

B.E. İNANAN

BIYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

MUĞLA 2015

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BIYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOĞAL ANTİOKSİDANLARIN CİNSİYETİ
DEĞİŞTİRİLMİŞ DIŞI GÖKKUŞAĞI
ALABALIKLARINDA (*Oncorhynchus mykiss*)
SPERMATOLOJİK PARAMETRELER ÜZERİNE
ETKİLERİ

DOKTORA TEZİ

BURAK EVREN İNANAN

EYLÜL 2015

MUĞLA

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOĞAL ANTİOKSİDANLARIN CİNSİYETİ
DEĞİŞTİRİLMİŞ DIŞI GÖKKUŞAĞI
ALABALIKLARINDA (*Oncorhynchus mykiss*)
SPERMATOLOJİK PARAMETRELER ÜZERİNE
ETKİLERİ

DOKTORA TEZİ

BURAK EVREN İNANAN

EYLÜL 2015

MUĞLA

MUGLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

BURAK EVREN İNANAN tarafından hazırlanan **DOĞAL ANTİOKSİDANLARIN CİNSİYETİ DEĞİŞTİRİLMİŞ DIŞI GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDA (*Oncorhynchus mykiss*) SPERMATOLOJİK PARAMETRELER ÜZERİNE ETKİLERİ** başlıklı tezinin, 15/09/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda doktora derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JURİSİ

Prof. Dr. Murat BARLAS (**Juri Başkanı**)

Biyoloji Anabilim Dalı, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Prof. Dr. Fevzi YILMAZ (**Danışman**)

Biyoloji Anabilim Dalı, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Prof. Dr. Kenan GÜLLÜ (**Üye**)

Su Ürünleri Mühendisliği Ana Bilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Prof. Dr. İbrahim ÖRÜN (**Üye**)

Biyoloji Ana Bilim Dalı, Aksaray Üniversitesi, Aksaray

Doç. Dr. Cemil Kaya GÖKÇEK (**Üye**)

Su Ürünleri Yetiştiriciliği Ana Bilim Dalı,
İskenderun Teknik Üniversitesi, Hatay

İmza:

İmza:

İmza:

İmza:

İmza:

ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

Prof. Dr. Hasan Sungur CİVELEK

Biyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Prof. Dr. Fevzi YILMAZ

Danışman, Biyoloji Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Doç. Dr. Fatih ÖĞRETMEN

İkinci danışman, Biyoloji Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:

İmza:

İmza:

Savunma Tarihi: 15/09/2015

ÖZET
DOĞAL ANTİOKSİDANLARIN CİNSİYETİ DEĞİŞTİRİLMİŞ DIŞI
GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDA (*Oncorhynchus mykiss*)
SPERMATOLOJİK PARAMETRELER ÜZERİNE ETKİLERİ

Burak Evren İNANAN

Doktora Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Fevzi YILMAZ

İkinci (Ortak) Danışman: Doç. Dr. Fatih ÖĞRETMEN

Eylül 2015, 172 sayfa

Tüm dünya ülkelerinde ve ülkemizde en çok kültürü yapılan ve avlanan türlerden biri olan gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792), önemli bir besin ve ekonomik kaynak teşkil etmektedir. Gökkuşağı alabalığı üretiminde popülasyonun dışı bireylerden oluşması özellikle dişiler daha hızlı geliştiğinden son derece önemlidir ve bu konu balık üreme biyolojisi araştırmalarında geniş yer tutmaktadır. Dişi bireyler, erkeklerden bir yıl sonra cinsel olgunluğa gelirler ve cinsel olgunlaşmadan önce satış boyuna ulaşırlar. Erkekler bu süreçte gonad oluşturmak için enerji harcarken dişiler aynı enerjiyi büyümede kullanırlar. Bu sebeple tamamı dişi olan bireylerden oluşmuş popülasyonların üretimi ticari gökkuşağı alabalığı kültüründe önemli ekonomik faydalar sağlamaktadır. Cinsiyeti değiştirilmiş (Erkekleştirilmiş) dişi (Fonksiyonel Erkek) gökkuşağı alabalıklarının anaç olarak kullanılması, tümü dişi olan popülasyonların elde edilmesine imkân sağlamaktadır. Bu bireyler, en yaygın olarak yumurtadan çıktıktan sonra yeme ilave edilen hormon uygulaması ile elde edilirler. Bunlar erkek fenotipine sahiplerdir ancak dişi genotiplerini (XX) korurlar, böylece bunların işlevsel testislerinde üretilen tüm spermatozoa X kromozomu taşır ve dolayısıyla döllenmeleri sonucu elde edilen yavrular tamamı dişi bir popülasyon oluşturur. Cinsiyeti değiştirilmiş (CD) dişi gökkuşağı alabalıkları, normal erkekler ile benzer dış morfolojiye sahiptir, ancak sperm kanalları yoktur, bu durum dolayısıyla bu bireylerden sağım yoluyla balık spermi alınamaması, gonadın diseksiyon ile alınarak spermin elde edilebilmesi manasına da gelmektedir. Ancak testiküler sperm genellikle, dölleme yeteneği açısından kısıtlı motilite özelliklerine sahiptir. Bu motilite özellikleri, spermin bir suni seminal plazma ile sulandırılarak bir olgunlaştırma süreci sonucunda daha iyi hale getirilmesi, kısa ve uzun süre muhafaza edilebilmeleri son derece önemli bir konudur.

Bu tez çalışması, testiküler semende seminal plazma parametrelerini tanımlayıp CD dişi bireylerden elde edilen sperm hücrelerinin motilite karakteristiklerini

belirleyerek 25, 50 ve 100 mg/L derişimlerdeki doğal antioksidanlar (kuersetin, kurkumin, rosmarinik asit, rutin, resveratrol ve salisilik asit) ilave edilmiş suni seminal plazma kullanılarak gerçekleştirilen uzun ve kısa süreli muhafazalara ait motilite verilerini sunmaktadır. Ayrıca, muhafaza çalışmalarının motilite karakteristiklerine etkileri, akuakültür pratiğindeki en önemli parametrelerinden yumurtayı dölleme ve yumurtadan çıkış oranları ile desteklenmektedir.

Tez çalışması, 2012-2013 (Aralık, Ocak ve Şubat), 2013-2014 (Aralık, Ocak ve Şubat) ve 2014-2015 (Aralık, Ocak ve Şubat) üreme sezonları boyunca, Fethiye-Muğla'da bulunan ticari bir alabalık üretim işletmesinde gerçekleştirilmiştir. İlk iki üreme sezonunda, seminal plazma biyokimyasal analizleri ve kısa süreli muhafaza çalışmaları gerçekleştirilmiş iken 3. üreme sezonunda sperm hücreleri DNA hasarları ve uzun süreli muhafaza çalışmaları tamamlanmıştır. İlk iki sezonda, toplamda 102 normal (N) erkek bireyin ve 88 CD dişi bireyin semen özellikleri incelenmiştir. İlk sezonda 2-3 yaşında CD bireyler, ikinci sezonda 3-4 yaşındaki CD bireyler, her iki sezonda da 2-3 yaşındaki N erkek bireyler değerlendirilmiştir.

Tez çalışması sonuçlarına göre, CD dişi bireylerden elde edilen testiküler semen, N erkek semenine kıyasla daha yoğun sperm hücrelerine, seminal plazması daha düşük pH seviyesine, daha yüksek ozmolarite ve protein değerlerine, toplam antioksidan kapasitesine sahip olması ile nitelendirilebilmektedir. CD dişi testiküler seminal plazması, daha yüksek Na^+ , K^+ ve Cl^- derişimlerine sahip iken, Ca^{2+} derişimleri açısından N erkek seminal plazması ile farklılık göstermemektedir ($P<0,05$). 2-3 yaşındaki CD dişi bireylerin Mg^{2+} derişimleri, N erkeklerden daha yüksek iken 3-4 yaşındakilerde istatistiksel olarak farklı değildir. Ayrıca, CD dişi testiküler seminal plazması daha yüksek ortalama lipit peroksidasyonu ve katalaz aktivite değerlerine sahiptir.

Tez çalışmasında, hem kısa hem de uzun süreli muhafazada antioksidan maddelerin kullanılmasının, sperm motilite karakteristikleri ve yumurtaları dölleme oranları üzerine pozitif etkilerini saptamıştır. Kısa süreli muhafazada kuersetin ve kurkumin, uzun süreli muhafazada rosmarinik asit ve salisilik asit motilite karakteristiklerinin korunmasında daha etkili bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Cinsiyeti Değiştirilmiş Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), Sperm Motilite Karakteristikleri, Kısa ve Uzun Süreli Muhafaza, Doğal Antioksidanlar, DNA Hasarı

ABSTRACT
**THE EFFECT OF NATURAL ANTIOXIDANTS ON SPERMATOLOGICAL
PARAMETERS OF SEX-REVERSED FEMALE RAINBOW TROUT**
(*Oncorhynchus mykiss*)

Burak Evren İNANAN

Doctor of Philosophy (Ph.D.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Fevzi YILMAZ

Co-supervisor: Assoc. Prof. Dr. Fatih ÖĞRETMEN

September 2015, 172 pages

Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) is one of the most common wild-caught and cultured fish species as providing nutritional and economic sources both worldwide and Turkey. Production of mono-sex female population of rainbow trout is very important, and takes an important place on fish reproductive biology studies. Females reach their marketable size before maturation, becoming sexually mature 1 year later than males. For the very reason, the reproduction all female populations in the aquaculture of rainbow trout has important economic benefits compared to all male and mix populations. The production of sex reversed (masculinized) females (functional males) and then using of them as breeders allow spawning all female populations. These breeders commonly are obtained with adding hormones to their diets during their larval stages. When they grow up, they become phenotypically males but genotypically females (XX), and in this way spermatozoa produced in their functional testis carry X chromosome. Therefore, all fry which develop from zygote fertilized by these spermatozoa would be female. Sex reversed (SR) females are looked like males morphologically but lack of sperm ducts. Thus, abdominal stripping is useless and the breeders should be sacrificed to obtain sperm samples. Testicular spermatozoa have limited motility characteristics for fertilization. To improve the motility of testicular spermatozoa, the samples should be diluted with artificial seminal plasma and incubated for maturation, thus samples could be used for short and long term preservations.

In this study, the parameters of testicular seminal plasma have been determined, the motility characteristics of their spermatozoa are evaluated, the data of short and long term preservations using medium with 25, 50 ve 100 mg/L of natural antioxidants (quercetin, curcumin, rosmarinic asid, rutin, resveratrol, and salicylic acid) are presented. Besides the effects of the preservation techniques on motility characteristics, fertilization and hatching rates as the most important parameters are represented.

The study carried out during 2012-2013 (December, January and February), 2013-2014 (December, January and February), and 2014-2015 (December, January and February) spawning seasons at the commercial fish farm in Muğla-Turkey. The biochemical analysis of seminal plasma and the application of short term preservation are conducted during the first two spawning seasons, while long term preservation and DNA damages are determined during the third spawning season. The sum of 102 normal (N) males and 88 SR females are examined during the first two spawning seasons. 2-3 year old SR females in the first spawning season, 3-4 year old SR females in the first spawning season, and 2-3 year old N males in both spawning seasons are evaluated.

According to the results of the study, testicular seminal plasma of SR females has higher spermatozoa concentration than N males', and also testicular seminal plasma has been characterized lower pH level, higher osmolality, protein and total antioxidant capacity compared to the seminal plasma of N males. Testicular seminal plasma of SR females has higher concentrations of Na^+ , K^+ and Cl^- while there was no significant differences between the seminal plasma of SR females and N males in terms of Ca^{2+} concentration ($P<0.05$). The seminal plasma of 2-3 year old females has higher Mg^{2+} concentrations than seminal plasma of N males', Mg^{2+} concentrations of 3-4 year old females are not different from N males'. the seminal plasma of SR females has more lipid peroxidation and catalase activity than N males'.

The thesis study reveals that the antioxidants has positive effects on sperm motility characteristics and fertilization rates during both short and long term preservations. Quercetin and curcumin for short term preservation, rosmarinic acid and salicylic acid for long term preservation have found as more effective than the other antioxidants used in the study.

Keywords: Sex-Reversed Females Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), Sperm Motility Characteristics, Short and Long-term Preservation, Natural Antioxidants, DNA Damage

ÖNSÖZ

Başta sayın tez danışmanım Prof. Dr. Fevzi YILMAZ'a çalışmalarım sırasında göstermiş olduğu destek ve pozitif yaklaşımları ile cesaretlendirdiği için teşekkürü bir borç bilirim.

Tezin konusunun belirlenmesinde, analizlerde ve arazi çalışmalarında değerli katkılarını hiçbir zaman esirgemeyen, beni bu alanda çalışmaya yönlendiren ve bunların ötesinde hayatta her konuda yanımda olan ikinci danışmanım Doç. Dr. Fatih ÖĞRETMEN'e şükranlarımı sunarım.

Tez çalışması süresince, katkılarını sunan Tez İzleme Komitesi üyeleri Prof. Dr. Murat BARLAS ve Prof. Dr. Kenan GÜLLÜ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Kimyasal maddelerin temininde katkısı bulunan Doç. Dr. Mehmet ÖZTÜRK'e, çalışmanın gerçekleştiği balık çiftliği yöneticilerine, burada çalışan su ürünleri mühendisi Hüseyin URÇUK'a ve özellikle örneklemelerde her türlü yardımını sunan kuluçkahane sorumlusu su ürünleri mühendisi Ersin ÇELİK'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tez çalışmasının tüm aşamalarında beni destekleyen ve özellikle enzim aktivite ölçümlerinde yardımcı olan sevgili eşim Dr. Tülden İNANAN'a, manevi desteklerinden ötürü değerli ablam Dr. Filiz İNANAN'a, kıymetli anneme ve babama minnettar olduğumu belirtmek isterim.

Bu tez çalışması, Yükseköğretim Kurulu Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı ile, BAP-012-92 numaralı Bilimsel Araştırma Projesi ile ve 113O606 numaralı TÜBİTAK Projesi ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç ve Kapsam.....	2
1.2. Kaynak Özetleri.....	3
1.3. Balık Spermi ve Seminal Plazması	12
1.3.1. Balıklarda sperm motilitesi ve etkileyen parametreler.....	14
1.3.2. Balıklarda erkek üreme sistemi ve gonadın yapısı	19
1.3.3. Balık sperminin kısa ve uzun süreli muhafazası.....	23
1.3.4. Balık seminal plazma içeriği ve oksidatif yapısı	26
1.3.5. Balık sperminde DNA hasarı.....	29
1.4. Cinsiyet Değiştirme ve Yetiştiricilik	30
1.5. CD Dişi Gökkuşaağı Alabalığı ve Sperm Kalitesi.....	31
2. MALZEME VE YÖNTEM	34
2.1. Malzeme.....	34
2.1.1. Deneme yeri.....	34
2.1.2. Balık, yem ve su materyali	35
2.1.3. Kullanılan antioksidanlar ve diğer maddeler.....	36
2.2. Yöntem	38
2.2.1. Balık gamet örneklemeşi	38
2.2.2. Sperm motilite karakteristikleri ve sperm yoğunluğunun belirlenmesi	39
2.2.3. Seminal plazma eldesi ve analizleri	40
2.2.3.1. pH ve ozmolarite ölçümü, iyon ve metabolit içeriklerinin belirlenmesi	41
2.2.3.2. Protein, lipid peroksidasyonu, katalitik aktivite ve toplam antioksidan kapasitesi tayinleri	41
2.2.3.3. Fourier transform infra-red (FTIR) analizleri.....	42
2.2.4. Kısa süreli muhafaza çalışmaları	43

