tekirdağ'da doğdum. İlk ve Orta öğrenimimi Tekirdağ'da tamamladım. 1998 yılında İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi'ni kazandım. 2002 yılında lisans eğitimimi tamamlayarak aynı yıl İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Yetiştiricilik Anabilim Dalı Yetiştiricilik Programında Yüksek Lisans öğrenimime başladım. 2004 yılında İ.Ü. Su Ürünleri Fakültesi Sapanca Su Ürünleri Meslek Yüksek Okulun'da Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladım. 2006 yılında Yüksek Lisansımı tamamladım ve aynı yıl İ.Ü.Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Yetiştiricilik programında doktora öğrenimine başladım. 2008 yılında İ.Ü. Su Ürünleri Fakültesi Sapanca Su Ürünleri Meslek Yüksek okulunun kapanması sebebi ile Su ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Anabilim Dalında görevlendirildim. 2011 yılında İstanbul Üniversitesi Uluslararası Akademik İlişkiler Kurulu AB Eğitim Programları, Erasmus öğrenci değişimi programı kapsamında 15.02.2011-15.05.2011 tarihleri arasında, University of South Bohemia, Faculty of Fisheries and Protections of Water, Çek Cumhuriyeti'nde 3 ay süre ile doktora konuyla ilgili olarak eğitim gördüm.Yabancı dilim İngilizcedir.