2.2.5. Uzun süreli muhafaza (kriyoprezervasyon) çalışmaları.....	43
2.2.6. Dölleme çalışmaları	44
2.2.7. DNA Hasar (Comet) Analizleri	46
2.2.8. İstatiksel Analizler	49
3. BULGULAR.....	50
3.1. Spermatozoa Yoğunluğu, Seminal Plazma pH ve Ozmolarite Değerlerinin Belirlenmesi.....	50
3.2. Seminal Plazma İyon ve Metabolit İçeriklerinin Belirlenmesi	53
3.2.1. Seminal plazma Na ⁺ derişimleri	54
3.2.2. Seminal plazma K ⁺ derişimleri.....	55
3.2.3. Seminal plazma Cl ⁻ derişimleri.....	56
3.2.4. Seminal plazma Ca ²⁺ derişimleri	57
3.2.5. Seminal plazma Mg ²⁺ derişimleri	58
3.2.6. Seminal plazma metabolit derişimleri.....	58
3.3. Seminal Plazma Protein Derişimleri, Lipit Peroksidasyonu, Katalaz Aktivitesi ve Toplam Antioksidan Kapasitesi Değerlerinin Belirlenmesi	60
3.3.1. Seminal plazma protein derişimleri	60
3.3.2. Seminal plazma lipit peroksidasyonu (LPO) değerleri	61
3.3.3. Seminal plazma katalaz aktivite (KAT) değerleri	62
3.3.4. Seminal plazma toplam antioksidan kapasite (TAK) değerleri.....	63
3.4. Seminal Plazma FTIR Spektrumlarının İncelenmesi	64
3.5. Motilite Karakteristiklerinin İncelenmesi.....	67
3.6. Testiküler Sperm DNA Hasarlarının Değerlendirilmesi	70
3.7. Kısa Süreli Muhafaza Çalışmaları.....	73
3.7.1. Sulandırma oranlarının ve pH değerlerinin motilite karakteristikleri üzerine etkileri.....	74
3.7.2. Farklı antioksidan içeren sulandırıcıların motilite karakteristikleri üzerine etkileri	75
3.7.3. Farklı antioksidan içeren sulandırıcıların dölleme üzerine etkileri	96
3.8. Uzun Süreli Muhafaza (Kriyoprezervasyon) Çalışmaları	99
3.8.1. Kriyoprezervasyon Sonrası Motilite Karakteristikleri	100
3.8.2. Kriyoprezervasyon Sonrası DNA Hasarlarının Tespiti.....	101
3.8.3. Kriyoprezervasyonun Dölleme Üzerine Etkileri	102
4. TARTIŞMA VE ÖNERİLER.....	104
KAYNAKLAR.....	135
ÖZGEÇMİŞ.....	170

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan yemlerin boyutlarına göre içerikleri	35
Çizelge 2.2. İncelenen iki üreme sezonu boyunca CD dişi ve N erkek birey sayıları (n) ve fiziksel özellikleri (B: sezon başlangıcı, O: sezon ortası, S: sezon sonu)	39
Çizelge 2.3. Toplam antioksidan ölçümü hesaplanmasında örneklerin hazırlanması	41
Çizelge 3.1. İncelenen üreme sezonu sezon başlangıcı (B), ortası (O) ve sonu (S) dönemlerinde CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinin glukoz, kolesterol, üre ve trigliserit metabolitlerinin en düşük-en yüksek değer aralıkları ...	59
Çizelge 3.2. DNA hasarı sınıflandırması için lizis solüsyonuna farklı seviyelerdeki H ₂ O ₂ eklenerek elde edilmiş DNA hasarı oranları (%)	71
Çizelge 3.3. İncelenen üreme sezonu boyunca sezon ortası dönemi N erkek alabalık bireylerindeki sperm DNA hasar oranları (%)	71
Çizelge 3.4. İncelenen üreme sezonu boyunca sezon ortası dönemi CD dişi alabalık bireylerindeki sperm DNA hasar oranları (%)	72
Çizelge 3.5. İncelenen 1. üreme sezonu sezon ortası dönemi örnekleri döllenme (%), gözlenme (%) ve yumurtada çıkış (%) oranları ($P < 0,05$)	98
Çizelge 3.6. İncelenen 2. üreme sezonu sezon ortası dönemi döllenme (%), gözlenme (%) ve yumurtada çıkış (%) oranları ($P < 0,05$)	99
Çizelge 3.7. Kriyoprezervasyon işleminde antioksidan uygulamalarının çözüm sonrası motilite oranları (%) ve doğrusal motilite süreleri (sn) üzerine etkisi ($P < 0,05$)	100
Çizelge 3.8 Kriyoprezervasyon işleminde antioksidan uygulamalarının çözüm sonrasında DNA hasarlı hücre oranları (%) ($P < 0,05$)	101
Çizelge 3.9. Kriyoprezervasyon işleminde antioksidan uygulamalarının çözüm sonrasında döllenme (%), gözlenme (%) ve yumurtadan çıkış (%) oranları üzerine etkileri ($P < 0,05$)	103
Çizelge 4.1. Bazı Salmonid türlerinde ve tez çalışmasında incelenen üreme sezonu ortasında seminal plazma ozmolarite ve pH değerleri (ort, ort $\pm$ std, minimum-maksimum)	109
Çizelge 4.2. Bazı Salmonid türlerinde ve tez çalışmasında incelenen üreme sezonu ortasında seminal plazma Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻ , Ca ²⁺ ve Mg ²⁺ değerleri (ort, ort $\pm$ std)	113
Çizelge 4.3. CD dişi gökkuşağı alabalığında önceki çalışmalarda sunulmuş ve tez çalışmasında incelenen üreme sezonları sezon ortalarında saptanmış bazı seminal plazma parametreleri (ort $\pm$ std, minimum-maksimum)	116
Çizelge 4.4. Bazı Salmonid türlerinde ve tez çalışmasında incelenen üreme sezonu ortasında sperm yoğunluğu ve seminal plazma protein, trigliserit, glukoz	

ve kolesterol derişimleri değerleri (ort, ort $\pm$ std, minimum-maksimum)	118
Çizelge 4.5. CD dişi anaçların üretimde kullanılmasının avantajları ve dezavantajları	134

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Tez çalışması sürecinde 3 ana başlıkta toplanan örneklemeler	3
Şekil 1.2. Bir balık sperminin (akuasperm) genel yapısı (A) ve Salmonidae familyasına ait 3 altfamilyaya ait sperm şekillleri (B) (n:nükleus, m:mitakondri, a:aksonem, c:sitoplazma, dc:distal sentriyol, fl: flagellum, hr: baş kısmı, mi:mitakondri, mp: orta kısım, nu: nükleus, pc:proksimal sentriyol ,rc: sitoskeletal filament halkası, tr: kuyruk kısmı) (Cosson vd., 1999; Lahnsteiner ve Patzner 2007)	13
Şekil 1.3. Tatlı su deniz balıklarında sperm motilitesinin ozmolarite ile başlaması (Dreanno vd., 1999'dan değiştirilerek).....	15
Şekil 1.4. Tatlı su balığında (<i>Cyrinus carpio</i>) sperm motilitesinin başlama mekanizması yolu (Krasznai vd., 1999'dan değiştirilerek)	17
Şekil 1.5. Teleost balıklarda ürogenital sistem (A) ve balıklarda üreme sisteminin yardımcı organlarının boyuna kesitte şematik gösterimi (B). a: Böbrek, b: Wolffian kanalı, c: Sperm kanalı, d:Testis, 1: Testis, 2:Testiküler ana kanal, 3:Testiküler bez, 4: Sperm kanalı, (Alavi vd., 2008 ve Lahnsteiner ve Patzner, 2009'dan değiştirilerek).....	21
Şekil 1.6. Teleost balıklarda testisin bölümleri (Billard vd., 1982).....	22
Şekil 2.1. Çalışmada kullanılan antioksidanların moleküler yapıları	37
Şekil 2.2. Progresif (A) ve progresif olmayan (B) motilitenin şematik gösterimi ...	40
Şekil 2.3. Dölleme oranların belirlenmesinde yumurta fiksasyon solüsyonu ile muamele edilen örnekler ve yumurtaların sayımı	46
Şekil 2.4. Kuluçka dolaplarına, döllenmiş yumurtaların takibi için kurulan sistemdeki örnekler	46
Şekil 2.5. Comet analizinde, lamaların hazırlanması (A), agoroz uygulaması için hazırlanmış lamaların görünümü (B) ve liziz aşaması sonrası üzerlerinde örnek bulunan lamaların elektroforez uygulaması (C).....	48
Şekil 2.6. Comet analizi sonuçlarının görüntülenmesi, DNA hasarı olmayan hücreler (A) ve DNA hasarlı bir örneğin görünümü (B).....	48
Şekil 2.7. Comet anazlizi sonunda hücrelerdeki DNA hasarının değerlendirilmesinin şematik gösterimi, hasarsız hücreler “0” (24-30 µm), az hasarlı hücreler “1” (30-40 µm), hasarlı hücreler “2” (40-50 µm) ve en hasarlı hücreler “3” (>50 µm)	49
Şekil 3.1. İncelenen üreme sezonları sezon başlangıcı (B), ortası (O) ve sonu (S) dönemlerinde CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinin spermatozoa yoğunlukları ($\times 10^9/\text{mL}$) ($P < 0,05$).....	51
Şekil 3.2. İncelenen üreme sezonları sezon başlangıcı (B), ortası (O) ve sonu (S) dönemlerinde CD dişi ve N erkek alabalık bireylerin seminal plazma pH değerleri ($P < 0,05$).....	52

Şekil 3.3. İncelenen üreme sezonları sezon başlangıcı (B), ortası (O) ve sonu (S) dönemlerinde CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinin ozmolarite (mOsm/kg) değerleri ($P < 0,05$).....	53
Şekil 3.4. İncelenen üreme sezonları sezon başlangıcı (B), ortası (O) ve sonu (S) dönemlerinde CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinin Na^+ derişimleri (mM) ($P < 0,05$)	54
Şekil 3.5. İncelenen üreme sezonları sezon başlangıcı (B), ortası (O) ve sonu (S) dönemlerinde CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinin K^+ derişimleri (mM) ($P < 0,05$)	55
Şekil 3.6. İncelenen üreme sezonları sezon başlangıcı (B), ortası (O) ve sonu (S) dönemlerinde CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinin Cl^- derişimleri (mM) ($P < 0,05$)	56
Şekil 3.7. İncelenen üreme sezonları sezon başlangıcı (B), ortası (O) ve sonu (S) dönemlerinde CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinin Ca^{2+} derişimleri (mM) ($P < 0,05$)	57
Şekil 3.8. İncelenen üreme sezonları sezon başlangıcı (B), ortası (O) ve sonu (S) dönemlerinde CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinin Mg^{2+} derişimleri (mM) ($P < 0,05$)	58
Şekil 3.9. İncelenen üreme sezonu sezon başlangıcı (B), ortası (O) ve sonu (S) dönemlerinde CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinin protein derişimleri (mg/dL) ($P < 0,05$)	60
Şekil 3.10. İncelenen üreme sezonları sezon başlangıcı (B), ortası (O) ve sonu (S) dönemlerinde CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinin LPO değerleri ($\text{nmol/mg} \times 10^{-3}$) ($P < 0,05$)	61
Şekil 3.11. İncelenen üreme sezonları sezon başlangıcı (B), ortası (O) ve sonu (S) dönemlerinde CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinin KAT aktivite değerleri (kU/mg protein) ($P < 0,05$).....	63
Şekil 3.12. İncelenen üreme sezonu başlangıcı (B), ortası (O) ve sonu (S) dönemlerinde CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinin TAK değerleri (mM) ($P < 0,05$)	64
Şekil 3.13. İncelenen üreme sezonu boyunca CD dişi alabalık bireyleri için sezon dönemleri (B,O,S) FTIR spektrumları.....	65
Şekil 3.14. İncelenen üreme sezonu boyunca N erkek alabalık bireyleri için sezon dönemleri (B,O,S) FTIR spektrumları.....	66
Şekil 3.15. İncelenen 1. üreme sezonu sezon başlangıcı (B), ortası (O) ve sonu (S) dönemlerinde N erkek alabalık bireylerinin motilite oranları (1) ve doğrusal motilite süreleri (2).....	68
Şekil 3.16. İncelenen 1. üreme sezonu sezon başlangıcı (B), ortası (O) ve sonu (S) dönemlerinde CD dişi bireylerin motilite oranları (1) ve doğrusal motilite süreleri (2)	68
Şekil 3.17. İncelenen 2. üreme sezonu sezon başlangıcı (B), ortası (O) ve sonu (S) dönemlerinde N erkek alabalık bireylerinin motilite oranları (1) ve doğrusal motilite süreleri (2).....	69

Şekil 3.18. İncelenen 2. üreme sezonu sezon başlangıcı (B), ortası (O) ve sonu (S) dönemlerinde CD dişi alabalık bireylerinin motilite oranları (1) ve doğrusal motilite süreleri (2).....	69
Şekil 3.19. İncelenen üreme sezonu boyunca sezon ortası dönemi CD dişi (n=10) ve N erkek (n=14) bireylerde saptanan DNA hasarsız sperm hücreleri oranları (%) ($P < 0,05$).....	73
Şekil 3.20. Farklı oranlarda SSP (pH 9,5) ile sulandırılan örnekler için 3., 6. ve 12. saat için motilite oranları ve doğrusal motilite süreleri ($P < 0,05$)	74
Şekil 3.21. Farklı pH değerlerinde SSP sulandırılan örneklerde 3, 6 ve 12 saatte kaydedilen motilite oranları ve doğrusal motilite süreleri ($P < 0,05$)	75
Şekil 3.22. Kısa süreli muhafaza çalışmalarında 25 mg/L derişimdeki antioksidanların 1. üreme sezonu sezon başı örneklerinin doğrusal motilite süresi ve % motilite değerleri (RE: Resveratrol, RU: Rutin, RA: Rosmarinik Asit, KU: Kurkumin, KE: Kuersetin, SA: Salisilik asit, KO: Kontrol).....	77
Şekil 3.23. Kısa süreli muhafaza çalışmalarında 50 mg/L derişimdeki antioksidanların 1. üreme sezonu sezon başı örneklerinin doğrusal motilite süresi ve % motilite değerleri (RE: Resveratrol, RU: Rutin, RA: Rosmarinik Asit, KU: Kurkumin, KE: Kuersetin, SA: Salisilik asit, KO: Kontrol).....	78
Şekil 3.24. Kısa süreli muhafaza çalışmalarında 100 mg/L derişimdeki antioksidanların 1. üreme sezonu sezon başı örneklerinin doğrusal motilite süresi ve % motilite değerleri (RE: Resveratrol, RU: Rutin, RA: Rosmarinik Asit, KU: Kurkumin, KE: Kuersetin, SA: Salisilik asit, KO: Kontrol).....	79
Şekil 3.25. Kısa süreli muhafaza çalışmalarında 25 mg/L derişimdeki antioksidanların 1. üreme sezonu sezon ortası örneklerinin doğrusal motilite süresi ve % motilite değerleri (RE: Resveratrol, RU: Rutin, RA: Rosmarinik Asit, KU: Kurkumin, KE: Kuersetin, SA: Salisilik asit, KO: Kontrol).....	80
Şekil 3.26. Kısa süreli muhafaza çalışmalarında 50 mg/L derişimdeki antioksidanların 1. üreme sezonu sezon ortası örneklerinin doğrusal motilite süresi ve % motilite değerleri (RE: Resveratrol, RU: Rutin, RA: Rosmarinik Asit, KU: Kurkumin, KE: Kuersetin, SA: Salisilik asit, KO: Kontrol).....	81
Şekil 3.27. Kısa süreli muhafaza çalışmalarında 100 mg/L derişimdeki antioksidanların 1. üreme sezonu sezon ortası örneklerinin doğrusal motilite süresi ve % motilite değerleri (RE: Resveratrol, RU: Rutin, RA: Rosmarinik Asit, KU: Kurkumin, KE: Kuersetin, SA: Salisilik asit, KO: Kontrol).....	82
Şekil 3.28. Kısa süreli muhafaza çalışmalarında 25 mg/L derişimdeki antioksidanların 1. üreme sezonu sezon sonu örneklerinin doğrusal motilite süresi ve % motilite değerleri (RE: Resveratrol, RU: Rutin, RA: Rosmarinik Asit, KU: Kurkumin, KE: Kuersetin, SA: Salisilik asit, KO: Kontrol).....	83

Şekil 3.29. Kısa süreli muhafaza çalışmalarında 50 mg/L derişimdeki antioksidanların 1. üreme sezonu sezon sonu örneklerinin doğrusal motilite süresi ve % motilite değerleri (RE: Resveratrol, RU: Rutin, RA: Rosmarinik Asit, KU: Kurkumin, KE: Kuersetin, SA: Salisilik asit, KO: Kontrol).....	84
Şekil 3.30. Kısa süreli muhafaza çalışmalarında 100 mg/L derişimdeki antioksidanların 1. üreme sezonu sezon sonu örneklerinin doğrusal motilite süresi ve % motilite değerleri üzerine etkisi (RE: Resveratrol, RU: Rutin, RA: Rosmarinik Asit, KU: Kurkumin, KE: Kuersetin, SA: Salisilik asit, KO: Kontrol)	85
Şekil 3.31. Kısa süreli muhafaza çalışmalarında 25 mg/L derişimdeki antioksidanların 2. üreme sezonu sezon başı örneklerinin doğrusal motilite süresi ve % motilite değerleri (RE: Resveratrol, RU: Rutin, RA: Rosmarinik Asit, KU: Kurkumin, KE: Kuersetin, SA: Salisilik asit, KO: Kontrol).....	87
Şekil 3.32. Kısa süreli muhafaza çalışmalarında 50 mg/L derişimdeki antioksidanların 2. üreme sezonu sezon başı örneklerinin doğrusal motilite süresi ve % motilite değerleri (RE: Resveratrol, RU: Rutin, RA: Rosmarinik Asit, KU: Kurkumin, KE: Kuersetin, SA: Salisilik asit, KO: Kontrol).....	88
Şekil 3.33. Kısa süreli muhafaza çalışmalarında 100 mg/L derişimdeki antioksidanların 2. üreme sezonu sezon başı örneklerinin doğrusal motilite süresi ve % motilite değerleri (RE: Resveratrol, RU: Rutin, RA: Rosmarinik Asit, KU: Kurkumin, KE: Kuersetin, SA: Salisilik asit, KO: Kontrol).....	89
Şekil 3.34. Kısa süreli muhafaza çalışmalarında 25 mg/L derişimdeki antioksidanların 2. üreme sezonu sezon ortası örneklerinin doğrusal motilite süresi ve % motilite değerleri (RE: Resveratrol, RU: Rutin, RA: Rosmarinik Asit, KU: Kurkumin, KE: Kuersetin, SA: Salisilik asit, KO: Kontrol).....	90
Şekil 3.35. Kısa süreli muhafaza çalışmalarında 50 mg/L derişimdeki antioksidanların 2. üreme sezonu sezon ortası örneklerinin doğrusal motilite süresi ve % motilite değerleri (RE: Resveratrol, RU: Rutin, RA: Rosmarinik Asit, KU: Kurkumin, KE: Kuersetin, SA: Salisilik asit, KO: Kontrol).....	91
Şekil 3.36. Kısa süreli muhafaza çalışmalarında 100 mg/L derişimdeki antioksidanların 2. üreme sezonu sezon ortası örneklerinin doğrusal motilite süresi ve % motilite değerleri (RE: Resveratrol, RU: Rutin, RA: Rosmarinik Asit, KU: Kurkumin, KE: Kuersetin, SA: Salisilik asit, KO: Kontrol).....	92
Şekil 3.37. Kısa süreli muhafaza çalışmalarında 25 mg/L derişimdeki antioksidanların 2. üreme sezonu sezon sonu örneklerinin doğrusal motilite süresi ve % motilite değerleri (RE: Resveratrol, RU: Rutin, RA: Rosmarinik Asit, KU: Kurkumin, KE: Kuersetin, SA: Salisilik asit, KO: Kontrol).....	93

- Şekil 3.38. Kısa süreli muhafaza çalışmalarında 50 mg/L derişimdeki antioksidanların 2. üreme sezonu sezon sonu örneklerinin doğrusal motilite süresi ve % motilite değerleri (RE: Resveratrol, RU: Rutin, RA: Rosmarinik Asit, KU: Kurkumin, KE: Kuersetin, SA: Salisilik asit, KO: Kontrol).....94
- Şekil 3.39. Kısa süreli muhafaza çalışmalarında 100 mg/L derişimdeki antioksidanların 2. üreme sezonu sezon sonu örneklerinin doğrusal motilite süresi ve % motilite değerleri (RE: Resveratrol, RU: Rutin, RA: Rosmarinik Asit, KU: Kurkumin, KE: Kuersetin, SA: Salisilik asit, KO: Kontrol).....95

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Santigrat Derece
α	Alfa
%	Yüzde
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	Amonyum Molibdat
μm	Mikrometre
ATR	Azaltılmış Toplam Yansıma
B	Sezon Başı
Ca^{2+}	Kalsiyum İyonu
CaCl_2	Kalsiyum Klorür
CD	Cinsiyeti Değiştirilmiş Dişi Birey
Cl^-	Klor İyonu
dL	Desilitre
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
g	Gram
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-Piperazinethansülfonik Asit
HgCl_2	Civa (II) Klorür
K^+	Potasyum İyonu
KAT	Katalaz
KBr	Potasyum Bromür
KCl	Potasyum Klorür
KE	Kuersetin
kg	Kilogram
kKal	Kilokalori
KO	Kontrol
kU	Kilounit
KU	Kurkumin

L	Litre
LPO	Lipit Peroksidasyonu
M_A	Molekül Ağırlığı
mA	Miliamper
Max	Maksimum
MDA	Malondialdehit
mg	Miligram
Mg^{2+}	Magnezyum İyonu
$MgSO_4$	Magnezyum Sülfat
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Magnezyum Sülfat Hepta Hidrat
Min	Minumum
mM	Milimolar
mm^2	Milimetre Kare
mOsm	Miliosmol
N	Normal Erkek Birey
n	Birey Sayısı
Na^+	Sodyum İyonu
Na_2SO_4	Sodyum sülfat
NaCl	Sodyum Klorür
NaH_2PO_4	Sodyum Dihidrojen Fosfat
$NaHCO_3$	Sodyum bikarbonat
NaOH	Sodyum Hidroksit
NH_4^+	Amonyum İyonu
NO_2^-	Nitrit İyonu
NO_3^-	Nitrat İyonu
O	Sezon Ortası
<i>P</i>	Önem Derecesi
PO_4^{-3}	Fosfat İyonu
ppt	Trilyonda Bir
RA	Rosmarinik Asit
RE	Resveratrol
rpm	Dakikadaki Dönüş Sayısı
RU	Rutin
S	Sezon Sonu

SA	Salisilik Asit
SSP	Suni Seminal Plazma
TAK	Toplam Antioksidan Kapasitesi
TBA	Tiyobarbitürik Asit
V	Volt

1. GİRİŞ

Tüm dünya ülkelerinde ve ülkemizde en çok kültürü yapılan ve avlanan türlerden biri olan gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792), önemli bir besin ve ekonomik kaynak teşkil etmektedir. FAO'ya (Gıda ve Tarım Teşkilatı) göre 2000'li yıllarda gökkuşağı alabalığı yetiştiriciliği yapılan ülke sayısı 64'e ulaşmıştır. Birincil üretim alanları, Avrupa, Kuzey Amerika, Şili, Japonya ve Avustralya olmak üzere, toplam dünya üretimi 2003 yılında 500.000 tona ulaşmıştır (Anonim, 2014). TÜİK (Devlet İstatistik Kurumu) verilerine göre, Türkiye'de 1996 yılında 20.000 tonun altında olan üretim miktarı, 2011 yılında 100.000 ton sınırını geçmiş olup, Ege Bölgesi son yıllarda en çok üretimin yapılan bölge olarak belirlenmiştir (Anonim, 2013). Gökkuşağı alabalığı üretimi 2011 yılında, toplam kültür balığı üretiminin yaklaşık % 50'sini oluşturmuştur. Bu nedenle gökkuşağı alabalığı üretimi, hem besin hem de istihdam açısından ülkemiz su ürünleri sektörünün en önemli uğraş alanlarından birisidir. Üretimdeki bu ilgi artışı, bilimsel farkındalığı da uyarmış ve gökkuşağı alabalığı üreme biyolojisi çalışmaları giderek hız kazanmış, özellikle biyoteknolojik çalışmalar açısından önem kazanmıştır.

Gökkuşağı alabalığı üretiminde, tamamı dişi bireylerden oluşan popülasyonlar, dişi bireylerin hızlı gelişmesi ve et veriminin fazla olması, hastalıklara karşı dayanıklı olması, daha iyi et kalitesine sahip olması ve daha ekonomik olması gibi birçok avantajları nedeniyle tercih edilmektedir. Tamamı dişi popülasyon elde etmede, en verimli ve sağlıklı metot homozigot (XX) cinsiyet kromozomu içeren sperm ile yumurtanın döllenmesini sağlamaktır. Bu durum, cinsiyeti değiştirilmiş (CD) dişi bireylerin anaç olarak kullanılması ile mümkündür. CD dişi bireyler, larvalara çeşitli cinsiyet hormonları uygulanması ile elde edilirler. CD dişiler, fonksiyonel erkekler, hormonlu erkekler şeklinde isimlendirilen bu bireyler, erkek fenotipine ancak dişi genotipine sahip olurlar, testisleri fonksiyoneldir. Normal erkek bireylerin cinsiyet kromozom yapısı XY iken, bunların sperm hücrelerindeki yapı XX şeklindedir.

Böylelikle, Y kromozomu elemine edilir ve CD dişi bireylerden elde edilen sperm ile yapılan her dölleme sonucu oluşan zigot geliştiğinde bir dişi birey oluşmaktadır.

CD dişi bireylerin, normal erkeklerden en önemli farkı, genellikle testis ve sperm kanallarının oluşmaması veya az gelişmesidir. Bu sebeple, bu bireylerden semen alınabilmesi için, bireylerin kesilerek testisin çıkarılması ve testis içerisindeki semenin süzdürülmesi gerekmektedir. Ancak spermatogenez sürecinde sperm hücresinin olgunlaştığı, bir başka deyişle motilite kazanmaya hazır hale geldiği, yer olan sperm kanallarının olmaması sebebiyle, testiküler semen çok miktarda olgunlaşmamış sperm hücresi içerir. Bu tip sperm hücrelerinin motilite oranları düşüktür ve dolayısıyla yumurtayı dölleme kabiliyetleri azdır. Bu şekilde elde edilen sperm hücrelerinin *in vitro* şartlarda belli süre çeşitli suni seminal plazmalar (SSP) içinde saklanarak, olgunlaşmaları kısmen de olsa sağlanabilir ve motilite kaliteleri artırılabilir.

1.1. Amaç ve Kapsam

Tez çalışmasının temel amacı, hormonal cinsiyet değiştirme yöntemi kullanılarak cinsiyeti değiştirilmiş (erkekleştirilmiş) dişi alabalıklarda, testiküler spermin üreme sezonu boyunca sperm kalitesinin, seminal plazmanın biyokimyasal parametrelerinin belirlenmesi ve sperm kalitesinin artırılması amacıyla farklı antioksidanlar içeren sulandırıcı ortamlarda (suni seminal plazmalarda) kısa ve uzun süreli muhafaza edilmesidir. Ayrıca, çalışmalarda henüz ülkemizde sınırlı kullanımı olan CD dişi alabalık anaçlarının verimli kullanımını arttırmak da amaçlanmıştır.

Tez çalışmaları kapsamında yapılan semen analizleri (sperm ve seminal plazma), kısa süreli muhafaza (ve olgunlaştırma) çalışmaları ve uzun süreli muhafaza (kriyoprezervasyon) çalışmaları süresince ölçülen parametreler Şekil 1.1.'de sunulmuştur. İlk iki üreme sezonunda, seminal plazma biyokimyasal analizleri ve kısa süreli muhafaza çalışmaları gerçekleştirilmiş iken 3. üreme sezonunda sperm hücreleri DNA hasarları ve uzun süreli muhafaza çalışmaları tamamlanmıştır. İlk iki sezonda, toplamda 102 normal (N) erkek bireyin ve 88 CD dişi bireyin semen özellikleri incelenmiştir. İlk sezonda 2-3 yaşında CD bireyler, ikinci sezonda 3-4

yaşındaki CD bireyler, her iki sezonda da 2-3 yaşındaki N erkek bireyler değerlendirilmiştir.



Şekil 1.1. Tez çalışması sürecinde 3 ana başlıkta toplanan örneklemeler

1.2. Kaynak Özetleri

Birçok balık türünde cinsiyet gelişimi, genellikle kuluçkadan çıktıktan hemen sonra gerçekleşmektedir. Embriyonun genetik yapısına karşın, gelişim anında meydana gelecek modifikasyonlar, eşey hücrelerini ovaryum ya da testis olacak şekilde programlamaktadır. Fenotipik cinsiyetin değiştirilebileceği bu dönem türlere göre farklılık göstermektedir. Eğer bir larva keseli dönemden sonra anabolik steroidleri absorbe ederse cinsiyet hücrelerinin gelişimi gerçekleşmekte ve bu dönemde yapılabilecek bir müdahale cinsiyet kontrolünü mümkün kılmaktadır (Sheperd, 1990). Hormonal cinsiyet dönüşüm metodu, tek cinsiyetli balık popülasyonlarının

retiminde ekonomik olması, yüksek teknoloji ve uzmanlık gerektirmemesi nedeniyle en çok tercih edilen üretim tekniklerinden biridir (Pandian ve Sheela 1995; Arslan vd., 2001; Piferrer, 2001). CD (erkekleştirilmiş) dişi bireyler fenotipik olarak erkek fakat genotipik olarak (XX) dişi olmaktadır. Böylece fonksiyonel testislerde üretilen tüm sperm hücreleri sadece X kromozomu taşıtmaktadır. Balıkların erkekleştirilmesinde genellikle, doğal testosteron hormonunun bir türevi olan 17 α -metiltestosteron uygulanmaktadır. 17 α -metiltestosteronun yapay analogu, ucuz ve kolay bulunmakta ve bu yüzden pratik erkekleştirme işlemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Salmonid türlerinde kg yem başına 3mg 17 α -metiltestosteron dozu erkekleştirme için yeterli olmaktadır (Purdom, 1993). Kullanılan diğer hormonlar arasında, 11 β -hidroksiandrostenedion ve 17 α -etinilmetiltestosteron ve 11-ketotestosteron sayılabilmektedir (zden ve Güllü, 1996). Alabalıkların hormon kullanılarak cinsiyet değiştirilmesinde en yaygın uygulama, dolaylı cinsiyet değiştirme metodudur. Bunun nedeni ebeveynlere hormon uygulanıp tktilecek balıklara hormon uygulanmamış olmasıdır (Güner ve Kızak, 2001). Genel olarak hormonlar, larvaların ilk yem alımından itibaren 40-60 günlük dönemde, nadiren 100 gün boyunca uygulanmakta ve bundan dolayı hormonal kalıntılar, balığın pazarlanmasından çok önce dokulardan yok olmaktadır (Sheperd, 1990). Ayrıca doğrudan hormonal uygulamada %100 tek cinsiyetli popülasyon oluşturma garantisi bulunmazken, dolaylı yöntemde tümüyle dişi ve erkek popülasyonlar üretilabilmektedir (zden vd., 2003). Atar vd. (2009), 17 α -metiltestosteron, 17 α -etiniltestosteron ve 11 β -hidroksiandrostenedion ile yaptıkları çalışmada bu hormonların alabalıklarda cinsiyet değişimine etkilerini araştırmışlar ve sonuçta kg yem başına eklenen 3 mg 17 α -metiltestosteronun, yavru balıklara 60 gün uygulanması sonucunda %86.67 $\pm$ 6.67 cinsiyet değişimi sağlayarak, diğer iki hormona göre daha etkili olduğunu belirlemişlerdir. Normal ticari uygulamalarda CD dişi alabalıklarda testis genelde tek parçadır ve sperm kanalı bulunmadığından testisi çıkarmak için balıklar kesilmektedir. Sperm alımında testis dokularının karışmaması için parçalanan testis 1 mm göz açıklığındaki bir elekten szlmektedir. Szlen sperm çok yoğun olduğu için aktivasyonu baskılayacak bir sulandırıcı (ektender) kullanılması gerekmektedir (Olito ve Brock, 1991). Ayrıca normal (genotipik) erkekler gibi abdomene uygulanan yumuşak bir basınçla sperm bırakamadıklarından gonadal olgunluklarının önceden kontrol edilmesi de mümkün olmamaktadır. Bu

yüzden de 2-3 yılda erginleşen bu anaçlar ancak bir defa kullanılabilir (Geffen ve Evans, 2000). CD dişilerden elde edilen semen birçok özelliği bakımından, normal erkek bireylerden elde edilenden önemli derecede farklılık göstermektedir (Robles vd., 2009).

Balık yetiştiriciliğinde başarıyı etkileyen önemli faktörlerin başında balıkların ürettikleri sperm hücrelerinin hacimsel olarak miktarı, yoğunluğu ve canlılığı gibi özellikler bulunmaktadır. Bu özellikler türler arasında büyük farklılıklar göstermektedir. Balıklarda sperm kalitesi ve fizyolojisi ile ilgili konularda fikir sahibi olmak için sperm hücrelerinin testis, testis kanalları veya sperm kanalları sisteminde bulunduğu ortam şartları, sperm hücrelerinin elde edildikten sonra muhafazası, herhangi bir sulandırıcı çözeltisi ile seyreltilme oranı ve dölleme özellikleri gibi konularda detaylı bilgilere ulaşılması önemli olmaktadır (Billard vd., 1995). Dış dölleme görülen balıklarda sperm hücreleri, dış ortama bırakılmaları anına kadar hareketsiz yani inaktiftirler. Sperm hücreleri üreme sistemi kanal boşluklarında toplanmakta ve çevre şartları uygun oluncaya kadar hareketsiz bir şekilde kalmaktadır. Testislerde hareketsiz bir şekilde bulunan sperm hücreleri, su ile temasa geçtiğinde hareket kabiliyeti kazanmaktadır (Stoss, 1983). Tatlı su balıklarının birçoğunda sperm hücreleri 2 dakikadan daha az süre hareketli kalırlar (Rurangwa vd., 2004). Doğada veya akuakültür ortamlarında, balık gametlerinin kalitesi son derece değişkendir ve aynı zamanda önemli sayıda dış faktörlerin veya kuluçka yönetimi uygulamalarının etkisi altındadır. Bu nedenlerle gamet kalitesi konusu artan şekilde ilgi görmektedir. Bu konuda önemli çalışmalar olmasına rağmen gamet kalite kontrolü bazı faktörlerin daha iyi anlaşılmasını gerektirmektedir. Günümüzde gamet kalitesi konusu tam anlaşılamamıştır ve gamet kalite kontrolü yetiştiricilik sektöründe sorun olmaya devam etmektedir. Bunun nedeni gamet kalitesinde gözlenen değişkenliklerden sorumlu faktörlerin ve moleküler mekanizmalarının bazılarının bilinmemesi ya da tam olarak anlaşılmasındadır (Julien ve Labbé, 2010). Sperm hücrelerinin organik içeriğini lipid, fosfolipit, kolesterol, trigliserit ve protein gibi metabolitler oluşturmaktadır. Bunların yanı sıra adenin trifosfataz, fosfataz, lipaz, esteraz, oksidazlar, birçok urikolitik enzim, malik dehidrogenaz, adenozin trifosfataz, laktat dehidrogenaz, piruvat dehidrogenaz, kreatin fosfokinaz ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz gibi enerji metabolizmasında görevli birçok enzimi içermektedir (Stoss, 1983). Motilite karakteristikleri üzerine, bu parametrelerin ve

bunların dışında yağ asitleri ve amino asitler gibi metabolitlerin de etkisinin olabileceği düşünülmektedir (Lahnsteiner, 2009).

Bir spermin kalitesi, yumurtayı başarılı bir şekilde dölleyebilmesi olarak ifade edilmektedir. Sperm kalitesinin belirlenmesinde, spermin dölleme kapasitesi ile ilişkili olan ve ölçülebilen özellikleri (motilite yüzdesi ve süresi gibi) kullanılmaktadır (Subasinghe vd., 2009). İyi bir dölleme, kaliteli yumurta ve sperm ile gerçekleşmektedir. Oluşan embriyonun kalitesinde her iki gametin de etkisi bulunmaktadır (Rideout vd., 2003). Yetiştiricilik ünitelerinde sperm kalitesini etkileyen biyotik ve abiyotik faktörlerin, genetik, fizyolojik ve çevresel faktörlerin etkileşimine bağlı olduğu belirtilmektedir. Sperm, yetiştiricilik şartlarından veya sağım ve döllemeye kadar olan sürede *in vivo* saklama koşullarından etkilenebilmektedir (Rurangwa vd., 2004). Birçok alabalık üretim tesisinde, dişi ve erkek anaçlar arasında, üreme döneminde görülen senkronizasyon bozukluğu nedeniyle bazen dişilerden yumurta alındığı halde erkek bireylerden sperm alınamamakta veya bunun tersi görülmektedir. Bu durumda üretici, dişilerden yumurta sağımı yaptığında erkek anaçlar sperm vermediği için sağılan yumurtaya dölleme işlemi uygulanamamakta ve yumurtalar ziyan olmakta veya erkekler olgunlaştığı halde dişilerden yumurta alınamadığında ise sperm kaybı söz konusu olmaktadır. Bu da üreticilerin ekonomik kayıplara uğramasına yol açmaktadır (Tabakoğlu, 2005). Spermin dölleme kapasitesiyle direk olarak ilişkili tüm fiziksel parametreler, potansiyel olarak sperm kalitesini ölçmede kullanılabilir. Günümüze kadar yapılan araştırmalarda spermin yoğunluğu, ATP derişimi, motilitesi ve morfolojik yapısı, seminal plazmanın ozmolarite ve pH değerleri, kimyasal yapısı, enzimatik aktiviteleri gibi özellikler sperm kalitesini tanımlamada kullanılan önemli parametrelerdir. Sperm motilite kalitesindeki değişkenlik farklı erkekler arasında gözlenebildiği gibi aynı bireyin üreme sezonu süresince de gözlenebilmektedir (Billard vd., 1995). Sperm motilite kalitesi düşük olan sperm hücreleri, yumurta membranına penetre olamamakta ve yumurtayı dölleyememektedir (Honeyfield ve Krise, 2000).

Normal erkek alabalık bireylerinde üreme sezon sonuna doğru spermatokrit, sperm motilitesi, protein derişimi, antitiripsin aktivitesi ve askorbik asit miktarı azalmaktadır. Üreme sezonunda sperm kalitesine ait bilgiler alabalık üretiminin

kültür şartlarında kontrol için son derece önemli olmaktadır (Buyukhatipoglu ve Holtz, 1984; Munkittrick ve Moccia 1987; Ciereszko vd., 1996;2004). Geffen ve Evans (2000), CD dışı balıklarda morfoloji ve sperm kalitesi hakkında önceden tahminin zor olduğunu ve performansın çok değişken olduğunu, daha büyük balıklarda dölleme oranının daha yüksek olabildiğini belirtmişlerdir. Ayrıca CD dışı balıklarda dölleme oranlarını arttırmak için üreme performansını belirlemeye ihtiyaç olduğunu bildirmişlerdir. Balık sperminin testislerde motilite kazanmaya uygun hale gelmesi, üreme kanallarındaki seminal plazmanın iyon bileşimine, ozmolarite ve pH değerlerine bağlı olmaktadır (Morisawa vd., 1983). Normal erkek alabalıklarda sperm kanalındaki sperm, proteinler, yağlar, karbonhidratlar ve serbest aminoasitler içeren bir seminal plazma ortamında depolanmaktadır (Piironen ve Hyvarinen, 1983). Seminal plazmanın fizyolojik görevi erkek gametlerini dışı genital organlarına aktaran tampon bir sıvı gibi görev yapmak ve spermatozoon hareketini kolaylaştırmanın yanında (Çeviker ve Tuncer, 2005) testislerde spermatozoonun muhafazası için optimum bir ortam sağlamak ve dölleme sırasında spermin hareketini kolaylaştırmaktır (Billard vd., 1986; Ciereszko vd., 2000). Seminal plazmayı oluşturan iyonların spermatozoa motilitesinin düzenlenmesinde ve seminal plazmanın ozmolarite değerinin ayarlanmasında gerekli olduğu belirtilmektedir (Scott ve Baynes, 1980; Billard ve Cosson, 1992). Ancak hücrelerin zarlarında oluşan herhangi bir bozukluk nedeniyle seminal plazmayı oluşturan iyonların oranları değişebilmektedir. Bu durum plazmadan hücreye ya da hücreden plazmaya madde geçişine neden olmaktadır. Genellikle hücreden sperm plazmasına Mg^{+} ve K^{+} , plazmadan hücreye ise Na^{+} ve Ca^{2+} geçtiği bildirilmektedir (Billard vd., 1986). Seminal plazmadaki Na^{+} miktarının, alabalıklarda dölleme oranı ile doğru orantılı olduğu kanıtlanmıştır. Glukoz gibi karbonhidratların Atlantik salmonunda (*Salmo salar*) sperm motilitesine pozitif etkisi olduğu saptanmıştır (Aas vd., 1991).

Testiküler sperm hücrelerinin her biri birbirinden çok farklı olgunlaşma safhalarında olduklarından normal spermden daha zayıf performans göstermektedirler. Normal gökkuşağı alabalıklarda testisten alınan spermin, sperm kanalındakine göre sperm yoğunluğu ve spermatokrit daha yüksekken motilite daha düşüktür (Billard vd., 1986). CD dışı alabalıklarda herhangi bir işlem görmeyen sperm ile döllenen yumurtalarda gözlenme oranları %20-30 arasındadır. Bununla beraber testiküler sperm ile gözlenme oranları çeşitli uygulamalarla %70-80 oranlarına kadar

iyileştirilebilmektedir (Kobayashi vd., 2004). Bu tip uygulamalar sadece CD dişi alabalıklarda değil aynı zamanda *Salvelinus pluvius* gibi sağım esnasında çok az sperm alınabilen türlerde de kullanışlı bir şekilde uygulanabilmektedir (Ciereszko vd., 2000). CD dişi alabalıklarda seminal plazma pH değerinin ve HCO_3^- derişiminin, normal erkeklerdeki seminal plazmaya göre daha düşük olduğu bilinmektedir. Gökkuşığı alabalığında sperm kanalındaki pH'ın 8 civarında olduğu bildirilmiştir (Morisawa ve Morisawa, 1986; Morisawa, 1987). Balık sperm hücrelerinde farklı motilite değerleri görülmesinin diğer bir nedeni de, semen içerisinde olgunlaşmasının farklı aşamalarında yer alan sperm hücrelerinin yer almasından kaynaklanabilmesidir. İlk sperm alımından bir ay sonra daha iyi kalitede ve olgunlaşmasını tamamlanmış sperm hücreleri elde edilebilmektedir (Zhukinskiy ve Alekseenko, 1983). Üreme mevsimi boyunca erkek balıklar üreme stratejilerine ve fiziksel ortamlarına bağlı olarak birbirleriyle devamlı bir yarış halinde olduklarından, bu durum üreme mevsimi boyunca erkek damızlıklar tarafından farklı kalitede sperm üretilmesine neden olmaktadır (Tekin vd., 2003).

Normal alabalıklarda spermin SSP ile sulandırılması ile yapılan çalışmalarda en yüksek motiliteler pH 8,5 ve 9,0 değerlerinde elde edilmiştir. Ayrıca spermdeki pH değişimlerinden meydana gelen hasarı önlemek için sulandırıcı ortamı içerisine HEPES gibi organik bir tampon konulması gerekmektedir (Boitano ve Omoto, 1991; Miura vd., 1992). CD dişi alabalıklarda seminal plazma pH değeri ve SSP optimum pH değeri konusunda kısıtlı bilgiler bulunmaktadır (Kobayashi vd., 2004).

Seminal plazmadaki sperm ve protein derişimleri, ozmolarite değeri, antitripsin ve laktat dehidrogenaz aktiviteleri CD dişi ve normal erkek alabalıklarda değişiklik göstermektedir. Normal erkek alabalıklarda sayılan bu değerler azaldıkça yüzde sperm motilitesi artarken, erkekleştirilmiş dişi alabalıklarda bu değerler attıkça dölleme oranı artmaktadır. Seminal plazmanın bileşimi sperm alma sıklığına, mevsime, beslenme ve türlere göre de farklılık göstermektedir (Nynca vd., 2012; England ve Allen, 1991).

Salmonid türlerinde, sperm hücreleri laboratuvar şartlarında tamamen kendi seminal plazması içerisinde +4 °C civarında bir gün veya birkaç gün yaşayabilmektedir. Bu süre antibiyotikler ve oksijen ilave edilerek birkaç haftadan 1 aya kadar uzatılabilmektedir. Benzer sonuçlar orfoz ve sazan balıklarının spermleri için de

bildirilmiştir, fakat sperm kalitesinde geniş bir varyasyon söz konusudur (Billard vd., 1995). Seminal plazma, sperm motilitesini sağlayan veya kısıtlayan süreçle ilgili olarak çeşitli organik (trigliserit, gliserol, yağ asitleri ve glukoz v.b.) ve inorganik bileşikler (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} v.b.) içermektedir (Morisawa vd., 1983; Lahnsteiner vd., 1993). Tanimoto ve Morisawa'ya (1988) göre; seminal plazmada K^+ iyonunun fazla bulunması spermatozoanın hücre içi ATP enerjisini harcamalarına engel olarak testislerde motiliteyi inhibe etmektedir. Bu nedenle spermatozoanın dış ortamda su veya NaCl gibi çözeltiler ile sulandırılarak uyarılması gerekmektedir. Bu sulandırma sonucunda spermatozoanın membran yapısındaki değişimler sonucu K^+ iyonu seminal plazmada azalmakta ve hücre içi ATP enerjisinin kullanılmasıyla sperm hücresi aktif hale geçmektedir (Turner, 1986; Suquet, 1992; Geffen ve Evans, 2000). Seminal plazmadaki doğal antioksidanlar ve diğer faydalı bileşenler sperm fonksiyonları ve membran bütünlüğünün korunması için gerekli olan unsurlardır (Maxwell ve Johnson, 1999). Üreme sezonunda CD dişi alabalıkların seminal plazmasında normal erkeklere göre daha yüksek protein miktarı ve antitripsin aktivitesi bulunmuştur. Antitripsin aktivitesinin sperm hücrelerini ve üreme dokularını proteolitik saldırılardan korumada rol aldığı kabul edilmektedir (Wojtczak vd., 2007). Normal erkeklerle karşılaştırıldığında CD dişi alabalıklarda seminal plazma ozmotik basıncı daha yüksektir (Nynca vd., 2012). Seminal plazma iyon derişimine bakıldığında protein oranına benzer şekilde normal erkelere göre daha yüksek olduğu görölmüştür. Alabalıklarda testiküler spermde K^+ ve Mg^{2+} iyonlarının yoğunluğunun sperm kanalındakinden daha fazla olduğu belirlenmiştir. Seminal plazma iyon konsantrasyonun normal erkelere göre daha yüksek olması nedeniyle, spermin testisten ekstraksiyonu sırasında spermatozoa hücre içi iyonlarının değişebileceği belirtilmiştir (Billard vd., 1986). Bu CD dişi alabalıklarla N erkelerin iyon konsantrasyonun karşılaştırılması konusunda yeni çalışmalar yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Nynca vd., 2012a).

Morisawa ve Morisawa (1987), N erkek alabalıklarda seminal plazma Na^+ için 128,9 ila 144,7 mmol, K^+ için 32,5 ila 37,3 mmol, Ca^{2+} için 2,6 ila 3,2 mmol, Mg^{2+} için ise 1,0 ila 1,4 mmol elde etmişlerdir. Benzer şekilde, gökkuşağı alabalıklarında yapılan diğer bir çalışmaya göre Na^+ değerleri 110,0 mmol, K^+ değerleri 43,4 mmol, Ca^{2+} değerleri 2,1 mmol ve Mg^{2+} değerleri ise 2,5 mmol olarak bildirilmiştir (Billard vd., 1986).

Nynca vd. (2012a), yaptıkları çalışmada, 11 β -hidroksiandrosteron uygulaması ile elde edilen CD dişi gökkuşağı alabalıkları sperminin biyokimyasal (protein derişimi, ozmolarite değeri, antitripsin ve laktat dehidrogenaz aktiviteleri) ve fizyolojik (sperm motilite özellikleri) karakteristiklerini incelemişlerdir. CD dişilerin sperm derişimi, seminal plazmadaki protein derişimi, ozmolarite değeri, antitripsin aktivitesi ve laktat dehidrogenaz aktiviteleri gibi değerler, N erkek gökkuşağı alabalıklarından elde edilen değerlere kıyasla daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Spermin biyokimyasal parametrelerinin tespit edilmesi, sperm kalitesinin değerlendirilmesi açısından önemlidir. Azalan ozmolarite değerinin, spermin idrar ile kontaminasyonuna işaret ettiği gösterilmektedir (Gjerde, 1984). Diğer bir taraftan, yüksek ozmolarite değerleri, yetersiz hidrasyon ile ilgili spermin olgunlaşmasındaki bozuklukları yansıtabilmektedir. Protein derişimi ve antitripsin aktivitesi (APA) de ayrıca sperm kalitesinin indikatörüdür ve mevsimsel değişimler bu kompozisyona yansımaktadır (Munkittrick ve Moccia, 1987).

Gökkuşağı alabalığı seminal plazmasında bulunan antioksidan maddelerin de sperm motilitesi üzerine etkileri bulunmaktadır. Seminal plazmada, askorbik asit azlığı üreme sezonu boyunca sperm derişiminde ve motilitesinde ve dolayısıyla döllenme oranında azalmaya sebebiyet vermektedir. Bu durum, erkek gökkuşağı alabalığı üretiminde C vitamininin önemini göstermektedir (Ciereszko ve Dabrowski, 1995). Seminal plazmada, α -tokoferol, antioksidan enzimler ile ortak olarak çalışarak sperm hücrelerinin oksidatif ataklara karşı fonksiyonel yeterlilik kazanımını sağlar (Therond vd., 1996). Askorbik asit, α - tokoferol ve kuersetin gibi antioksidanlar, daha ziyade kriyoprezervasyon çalışmalarında kullanılmaktadır. Kuersetinin, dondurulmuş koç spermelerinde pozitif yönde etkisi olduğu belirlenmiştir (Silva vd., 2012). *Salmo trutta f. fario* türünde sulandırıcı ortamına eklenen, askorbik asit, karnitin ve karoten için en uygun derişim 0,5 mM, tokoferol için ise 2.0 mM olarak belirlenmiş ve bu dozların kontrol grubuna göre önemli derecede döllenme oranında fark yarattığı gösterilmiştir (Lahnsteiner vd., 2010). Genel olarak, seminal plazmadaki enzimatik aktivite spermin kalitesi, spermin döllenme kabiliyeti ve kriyoprezervasyonda kullanımı açısından ayırt edici özellik olmaktadır (Glogowski ve Strzeżek, 1981; Ciereszko vd., 1992). Laktat hidrojenaz (LDH) izoenzimleri, sperm hücresinin farklı bölümlerinde bulunmaktadır (Clausen, 1969) ve LDH aktivitesi hücre metabolizmasına enerji sağlanmasında önemli rol oynamaktadır

(Aydın vd., 1997). Sperm motilitesinde, canlılığında ve dölleme kabiliyetindeki azalma, spermhücreleri tarafından üretilen reaktif oksijen türleri (ROS) ile de ilişkilidir (Aitken ve Clarkson, 1989). Özellikle süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi enzimler ana proaktif enzimler olup, ROS oluşur olmaz bunları uzaklaştırmada bertaraf edici öğeler olarak hareket ederler (Martínez-Páramo vd., 2009). Alabalık sperm kriyoprezervasyon çalışmasında katalaz, süperoksit dismutaz, peroksidaz için en uygun derişimin 250 mM; indirgenmiş glutatyon, indirgenmiş metiyonin, okside glutatyon, metiyonin için ise 1,5 mM derişimlerinde spermatolojik kaliteyi arttırdığı bildirilmiştir (Lahnsteiner vd., 2011). Sonuç olarak, antioksidan maddelerin, CD dişi gökkuşağı alabalığı sperm olgunlaştırma çalışmalarında kullanımına yönelik çalışmalar bulunmamaktadır. CD dişi gökkuşağı alabalıkların ve normal alabalıkların protein profilleri arasında farklılık bulunduğu bilinmektedir (Kowalski vd., 2011). Antiproteinaz aktivite, seminal plazmanın biyokimyasal karakterizasyonunda belirleyici olmaktadır (Piros vd., 2002). Balık türüne göre özgül çeşitlerde olabilen seminal plazmadaki bu aktivite, protein ve sperm derişimiyle uyumluluk göstermektedir (Ciereszko vd., 2004).

CD dişi anaçların üretimde kullanılmasıyla hem kuluçkahanede üretim yönetimi planlanabilmekte, hem de stoklanması gereken anaç miktarı azaltılabilmektedir (Feist vd., 1995; Ninhaus-Silveira vd., 2006). Geffen ve Evans (2000), CD dişi anaçlardan elde edilen spermin kullanılmadan önce bir süre olgunlaştırma çözeltilerinde bekletilmesi gerektiğini, aksi halde olgunlaşmasını tamamlayamayan spermin yumurtaları dölleme kapasitesinin çok düşük olacağını ve bu durumun önemli ekonomik kayıplara yol açacağını bildirmişlerdir. Bu soruna çözüm olarak Billard ve Cosson (1986), senkronize bir şekilde spermatozoa motilitesi elde etmek için yüksek oranda sulandırma yapılması gerektiğini belirtmişlerdir. Ancak, Suquet vd. (1994), kalkan balığı sperminde sulandırma oranının artırılmasının spermatozoa motilitesini ve canlılık süresini azalttığını bildirmişlerdir. Pérez-Cereales vd. (2009), CD dişi alabalıklarda muhafaza esnasında sperm hücrelerinde oksidatif DNA hasarını ölçmek için yapmış oldukları çalışmada, sperm olgunlaşmasını sağlamak amacıyla 1:9 oranında (v:v) ticari maturasyon çözeltilisi kullanarak (Maturfish[®], IMV, Fransa) +4°C'de 2 saat havalandırma yapmışlardır. Çalışmalarında sadece seminal plazma ozmolaritesi 310-319 mOsm/kg, pH değeri 8,08-8,42 ve motilitesi %75-100 arasında

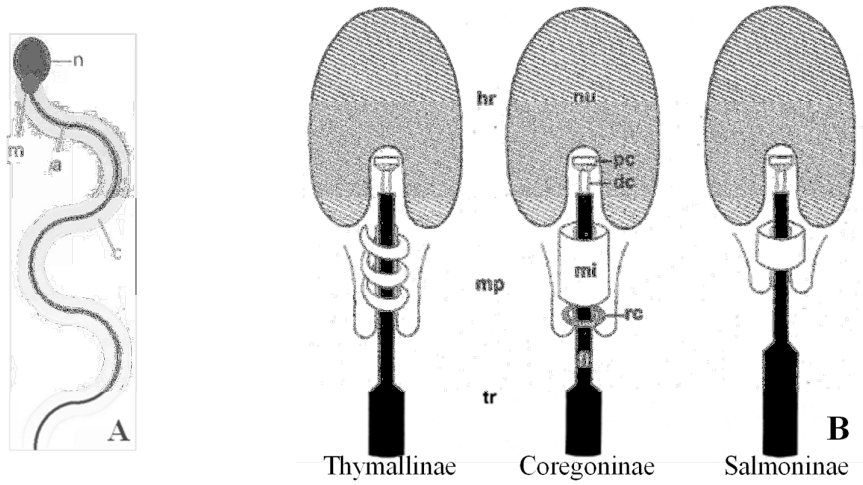
olan altı CD dişi birey kullanmışlardır. Robles vd. (2009), CD dişi alabalıklarda spermin dondurulması ile ilgili çalışmasında, sperm olgunlaşmasını teşvik etmek amacıyla 1:9 oranında (v:v) ticari maturasyon çözeltisi (Maturfish®, IMV, Fransa) ile sulandırma yapılmış ardından bu çözeltide +4°C’de 2 saat oksijen desteği ile bekletilmiştir. Bu çalışmada kışın alınan spermin baharda alınanlara göre motilite yüzdesi daha yüksek bulunmuştur. Vandeputte vd. (2002), üç sazan ırkının gelişimi ile ilgili çalışmalarında, sperm örneklerini ticari bir sulandırıcı (Maturfish®, IMV, Fransa) ile 1:2 oranında karıştırmışlar ve oksijen vererek +4°C’de 24 saat inkübasyondan sonra dölleme yapmışlardır. Ciereszko vd., (2015) metanol içeren suni seminal plazmada inkübe edilen, CD dişi sperm hücrelerinin daha hızlı olgunlaştığını göstermişlerdir. Sonuç olarak CD dişilerde testisten alınan sperm yüksek oranda olgunlaşmamış hücre içerdiğinden, öncelikle spermi *in vitro* ortamda bir olgunlaşma sürecine tabii tutmak gerekmektedir (Ciereszko vd., 2004; Robles vd., 2009).

1.3. Balık Spermi ve Seminal Plazması

Genel olarak Teleost balıklarda spermatozoit iki gruba ayrılarak incelenebilmektedir. Birinci grupta daha karmaşık yapıya sahip olan iç dölleme yapan balık türlerinde gözlenen sperm tipleri ve daha basit yapılı olup akuasperm olarak adlandırılan dış dölleme görülen türler de bulunmaktadır. Dış döllemede görev alan bu sperm tipi “akuasperm” olarak da adlandırılmaktadır (Şekil 1.2.). Spermatozoit, erkek haploit kromozomunu oosite nakletme fonksiyonu olan bir hücredir. Bir balık spermi, temel olarak baş, orta kısım ve kuyruk (flagellum) olmak üzere 3 kısımdan oluşmaktadır (Lahnsteiner ve Patzner 2007). Litik aktiviteye sahip olan baş kısım DNA materyalini taşımakta, spermatozoitin oosite girişini mümkün kılmaktadır. Baş kısmında Acipenseridae gibi bazı balık gruplarında katlanmış bir zar yapısı olan akrosom bulunmaktadır. Mitokondriler sperm hücresinin orta kısmında bulunmakta ve flagellumun hareketi için gerekli enerjiyi sağlamaktadır. Flagellum, spermatozoit hareketi için bir motor görevi yapmakta ve flagellumun baş kısmına ve orta kısma bağlandığı yer bazal bir yapı oluşturmaktadır. Hareketi sağlayan flagellum, içte mikro tübüllerden oluşan bir aksonem, sitoplazma ve zar kısımlarından oluşmaktadır.

Bu temel yapı dışında, sperm hücresinin şekli, hem Chondrichthyes'e hem de Osteichthyes'e ait taksonomik gruplara göre ve hatta aynı familyaya ait farklı türlerde, baş kısmı şekli, mitokondri sayısı, flagellumdaki filamentlerin dizilişi gibi bazı yapısal değişiklikler gösterirler (Casson, 1996; Mattei, 1991; Mattei vd., 1991).

Genelde tatlı su türleri olarak nehir ve göllerde yaşayan Salmonidae (alabalıkgiller) familyası türleri dış dölleme gösterirler. Familyanın, Thymallinae, Coregoninae ve Salmoninae olmak üzere 3 alt familyası bulunmaktadır (Froese ve Pauly, 2000). Üç alt grup içinde, sperm hücrelerinde bazı yapısal farklılıklar bulunmaktadır (Şekil 1.2.).



Şekil 1.2. Bir balık sperminin (akuasperm) genel yapısı (A) ve Salmonidae familyasına ait 3 altfamilyaya ait sperm şekilleri (B) (n:nükleus, m:mitakondri, a:aksonem, c:sitoplazma, dc:distal sentriyol, fl: flagellum, hr: baş kısmı, mi:mitakondri, mp: orta kısım, nu: nükleus, pc:proksimal sentriyol ,rc: sitoskeletal filament halkası, tr: kuyruk kısmı) (Cosson vd., 1999; Lahnsteiner ve Patzner 2007)

Bu familya, dünya çapında ticari değeri yüksek olan birçok balık türünü barındırmaktadır. Özellikle Salmoninae alt familyasında bulunan *Oncorhynchus*, *Salmo* ve *Salvelinus* cinsleri önemli kültür türleri içermektedir. Bu sebeple, üreme biyolojisi ve sperm yapısı ile ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Salmonidae familyası türleri tipik akuasperm özelliklerini taşımaktadır. Sperm hücreleri simetrik, nükleus oval ve çok ince sitoplazma ile sarılmıştır, akrosom bulunmaktadır. Tek flagellumlu sperm hücresinin baş kısmı 3 µm'den küçük, orta kısmı 0,40 µm'yi geçmemekte ve 1-6 arasında mitokondri içermektedir. Flagellum uzunluğu 30-40 µm arasında değişmektedir. Aksonemi oluşturan, bir çifti merkezde 9 çifti kenarlarda

toplam 10 çift mikrotübül bulunmaktadır (Billard, 1983; Lahnsteiner ve Patzner, 1991; Gwo vd., 1996; Lahnsteiner ve Mansour, 2004).

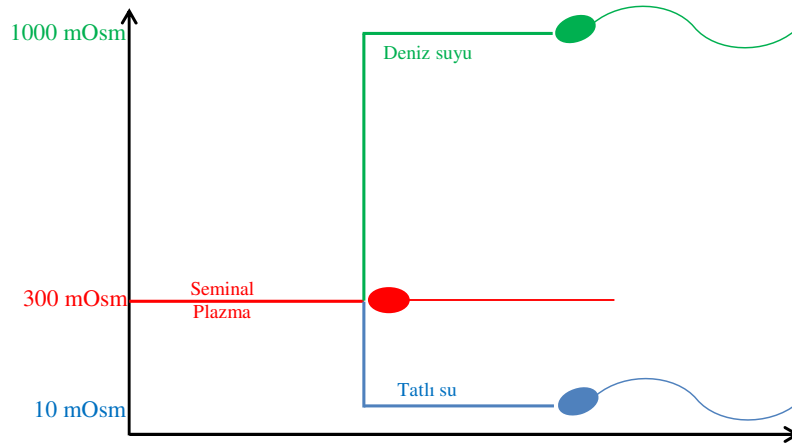
Sperm hücreleri, canlı vücudunda seminal plazma içerisinde saklanmaktadır. Sperm hücreleri ve seminal plazma bütünüyle semen olarak isimlendirilmektedir. Balıklarda seminal plazma özgün bir içeriğe sahiptir ve bu içeriği sayesinde sperm hücrelerini desteklemekte, spermin vücut içerisinde motil olmalarını engellemektedir. Seminal plazma içeriği, üreme sisteminin ve sperm hücrelerinin durumlarından etkilenmektedir. Bir başka deyişle, üreme sistemi ve sperm hücreleri salgıları seminal plazma içeriğini etkilemektedir. Seminal plazmanın gerek içeriği gerekse fizikokimyasal özellikleri balık gruplarına göre değişiklik göstermektedir (Ciereszko vd., 2000; Cabrita vd., 2009). Seminal plazmadaki iyon bileşimi, kan ve boşaltım sıvısındaki değerlerine göre daha düşüktür.

1.3.1. Balıklarda sperm motilitesi ve etkileyen parametreler

Tüm Metazoan canlılar tarafından birçok farklı tipte üretilen sperm hücreleri, organizmadaki diğer hücelere kıyasla benzersizdir. Özellikle dış döllenme görülen türlerde, sperm hücreleri doğal olarak tatlı su, acı su veya deniz suyu gibi kendi ortamlarına (içinde bulundukları üreme sistemine) göre son derece farklı bir ortama bırakılmaktadır (Cosson, 2004). Kısa süren motilite süreleri (Billard ve Cosson, 1992) ve motilitenin başlama mekanizması (Morisawa, 1985; Cosson vd., 1995) gibi özellikleri ile balık sperm hücreleri, diğer canlı gruplarındaki sperm hücrelerine göre farklılıklar oluşturmaktadır. Sürüngeçenler ve memelilerdeki durumun aksine, çoğu balık türünde, sperm hücreleri, testislerde (veya seminal plazmada) motil olmamaktadır (Stoss, 1983; Krasznai vd., 1995). Motilitenin önlenbilmesinde, seminal plazmanın ozmolaritesi ve iyon bileşimi temel etkenleri oluşturmaktadır (Billard, 1986). Doğal üreme koşullarında, motilite sperm hücrelerinin erkek genital kanallarından, iyonlar gibi suda çözünen bileşenlerin bulunduğu sucul ortama aktarılmasından sonra tetiklenmektedir. Deneysel çalışmalarda ise, sperm hücreleri seminal plazma gibi motilitenin başlamasına engelleyici olan bir çözeltide (suni seminal plazma) saklanabilmekte ve motilite çeşitli uygun çözeltiler (aktivasyon çözeltisi) ve spermin seyreltilmesi ile başlatılabilmektedir (Morisawa vd., 1983; Cosson, 2004). Sperm hücreleri motiliteyi başlatma özelliğinde olan bir ortamla

karşılaştığında, yüzde motil hücre oranı, motilitenin süresi gibi motilite karakteristikleri, bu ortamda bulunan iyonların (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} gibi) derişimlerinden, ozmolarite ve pH değerlerinden direkt olarak etkilenmektedir. Bu değişkenler sonucunda, aktivasyon çözeltisinde sperm hücre zarı depolarizasyona uğramakta, flagellar motilite başlamakta ve bu da sperm hücresinin hareketini sağlamaktadır (Morisawa ve Suzuki, 1980). Motilitenin aktive edilmesinden sonra motilitenin süresi ve doğrusal olarak hareketi, aktive edildiği ortamdaki iyonların yoğunluğu, ozmotik basınç, pH değeri, sıcaklık, seyrelme oranları gibi birçok parametreye bağlı olarak değişmektedir (Stoss, 1983; Cosson vd., 1999; Cosson, 2004).

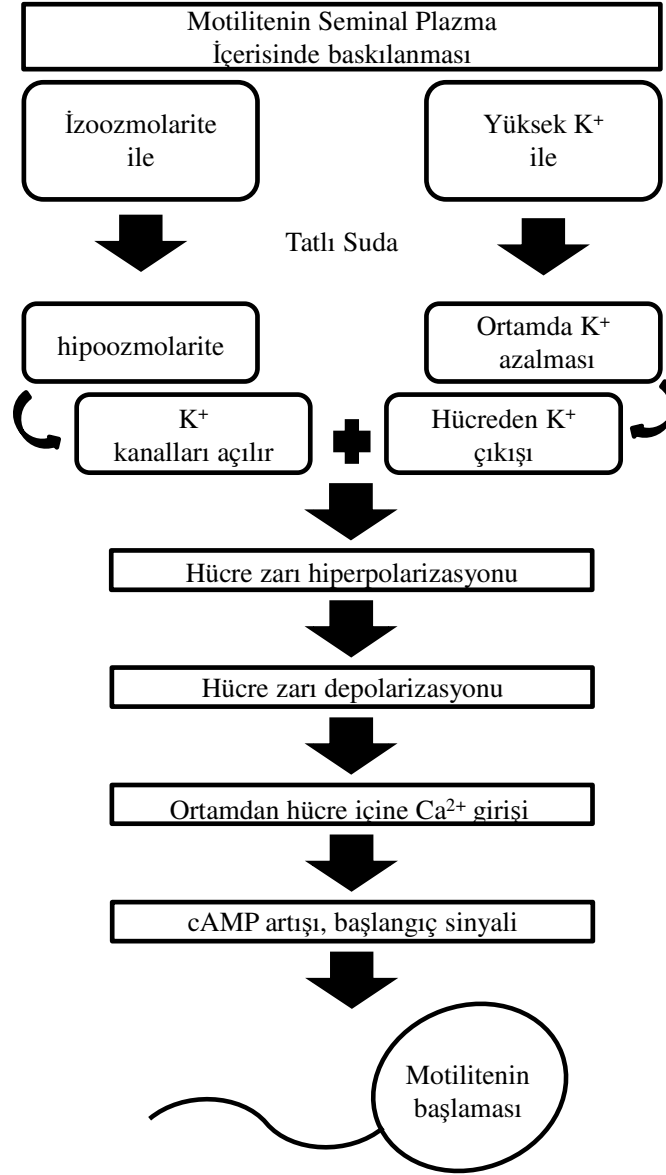
Temel olarak deniz ve tatlı su balıklarının sperm motilitesinin aktive olma mekanizmaları benzerlikler gösterse de (Cosson vd., 2008), aktive olma nedeni birbirinin tam tersidir. Genel olarak çalışılan balık türlerinde, seminal plazma ozmolaritesi 300 mOsm/kg civarındadır. İyon bileşimi ve diğer unsurlar bir kenara bırakılırsa, aktivasyonun başlaması için deniz balığı türlerinde, aktivasyon ortamının ozmolarite değerinin 1000 mOsm/kg olması, tatlı su balıklarında ise genel olarak 300 mOsm/kg değerinin altında olması gerekmektedir (Dreanno vd., 1999). Diğer bir deyişle, sperm hücrelerinin motilitesinin başlaması deniz balığı türleri için hiperozmotik şok ile, tatlı su balığı türleri için ise hipoozmotik şok ile ilişkilendirilmektedir (Şekil 1.3.).



Şekil 1.3. Tatlı su deniz balıklarında sperm motilitesinin ozmolarite ile başlaması (Dreanno vd., 1999'dan değiştirilerek)

Tatlı su balıklarında, özellikle ticari önemi olan kültür türlerini içermeleri sebebiyle Acipenseridae (mersinbalığıgiller), Cyprinidae (sazangiller) ve Salmonidae familyalarına ait türlerde çalışmalar yoğunlaşmıştır (Alavi ve Cosson, 2006). Motilite kontrolünde, genel olarak bazı parametreler öne çıkmaktadır. K^+ derişimi, ozmolarite ile birlikte Salmonidae (Baynes vd., 1981; Billard, 1983a; Stoss, 1983) ve Acipenseridae (Cosson ve Linhart, 1996; Toth vd., 1997) familyalarına ait türlerde en önemli etken olmaktadır. Buna karşın ozmolarite, Cyprinidae türlerinde sperm aktivasyonu için daha büyük öneme sahip olmaktadır (Morisawa, 1985; Takai ve Morisawa, 1995; Krasznai vd., 2003). Genelde, motilitenin başladığı anda, sperm hücresi içerisine Ca^{2+} iyonları girmekte, Na^+ ve K^+ iyonları ise hücre dışına çıkmaktadır. Hücre zarındaki özgül iyon kanalları yoluyla olan bu iyon değişimleri zar potansiyelini değiştirmekte ve sonuçta sperm hücresi içinde cAMP (siklik adenzin monofosfat) derişimi artmaktadır (Şekil 1.4.). cAMP derişimindeki bu artış sperm motilitesi için bir başlangıç sinyali oluşturmaktadır (Krasznai vd., 1999).

Salmonidae türlerinde, özellikle üretimin arttırılması hedefiyle iyonların, motilitenin başlamasına etkisini açıklamaya ve motilite süresinin uzatılmasını amaçlayan çalışmalar mevcuttur (Gatti vd., 1990; Boitano ve Omoto 1992; Lahnsteiner vd., 1998). Yüksek K^+ iyonu derişimi, alabalık sperm motilitesini ve dolayısıyla dölleme yeteneğini inhibe etmektedir (Kusa, 1950; Benau ve Turner, 1980). Gökkuşığı alabalığında 20-40 mM K^+ iyonu derişiminin motiliteyi durdurduğu gözlenmiştir (Morisawa vd., 1983; Cosson vd.,1989).



Şekil 1.4. Tatlı su balığında (*Cyprinus carpio*) sperm motilitesinin başlama mekanizması yolu (Krasznai vd., 1999'dan değiştirilerek)

Salmonoid türlerinde semenin, uygun miktarda K^+ derişimi ve ozmotik basıncı ayarlanmış çözeltiler ile sulandırılması motilitenin başlamasına olanak vermemektedir (Billard ve Cosson, 1992). Ancak, seminal plazmaya göre izotonik NaCl çözeltisi motilite aktivasyonunu tetikleyebilmektedir. K^+ iyonun hücre zarından geçişi ile hücre zarının hiperpolarizasyonu, Salmonoid türleri sperminin motilitesinde öncül olmaktadır (Kho vd., 2001). K^+ derişiminin bu motiliteyi engelleyici etkisi +2 değerlikli iyonların, özellikle Ca^{2+} iyonların, ortamda bulunması ile antagonistik

etkiye sahiptir. Başka bir deyişle, K^+ derişiminin motiliteyi engellemesi, bir orana kadar Ca^{2+} iyonlarının ortamda bulunması ile önlenebilmektedir (Billard ve Cosson, 1992). Ca^{2+} iyonunun, K^+ derişiminin motilite üzerine olumsuz etkisini azaltması dışında, başka önemli bir özelliği de motilite başladığı anda sperm hücresi içerisinde Ca^{2+} derişiminin artmasıdır (Billard vd., 1989; Cosson vd., 1989). Hücre dışı ortamda Ca^{2+} iyonlarının bulunması motilitenin başlaması için gerekmektedir (Christen vd., 1987; Cosson vd., 1989). Hücre zarında Ca^{2+} geçişi ile ilgili kanallarının bloke edilmesinin, motilitenin başlamasını direkt olarak engellediği deneysel olarak gösterilmiştir (Tanimoto vd., 1994). Ayrıca, Ca^{2+} iyonlarının hücre içi ile dışı arasındaki yer değıştirmesi, hücre içinde üretilen ve harcanan ATP seviyesini etkilemektedir (Christen vd., 1987). Diğer yandan, seminal plazmada miktar olarak en fazla bulunan iyon Na^+ iyonudur. Seminal plazmaya, Na^+/K^+ oranı 16/1 veya daha yüksek olacak şekilde NaCl eklendiğinde motilite başlamaktadır (Stoss vd., 1977; Baynes vd., 1981). Hücre içinden dışına Na^+ iyonlarının çıkışını ATP derişimini etkilemektedir (Christen vd., 1987). Balık üreme sistemindeki Na^+ , K^+ ve Ca^{2+} iyonları derişimleri ve birbirlerine oranları progesteron gibi steroid hormonların ve gonadotropin gibi hormonların mekanizmaları ile kontrol edilir (Blackmore vd., 1990; Blackmore ve Lattanzio, 1991; Marshall vd., 1993).

Bahsedilen iyonlar dışında, sıcaklığın da sperm hızına, motilite süresine ve dölleme kabiliyetine, spermin aktive olduğu ortamın sıcaklığının etkisi bulunmaktadır (Stoss, 1983; Williot vd., 2000). Genel olarak, enerji kaynağı sayılı olarak hücre içindeki mitokondrilere bağlı olan sperm hücresinin, aktive olduğu ortamda sıcaklık artar ise hızı artmakta ve böylelikle daha kısa bir motilite süresine sahip olmaktadır. Ortamın sıcaklığında düşüş olur ise motilite süresinde uzama olabilmekte ancak sperm hücresinin hızında azalma görülmektedir (Ginzburg, 1968; Stoss, 1983). Örneğin *Salmo trutta m. lacustris* türünde $+3^{\circ}C$ 'de doğrusal motilite 63 s sürerken, $+9^{\circ}C$ 'de 40 s kadar sürdüğü gösterilmiştir (Ginzburg, 1968). Benzer şekilde, *Salmo trutta fario* türünde sıcaklığın toplam motilite süresini ve doğrusal motilite süresini önemli derece etkidiği saptanmıştır (Schlenk ve Kahmann, 1938). Genel bir değerlendirme olarak, pH değıerinin balık sperm motilitesinin aktivasyonu üzerine etkisi diğer parametrelere kıyasla minimum olmaktadır (Alavi ve Cosson, 2005). Ayrıca, balık üreme sistemindeki ortamın pH değıerinin, sperm hücresinin olgunlaşmasında önemli etkisi bulunmaktadır (Miura vd., 1991; Yaron, 1995). Fizyolojik pH aralığında, pH

değerlerinin sperm motilitesinin başlamasına engel olmadığı saptanmıştır. pH 7,8 değerinin altında aktivasyon çözeltisinde Ca^{2+} ve Mg^{2+} iyonları bulunması, pH değerinin motilite üzerindeki olumsuz etkisini azalttığı saptanmıştır (Baynes vd., 1981; Billard ve Cosson 1992). Buna karşın, seminal plasma ve ovaryum sıvısı ile benzer veya daha yüksek alkalın pH değerlerinin özellikle Salmonoid türleri için sperm motilitesine pozitif etkisi gözlenmektedir (Billard, 1986). İyon dengesi göz önüne alındığında asidik suların pH değerinin, motilitenin başlamasına engel olmadığı ancak motilite karakteristiklerini (özellikle sperm hücresinin hareket süresinde bir azalma olmasına) etkilediği bilinmektedir. Salmonidae türlerinde seminal plazma pH değeri 7,5-8,5 aralığında ölçülmektedir. Bununla birlikte, seminal plazmanın pH değerinin 8,0-8,2 aralığında olduğu sperm örneklerinin dölleme için en uygun olduğu gösterilmiştir (Lahnsteiner vd., 1998). Ayrıca, gökkuşağı alabalığında en yüksek sperm motilite değerleri için, 5-21°C aralığında uygun çözelti pH değerinin 9,0 olduğu saptanmıştır (Billard ve Cosson, 1988).

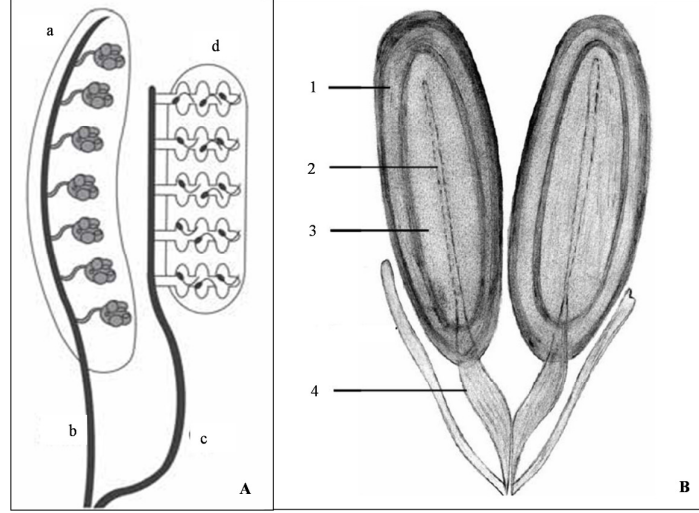
1.3.2. Balıklarda erkek üreme sistemi ve gonadın yapısı

Toplam balık türü sayısının 30,000'in üzerinde olduğu (Froese ve Pauly, 2000) ve her yıl ortalama 200 balık türünün yeni kayıt (Eschmeyer, 1998) olarak tayin edildiği belinmektedir. Balıklardaki tür çeşitliliği, üreme sistemlerindeki farklılıklara da yansımaktadır. Öyle ki, iç veya dış dölleme, ayrı eşeylilik veya çift eşeylilik gibi üreme stratejileri ve şekilleri gözlenmektedir ve bu durumlar üreme sistemine hem anatomik hem de fizyolojik olarak yansımaktadır (Moyle ve Cech, 2004). Ancak genel olarak, üreme sisteminin biyolojisi merkezi sinir sistemi, hipofiz bezi ve gonadlar arasındaki etkileşim içerisinde incelenebilmektedir. Yüzyılın başından itibaren, balık üretme teknolojisinin gelişimi ile erkek üreme sistemi ve sperm oluşumunun kontrol edilebilir olması üzerine çalışmalar artmıştır. Bazen balıkların üretilmesi gerektiğinde nadir olarak bulunması, erkek ve dişiler arasındaki gamet vermede eşleme farklılıkları, genetik olarak iyi ırkı seçme, biyoteknolojik çalışmalar, sperm muhafaza teknikleri gibi konular balık üreme biyolojisi çalışmalarını tetiklemiştir (Vizziano vd., 2008).

Balıklarda, özellikle Teleost balıklarda, testislerin oluşumu primordiyal kök hücrelerin (PGCs) biyo-işaretçiler ile zigottan yetişkin forma kadar takip edilmesi ile

ortaya konmuştur (Timmermans, 1996; Sasado vd., 2004). Genel olarak, erkek cinsiyeti heterozigot (XY) veya homozigot (WW) cinsiyet kromozomları ile veya daha kompleks genetik farklılıklar ile tayin edilmektedir (Devlin ve Nagahama, 2002). Gelişmiş bir testis genelde çift halde vücudun iki yanında uzamış bir halde ve fibör bir kılıf içerisinde bulunmaktadır. Bazı tropikal türler hariç, Teleost balıklarda, testisin morfolojisi, rengi ve özellikle boyutu yıllık üreme döngüsü içinde değişimler göstermekte, genel olarak da balığın olgunlaşma durumu hakkında bilgi vermektedir. Salmonid türlerinde, testis ağırlığının vücut ağırlığına oranı (gonadosomatik indeks) % 0,05'ten küçük olması erkek balığın henüz olgunlaşmadığını göstermektedir (Billard, 1986).

Şekil 1.5.'te Teleost balıklarında ürogenital sistemi ve balıklarda üreme sisteminin yardımcı organlarının boyuna kesitte şematik gösterimi sunulmuştur (Alavi vd., 2008; Lahnsteiner ve Patzner, 2009). Teleost balık türlerinde genital sistem, böbrek sisteminden tamamıyla ayrılmıştır. Testiküler ana kanallar, testis sonunda itibaren spermatik kanallar olarak isimlendirilerek devam etmektedir. Çift olan sperm kanalları genital papillaya doğru ilerlemektedir. Sperm kanalları, genital papillaya ulaşmadan önce, ürogenital papillaya açılan tek kanallı bir yapı oluşturarak birleşmektedir. Testisteki bu götürücü kanal sistemi sırasıyla testiküler götürücü kanalları, testiküler ana kanalları ve sperm kanallarından oluşmaktadır. Özellikle Salmonid türlerinde testiküler götürücü kanallar tanımlanmıştır. Bu kanallar, testisteki seminifer kanallar (sperm kanalcıkları) ile testiküler ana kanalları arasında bir geçiş oluşmasını sağlamaktadır (Lahnsteiner vd., 1993; Lahnsteiner, 2003). Testiküler götürücü kanalların epitel hücrelerinin, üreme sezonunda farklılaşan Sertoli hücrelerinin değişimi ile oluştukları kabul edilmektedir (Grier vd., 1980).

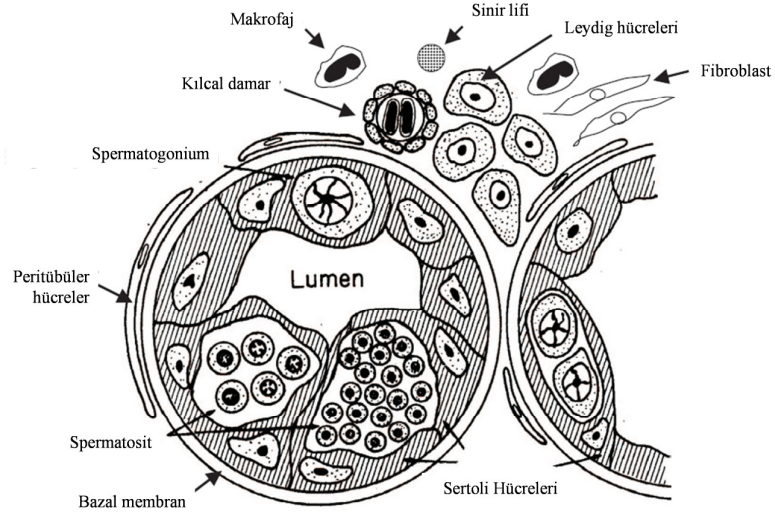


Şekil 1.5. Teleost balıklarda ürogenital sistem (A) ve balıklarda üreme sisteminin yardımcı organlarının boyuna kesitte şematik gösterimi (B). a: Böbrek, b: Wolffian kanalı, c: Sperm kanalı, d: Testis, 1: Testis, 2: Testiküler ana kanal, 3: Testiküler bez, 4: Sperm kanalı, (Alavi vd., 2008 ve Lahnsteiner ve Patzner, 2009'dan değiştirilerek)

Teleost balıklarda testisin bölümleri enine kesitinde, Sertoli hücrelerince şekillendirilen spermatositler lümen çevresinde oluşumları Şekil 1.6.'da gösterilmiştir (Billard vd., 1982). Sertoli hücreleri geliştirmekte olan sperm hücresinin desteklenmesini ve beslenmesini sağlamakta, hipofizden salgılanan FSH (folikül stimülan hormon) reseptörleri sayesinde algılayarak spermatogenezin uyarılmasını sağlamaktadır. Leydig hücreleri ise, hipofiz kaynaklı LH (lütinizan hormonu) reseptörleri sayesinde uyarılmakta ve testosteron üretmektedir (Chung vd., 2010). Ancak belirtmelidir ki, bu tanımlanan hücrelerin isimlendirmelerinde ve balık spermatogenezindeki etkileşimleri hakkında çeşitli tartışmalar bulunmaktadır (Alavi vd., 2007).

Testiküler ana kanallar ve sperm kanalları benzer histolojik yapıya sahiptir. Testiküler ana kanalların sperm hücrelerinin beslenmesi, depolanması, steroid sentezi, protein ve enzimlerin salgılanması, seminal plazmanın oluşturulması gibi görevleri bulunmaktadır. Salmonid türlerinde sperm kanalları morfolojik farklılıklar göstermesine karşın histokimyasal yapıları benzerlik göstermektedir. Sperm kanallarının fizyolojik fonksiyonları, spermatositlerin farklılaşması, sperm hücrelerinin depo edilmesi, monosakkarit, lipid, protein ve enzim salgılanması, steroid sentezi, seminal plazmanın iyon bileşiminin düzenlenmesi, nekrotik sperm hücrelerinin emilmesi ve lizisi olarak belirlenmiştir (Lahnsteiner vd., 1994a;1994b; Koldras vd.,

1996; Alavi vd., 2007). Sonuçta her bir sperm hücresi testiste oluşumundan, sperm kanalları ile genital papillaya ulaşmaya kadar olgunlaşmakta, motilite ve dölleme yeteneği kazanmaktadır. Sperm hücresinin olgunlaşması spermatogenez sürecinin son safhası olarak değerlendirilmektedir (Dzyuba vd., 2014).



Şekil 1.6. Teleost balıklarda testisin bölümleri (Billard vd., 1982)

Özellikle sperm kanallarının, sperm hücresinin olgunlaşmasında, diğer bir deyişle motil olabilecek hale gelmesinde önemli yeri bulunmaktadır. Sperm kanalı içinde, seminal plazma pH 7,5 değerinden 8,0'a yükselmekte ve sperm hücresi içerisinde cAMP miktarı 2 katına çıkmaktadır (Yaron, 1995). Miura vd. (1991) ve Nagahama (1994), sperm motilitesinin kazanımını endokrinolojik olarak açıklamaya çalışmışlardır. Hipofizden salgılanan gonotropin testisteki hücrelerin 17α -hidroksiprogesteron salgılanmasını teşvik etmekte, bu hormonda sperm hücresinde $17\alpha,20\beta$ -dihidroksi-4-pregnen-3-on ($17\alpha,20\beta$ -DP) olarak tanımlanmış hormonun üretimine sebep olmaktadır. Bu hormon sperm kanalındaki pH değerini yükseltmekte ve sonrasında hücre içindeki cAMP miktarı arttırmaktadır. Böylelikle sperm motilitesi aktif edilmeye uygun hale gelmektedir. $17\alpha,20\beta$ -DP hormonu Salmonidae türlerinde oositin olgunlaşmasında rol almaktadır. Düşünülenin aksine, spermin olgunlaşmasında, Teleost balıklardaki iki önemli androjen olan testosteron ve 11-ketotestosteron hormonlarının, sperm olgunlaşmasında etkisi olmadığı gözlenmiştir (Nagahama vd., 1983).

1.3.3. Balık sperminin kısa ve uzun süreli muhafazası

Genel olarak sperm muhafazası *in vivo* olarak canlı vücudunda ve *in vitro* olarak belirli sıcaklıkta ve iyonik içerikte semenin SSP ile sulandırılmasıyla gerçekleşmektedir. *In vivo* muhafaza, sperm hücrelerinin testiste oluştuktan sonra üreme kanallarında tutulmasını sağlayan fizyolojik bir süreçtir (Shaliutina, 2013). *In vivo* muhafaza, sadece erkek üreme kanallarında değil, *Xiphophorus maculatus* (Poeciliidae, canlı doğuranlar), *Alcichthys alcicornis* (Cottidae, iskorpitgiller) gibi bazı türlerin dişilerinin üreme kanalları içinde aylarca tutulabilmektedir (Holt ve Lloyd, 2010). Buna karşın, balıkların genelinde, sperm hücreleri erkek üreme kanallarında muhafaza edilmektedir. Örneğin sazan balığı türünde, uygun şartlarda gonadlarda yıl boyunca sperm hücreleri bulunabilmektedir (Koldras vd., 1990). *Oncorhynchus mykiss* türünde, normal şartlarda sperm hücreleri sonbahar ve kış aylarında gonadlarda bulunur (Billard vd., 1983). Üreme sistemi yardımcı organları, özellikle sperm kanalları sperm hücrelerinin motilite karakteristiklerinin korunarak depo edilmesini sağlamaktadır.

Sperm hücrelerinin *in vitro* muhafazası, fizyolojik olmayan bir süreçtir ve temel olarak sperm hücrelerinin işlevselliğini koruyarak muhafazasını amaçlamaktadır. Akuakültürde, *in vitro* sperm muhafazası çok çeşitli şekillerde ve yaygın olarak kullanılmaktadır. Genel olarak, kısa ve uzun süreli muhafaza olarak ayrılabilir. McNiven vd. (1993), kısa süreli muhafazayı, donma sıcaklığı üzerinde bir sıcaklıkta semenin suni döllemeye hazır halde tutulması olarak tanımlamaktadır. Kısa süreli muhafaza, gametlerin saklanması açısından akuakültürde en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Uygulaması basittir, temelinde sadece bir buzdolabı ve uygun bir SSP (veya sulandırma çözeltisi) yeterli olmaktadır. Kısa süreli muhafaza, üreme sezonu süresince anaç kullanımını ve iş yükünü azaltmaktadır (Kowalski vd., 2014). Erkek ve dişi anaçlardan gamet elde edilmesinde senkronizasyon sağlanamadığında sperm hücrelerinin hali hazırda saklanmasına imkan sağlamaktadır. Örneğin, Salmonoid türlerinde, dişi anaçlardan yumurta alınması, erkek anaçlardan sperm alınmasından sonra gerçekleşebilmektedir (Scott ve Baynes, 1980). Bu durumda semenin uygun ortamda belli bir süre saklanması gerekmektedir. Saf oksijenli ortamda uygun sulandırma çözeltisi ile sulandırılan *O. mykiss* semenin, örneklendikten 34 gün sonrasında dahi dölleme kabiliyetinde olduğu

gösterilmiştir (Stoss ve Holtz, 1983). Benzer şekilde, +4°C’de O₂ sirkülasyonunda tutulan *O. mykiss* sperm hücrelerinin, 5 gün sonra ilk alındıklarındaki kadar dölleme kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir (Billard, 1981). Kullanılan sulandırma çözeltisinin, uygulanacak türün özelliklere uygun pH ve ozmolarite değerlerine ve iyon bileşimine sahip olması gerekmektedir. Bakteriyal ve fungal kontaminasyonları engellemek amacıyla streptomisin, gentamisin, penisilin gibi çeşitli antibiyotikler, çözeltideki oksidatif stresi engellemek için A ve C vitaminleri gibi çeşitli antioksidanlar, sperm hücrelerini desteklemesi için proteinler sulandırma çözeltisine ilave edilebilmektedir (Gwo vd., 2009; Ubilla ve Valdebenito, 2011). Genel olarak, uygun sulandırma çözeltisi ile belli oranda sulandırılarak soğukta saklanan sperm hücrelerinin motilite ve dölleme yüzdelinde iyileşme gözlenmektedir (Stoss, 1983; McNiven vd., 1993). Semen sulandırmada kullanılan bu çözeltiler, hücre ve mitokondri zarlarının oksidasyonunu engellemekte, hücrenin enerji sağlamasına yol açmakta ve sperm hücrelerinin sabit pH ve ozmolarite değerlerinde olan bir ortamda kalmalarını desteklemektedir (Morisawa ve Suzuki, 1980; Morisawa vd., 1983; Batellier vd., 2001). Saklama sıcaklığı, sperm hücresinin metabolizmasının yavaşlamasını sağlayan önemli bir etkidir. Kısa süreli muhafazada ilk akla gelen sıcaklık +4°C’dir, ancak genelde saklama sıcaklığı 3-15°C arasında değişmektedir (Jensen ve Alderdice, 1984). 0°C saklama koşulu olarak kullanılabilir (Stoss ve Refstie, 1983).

Kısa süreli muhafaza, balık sperm hücreleri olgunlaştırma çalışmaları ile örtüşmekte ve kapsamaktadır. Sperm kanallarında sonlanan sperm hücresinin olgunlaşması süreci, CD gökkuşağı alabalığı, çuka balığı (*Acipenser ruthenus*) gibi türlerde çeşitli nedenler ile testiküler semenin kullanılması gerektiğinde tamamlanamamaktadır. Olgunlaşmasını tamamlayamayan sperm hücreleri, düşük motilite karakteristiklerine sahip olmakta ve sonucunda yumurtayı dölleme kapasiteleri azalmaktadır. Bu durumda, semenin uygun bir sulandırma çözelti ile belli oranda sulandırılması ve belli bir süre sonunda *in vitro* olarak sperm hücrelerinin olgunlaşması kısmi olarak sağlanabilmektedir (Geffen ve Evans, 2000; Dzyuba vd., 2014).

Uzun süreli muhafaza (kriyoprezervasyon), sperm hücrelerinin canlılığını kaybetmeden kademeli olarak kuru buz (-78°C) ve özellikle sıvı azot içinde (-196°C) saklanmasını ifade etmektedir. Kriyoprezervasyon, içerdiği dondurma ve çözündürme

işlemleri sonucunda sperm hücrelerinin motilite karakteristiklerini koruduğu ölçüde başarılı sayılmaktadır. Çalışılan türe uygun bir dondurma çözeltisi seçilerek ve sperm hücrelerinin soğuk şoka dirençli olabilecekleri bir ortam hazırlanmaktadır. Bu dondurma çözeltisinin seçimi, kriyoprezervasyon işleminin başarısında oldukça önemlidir (Chao ve Liao, 2001). Dondurma çözeltisi genel olarak, seminal plazma iyon bileşimi benzeri bir sulandırma çözeltisi; dimetil sülfoksit ve metanol gibi dondurma ve çözünme işlemlerinde koruyucu etkili bir madde, yumurta sarısı gibi hücre zarının yüzeyini donma süreci boyunca dengede tutacak bir stabilizatörden oluşmaktadır (Cloud ve Patton, 2009). Bunların dışında kriyoprezervasyon işlemini en uygun hale getirmek ve geliştirmek için, süt (Chao vd., 1987; Foote vd., 2002), bal (Chao ve Liao, 2001) ve propolis (Castilho vd., 2009; Öğretmen vd., 2014b) gibi bazı katkı maddeleri de bu ortama ilave edilebilmektedir. Tüm bu bileşenlerin dışında, C ve E vitaminleri gibi bazı antioksidan vitaminlerin (Hu vd., 2010; Martínez-Páramo vd., 2012) ve taurin, hipotaurin, L-glutamin gibi amino asitlerin (Mercado vd., 2009; Cabrita vd., 2011;) kriyoprezervasyon üzerine etkileri son yıllarda çalışılmıştır. Temel olarak, eklenen bu maddelerin dondurma ve çözündürme süreçlerinde, sperm hücrelerinden kaynaklı reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu engelledikleri düşünülmektedir (Alvarez ve Storey, 1992). Uygun şartlarda kriyoprezervasyon işlemi uygulanmış bir semen örneğinin teorik olarak yıllarca saklanabilmektedir (Lubzens vd., 1997).

Blaxter (1953), ilk kez ringa balığı (*Clupea harengus*) sperm hücrelerinin kriyoprezervasyonunu başarılı bir şekilde gerçekleştirmiştir. Günümüze kadar 200'den fazla balık türünde kriyoprezervasyon uygulaması yapılmıştır (Billard vd., 1995). Kriyoprezervasyon çalışmalarının temelinde, hem kültür hem de nesli tehlikede olan türler için genetik çeşitliğin kontrol edilebilmesini amaçlayan, kriyoprezervasyon uygulanmış sperm hücrelerinin saklandığı bir kriyo-banka oluşturma hedefi bulunmaktadır (Lubzens vd., 1997). Kanada'nın İngiliz Kolumbiyası'nda ve Norveç'te Salmonoid türleri için bu tip bankaların oluşturulması söz konusudur (Harvey, 1998). Ancak, dondurulmuş semen akukültür endüstrisinde yaygın olarak kullanılmamaktadır. Yöntemin çeşitli gereçler içermesi, maliyetinin fazla olması, uygulamayı yapacak tecrübenin azlığı kullanımı azaltan sebeplerdir. Bunların yanı sıra, kriyoprezervasyon işleminde sperm hücrelerinin uç koşullarda saklanması, uygulanan metotların farklılıkları, kullanılan sperm hücrelerin motilite

kaliteleri ve donmaya karşı farklı direnç dereceleri göstermeleri gibi sebepler yöntemin yaygın kullanımına engel teşkil etmektedir (Rana, 1995). Kriyoprezervasyon uygulamasında hem dondurmada hem de çözünme esnasında sperm hücreleri zarar görebilmektedir. En yaygın iki hasar nedeni, özellikle sıcaklığın 0 °C'den -40°C'ye düşürülmesinde ısı kaybında ve dondurmada koruyucu olarak kullanılan maddelerin (dimetil sülfoksit, metanol gibi) toksik etkisidir. Bunların dışında, pH değişimi, soğuk şok, buz kristallerinin oluşumu, ozmolarite etkisi gibi sebepler ile sperm hücreleri zarar görebilmekte ve sonuçta çözünme sonrasında motilite karakteristiklerinde azalma saptanmaktadır (Chao ve Liao, 2001).

1.3.4. Balık seminal plazma içeriği ve oksidatif yapısı

Seminal plazma, testis ve sperm kanallarının bir ürünüdür. Temel amacı, sperm hücrelerinin depo edilmesinde uygun şartları sağlamaktır. Bu depolama sırasında, sperm hücrelerinin dölleme kabiliyetine olumsuz etki edebilecek olan sperm hücresinin canlılığında ve motilite karakteristiklerinde oluşabilecek herhangi bir bozulma seminal plazma sayesinde engellenmektedir (Ciereszko, 2007). Seminal plazmanın, sperm hücresinin canlılığını uygun şekilde kontrolünde özellikle, özgün ozmolarite değeri, iyon bileşimi ve motiliteye engel olan proteinlerin önemli yeri bulunmaktadır. Ayrıca, seminal plazma sayesinde sperm metabolizması için gerekli besin sağlanmakta ve proteolitik ve oksidatif etkilere karşı sperm hücreleri korunmaktadır. Seminal plazmanın sperm hücrelerinin son olgunlaşma safhası üzerinde kontrol ve düzenleme etkisi de bulunmaktadır. Özellikle son yıllarda, seminal plazmanın sperm hücrelerinin olgunlaşması üzerine olan biyolojik rolüne dikkat çekilmektedir (Morisawa ve Morisawa, 1988; Alavi ve Cosson, 2005; 2006). Alavi vd. (2007), seminal plazma çalışmalarının üreme biyolojisi ve akaukültür çalışmalarında çok büyük önem teşkil ettiğini belirtmişlerdir. Öncelikli olarak seminal plazma yapısını inceleyen çalışmalar, erkek üreme kanallarında sperm hücresinin olgunlaşması ve motil hale geçmeye hazır olması ile ilgili biyokimyasal süreçleri anlamaya imkan sağlamaktadır (Nagahama, 1994; Koldras vd., 1996; Linhart vd., 1999). Farklı tür ve bireylerde yapılacak olan seminal plazma analizleri, türlerin bireyleri arasında ve türler arasındaki farklı üreme özelliklerinin açıklanmasını sağlamaktadır (Alavi vd., 2004a; 2004b). Hepsinin ötesinde, türe

uygun dölleme çalışmalarının yapılmasında, uzun ve kısa süreli sperm muhafaza çalışmalarında, çalışılan türün seminal plazma içeriğinin bilinmesi son derece önemlidir (Billard, 1992; Alavi vd., 2007). Sadece türler arasında değil, aynı tür içinde de seminal plazma bileşenlerinde farklılıklar gözlenmektedir (Koldras, 1996; Billard, 1995b).

Temelinde Sertoli hücrelerinin salgıları ile başlayan, testis ve sperm kanallarının salgı ve emilimleri ile şekillenen seminal plazma içeriği başta Na^+ , K^+ ve Cl^- olmak üzere Ca^{2+} ve Mg^{2+} iyonlarınca zengindir. Buna karşın, balık seminal plazmasında hormonlar, feromonlar, kolesterol, gliserol, vitaminler, serbest amino asitler, şekerler ve yağlar gibi organik içeriği oluşturan maddelerin derişimleri, diğer omurgalı gruplarına göre azdır (Scott ve Baynes, 1980; Linhart vd, 1991; Lahnsteiner, 2003). Bu maddeler miktar olarak az olsa da çeşit olarak az değildir. Son yıllarda seminal plazma protein profili üzerine yapılan çalışmaların artması ile sazan balığı seminal plazmasında 186, sperm hücresinde ise 348 farklı protein tayin edilmiştir (Dietrich vd., 2015). Benzer şekilde, *O. mykiss* sperm hücresinin sadece flagellumunda 500'den fazla protein türü belirlenmiştir (Cosson, 2010). Seminal plazmanın yapısı, balığın stres koşullarına bağlı olarak değişebileceği gibi, üreme sisteminde sperm hücrelerinin veya üreme sistemi kanallarındaki lökosit hücreleri gibi somatik hücrelerin zarar görmesi ile değişikliğe uğrayabilir (Cosson, 2004; Rurangwa vd., 2004).

Sperm hücrelerinin ROS üretmesi fizyolojik olarak normal bir süreçtir. Ancak, bunların üretimi ve ortamın süpürücü etkisi dengesizleştğinde bu durum özellikle hücre zarı açısından tehlikeli olmaktadır (Sharma ve Agarwal, 1996). Balık sperm hücre zarları, diğer omurgalı gruplarındaki gibi, ROS'ların olumsuz etkilerine son derece hassas olan doymamış yağ asitlerince (PUFAs) zengindir. Bu olumsuz etkiler, hücre için ATP miktarının hızla azalmasına, aksonemal hasara, spermin orta kısmında morfolojik bozulmalara sebebiyet verebilmektedir. Böylelikle sperm motilite karakteristiklerinin değerlerini düşürmektedir (Sikka, 1996; Bansal vd., 2007). Bununla birlikte, ROS artışı ile fertilizasyon oranı arasında negatif korelasyon bulunmaktadır (Agarwal vd., 2005). Gazo vd. (2013), semendeki ROS artışının anormal sperm oluşumu ve sperm hücre hasarı ile direk ilgisini göstermektedir. Özellikle bazı ROS gruplarının sazan balığı spermde DNA hasarına yol açtığı

bilinmektedir (Zhou vd., 2006). Kısa süreli muhafaza çalışmalarında, semen örneğinde oluşan ROS, motilite karakteristiklerini olumsuz etkileyen oksidatif fosforilasyon gibi hücre metabolizması süreçlerini engellemektedir (Shaliutina vd., 2013). Ayrıca, ROS ile antioksidan aktivitesinin dengesizliği özellikle kriyoprezervasyonda sperm hücrelerinin zarar görmesindeki en önemli nedenlerden biri olarak gösterilmektedir. Kriyoprezervasyon işleminde oluşan DNA hasarının temel nedeni işlem sırasında oluşan aşırı ROS olarak gösterilmektedir (Wang vd., 1997; Li vd., 2007; 2009). Son yıllarda, semen ve ROS ilişkili çalışmalarda artış olsa da, ROS gruplarının sperm hücreleri üzerine etkileri tam olarak bilinmemektedir (Lahnsteiner vd., 2010; 2011; Lahnsteiner ve Caberlotto, 2012).

Gametler, performanslarında oksijenin önemli rol oynadığı aerobik hücrelerdir (Ubilla ve Valdebenito, 2011). Serbest radikallerin bir tipi olan ROS farklı metabolik yollar ile sürekli olarak üretilmekte ve farklı biyomoleküller ile etkileşime geçerek hücre zarı hasarına yol açabilmektedir. Oksidatif stres, üretilen bu serbest radikaller ile hücrenin anti-oksidasyon mekanizması arasındaki dengesizliğin bir sonucudur ve aşırı ROS artışı sebebiyle hücreye zarar verebilmektedir (Saleh vd., 2002). Sperm hücreleri, kendilerinde ve seminal plazmada bulunan antioksidanlar ve antioksidan enzimler tarafından oksidatif stresin olumsuz etkilerinden korunmaktadır. Antioksidanlar, bu serbest radikallerin kontrol dışı üretimlerini engelleyen ve biyolojik yapılar ile reaksiyonlarını kısıtlayan molekulardır (Halliwell ve Chirico, 1993). Teleost balıklarının hem seminal plazmasında hem de sperm hücresinde farklı tiplerde antioksidan maddeler bulunmaktadır (Liu vd., 1995; Ciereszko vd., 2000). Bu antioksidan maddeler, genel olarak enzimatik olanlar ve enzimatik olmayanlar olarak 2 gruba ayrılabilir (Lahnsteiner vd., 2010). C ve E vitaminleri, ürik asit, semende enzimatik olmayan antioksidanlar arasında en yaygın olarak tayin edilmiş olanlardır (Ciereszko ve Dabrowski, 1995; Ciereszko vd., 1999; Metwally ve Fouad, 2009; Martínez-Páramo vd., 2012). Enzimatik antioksidan yapılarından ise, süperoksit dismutaz, glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz, katalaz, metiyonin sülfoksit redüktaz gibi enzimler semende bulunmaktadır (Lahnsteiner, 2009; Li vd., 2010; Lahnsteiner vd., 2010; Martínez-Páramo vd., 2012). Bu antioksidan özellikteki yapılar sperm hücresinin üreme sistemindeki canlılığın korunmasında son derece önemlidir. Bu sebeple hem kısa hem de uzun süreli muhafazada sulandırıcı çözeltilerine ilave edilmektedirler. Bu *in vitro* saklama işlemlerinde, semenin

antioksidan sistemleri yetersiz kalmakta ve ROS'ların olumsuz etkilerinden sperm hücrelerini koruyamamaktadır (Lahnsteiner vd., 2010). Bu sebeple, antioksidan kapasitesine sahip moleküllerin, *in vitro* çalışmalarda sulandırma çözeltilerine konulması, sperm hücrelerinin soğuk şoka ve oksidatif hasara karşı direncinin artmasına yaramaktadır (Cabrita vd., 2011). Ancak, eklenen her antioksidan özellikteki madde, her balık türünde sperm motilite karakteristikleri açısından önemli derecede fark oluşturmamaktadır (Lahnsteiner vd., 2011). Sonuç olarak, farklı antioksidan özellikteki maddeler, balık türlerinin sperm hücreleri üzerine farklı etkiler göstermektedir.

1.3.5. Balık sperminde DNA hasarı

Uygun koşullarda yetiştirilen bir balıktan alınan sperm hücrelerinde, düşük oranda da olsa DNA hasarlı sperm hücresi saptanabilmektedir. Genel olarak sperm hücresindeki DNA hasarı, anormal kromatin paketlenmesi (Sakkas vd., 1996; Boissonneault, 2002; McLay ve Hugh, 2003), ROS fazlalığı (Khosravi vd., 2014), seminal plazma antioksidanlarının azalması (Pérez-Cerezales vd., 2009), sperm hücrelerinin apoptozu (Sakkas vd., 1996) gibi nedenler ile oluşabilmektedir. Özellikle uzun ve kısa süreli muhafaza sonunda DNA hasarlı hücrelerde artış gözlenmektedir. (Labbe vd., 2001; Zilli vd., 2003; Doğu, 2011; Shaliutina vd., 2013). Sperm hücresinde oluşan DNA hasarı dölleme kabiliyetinin azalması ile ilişkilidir ve özellikle döllemeden sonra yavrularda çeşitli gelişim problemlerine hatta ölümlerine yol açmaktadır (Kopeika vd, 2004; Evenson ve Wixon, 2006).

Hem kısa hem de uzun süreli muhafaza sırasında, DNA hasarları meydana gelmektedir. Bu hasarlar genellikle oksidatif strese dayandırılmaktadır (Watson, 2000; Aitken ve Baker, 2004). Bu durum, sperm hücre ve mitokondri zarlarına, aksonem yapısına zarar vererek sperm hücre yapısını ve fonksiyonunu olumsuz bir şekilde etkiler (Spinaci vd., 2005). DNA moleküllerinin oksidasyon ile zarar görmesi; sarmalda kırıklar oluşması ve azot bazlarının oksitlenmesi olarak iki temel yol ile gerçekleşir (Box vd., 2001). Pérez-Cerezales vd. (2009), CD dışı bireylerin sperm hücrelerindeki DNA hasarlarının, kısa süreli muhafazada oksidatif strese ile ilgili olduğunu ve bu oksidatif stresin sitozinlerden ziyade guaninleri etkilediğini göstermişlerdir. Aynı çalışmada, uzun süreli muhafazada ise oksidatif stress

saptanamamıştır ve buradaki DNA hasarının daha ziyade soğuk şok kaynaklı olduğu öngörmüşlerdir.

1.4. Cinsiyet Değiştirme ve Yetiştiricilik

Yetiştiricilikte cinsiyet değiştirme için kullanılan çeşitli strateji ve planlar, hormon uygulamaları, döl kontrolü, ginogenez ve androgenez gibi uygulamalar, genotipik veya fenotipik olarak çoğu veya tamamı erkek veya dişi popülasyonların geliştirilmesine yol açmaktadır. Bu uygulamaların genel amacı, büyüme hızı, et kalitesi gibi seksüel dimorfizim gösteren özelliklerin avantajlarından yararlanmaktır (Dunham, 2012).

Cinsiyet değişimi kontrolü akuakültür çalışmalarının verimliliğin gelişiminde çok önemli bir araçtır. Tek cinsiyet popülasyonunun kültürü ile balığın büyüme oranı artabilmektedir. Örneğin, erkek Nil tilapiyası (*Oreochromis niloticus*), dişi Nil tilapiyasından daha hızlı büyümektedir (Beardmore vd., 2001). Ters bir durum gökkuşağı alabalığı için söz konusudur, dişileri erkeklere göre daha önce ticari olarak satılabilir boyuta gelmekte ve dişilerin et kaliteleri daha iyi olmaktadır (Panadian, 1995). Cinsiyet kontrolü sadece üretimdeki et miktarını arttırmada değil, damızlık anaç balık cinsiyetindeki eksiklikleri gidermede de kullanılır. Örneğin, erkek lahoz balığı türleri (*Epinephelus sp.*) doğada nadir bulunması ve yakalanmasının zor olması sebebiyle, kültürlerinde erkek anaçların üretiminin önemi vurgulanmaktadır (Kuo vd., 1988; Hassin vd., 1997). Tek tip cinsiyetli popülasyonların kültürü sadece besinsel akuakültür için değil, akvaryum türleri için de son derece önemlidir. Örneğin, erkek lepistes (*Poecilia reticulata*) bireyleri dişi bireylerden daha süslüdür ve satış kolaylığı açısından tercih edilmektedirler (Piferrer ve Lim, 1997). Tüm bu cinsiyet değişimi süreçlerinde, anaçlardan elde edilen gametlerin kullanımı son derece önemlidir.

Tümü dişi popülasyonlar Salmonid, Cyprinid ve Cichlid türlerinin kültürlerinde başarılı bir şekilde elde edilmektedir. Cinsiyet kontrolünde, CD anaç elde edilmesine imkân sağlayan özellikle hormonsal uygulamalar öne çıkmaktadır. Hormon uygulamaları; larvaların hormon katkılı yem ile beslemesi, larvaların hormonlu-su

çözeltilisine maruz bırakılması ve iki yöntemin kullanıldığı kombine uygulamalar olmak üzere 3 farklı yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemlerde anaçlara hormon uygulandığı için tek cinsiyet yavru popülasyonunun büyüklüğü ve hormon uygulamasının ticari olarak satılan balığa uygulanmaması önemli avantajlardır. Ayrıca bu şekilde dolaylı hormon uygulamasının tümüyle dişi veya erkek popülasyonlar elde edilmesi söz konusudur (Purdom, 1993; Özden vd., 2003). Tek cinsiyetli popülasyonların genetik olarak üretimi, direk olarak hormon kullanılarak cinsiyet değişimi sağlamaya kıyasla hormon kullanımını azaltmak gibi diğer bir avantaja da sahiptir. Böylelikle kullanılan hormonların çevresel etkilerinden ve kullanımındaki yasal mevzuat durumlarından kaçınılmış olunmaktadır. Balıklarda cinsiyet belirleyici mekanizma taksonomik gruplara ve hatta türlere göre farklılıklar göstermektedir. Ticari olarak kültüre alınan Cyprinid ve Salmonid türleri, XX kromozom yapısının dişi, XY kromozom yapısının ise erkek olduğu XX/XY cinsiyet belirleme mekanizmasına sahiptir. Buna karşın çipura (*Sparus aurata*) ve lahoz (*Epinephelus sp.*) gibi türlerde olgunlaşırken cinsiyet değişiminin görüldüğü ardışık hermafrodizim bulunurken, Nil tilapyası (*Oreochromis niloticus*) ve bir çok yassı balık (Pleurronectiformes) türünde (örneğin *Paralichthys olivaceus*) XX/XY mekanizmasına ek olarak sıcaklık kontrolü altında cinsiyet belirleme söz konusudur (Devlin ve Nagahama, 2002; Dunham, 2004; Okorie vd., 2013).

Tümü dişi XX gökkuşağı alabalığı cinsiyet değişimini kapsayan yetiştiricilik tüm İngiltere’de (Birleşik Krallık), Kanada’da daha yaygın olarak kültürü yapılan kral somon (*Oncorhynchus tshawytscha*) üretiminde de benzer şekilde tek cinsiyetli yetiştiricilik uygulanmaktadır. Tümü dişi popülasyonun kültür ortamında istenmesinin temel iki nedeni erkeklerin küçük boyutta iken cinsel olgunluğa ulaşması ve et kalitelerinin düşük olmasıdır (Dunham, 2012).

1.5. CD Dişi Gökkuşağı Alabalığı ve Sperm Kalitesi

Özellikle Salmonidae türlerinin kültüründe, dişi bireylerden oluşan popülasyonlar yetiştirilmek istenmektedir. Bunun öncelikli nedeni, dişi bireylerin daha kısa sürede aynı yemleme periyodu ile erkeklere göre daha çok et ihtiva etmesidir. Ayrıca, dişi bireylerden alınan etin kalitesi daha iyi olduğu için, özellikle balık işleme

süreçlerinde tercih edilmektedir. Erkek bireyler dişilerden daha önce (yaklaşık 1 yıl), cinsel olgunluğa ulaşmaktadır. Bu sebeple, en genel ifade ile erkek bireyler, dişilerin aksine, özellikle büyümelerinin ilk yılında, performanslarını daha ziyade gonad oluşumuna yönlendirmektedir. Tümü dişi popülasyonlar üretmenin en verimli ve uygulanabilir yolu, doğası gereği XY karyotipine sahip ve oluşan yavrunun cinsiyetini tayin edecek olan sperm hücrelerini, XX karyotipinde elde ederek, bu sperm hücresi ile yumurtanın döllenmesidir. Böylelikle oluşan tüm zigotlar XX karyotipinde, yani geliştiklerinde dişi bireyler olacaktır. İşte bu tür sperm hücreleri, çeşitli hormon uygulamaları ile CD dişi bireylerde bulunmaktadır. Bu CD dişi anaçlardan alınan semen ile yapılacak yumurta döllemeleri sonucunda tamamı dişi bireylerden oluşan popülasyonlar elde edilmektedir (Geffen ve Evans, 2000; Kuzminski ve Dobosz, 2010; Purser ve Forteach, 2012).

Cinsiyeti değiştirilmiş (CD) dişi alabalıklar terimi, önceki çalışmalarda daha sıklıkla cinsiyeti değiştirilmiş dişiler, yeni-erkek veya erkekleştirilmiş dişiler olarak da tanımlanmaktadır (Kowalski vd., 2011). Bu bireyler, ticari olarak satılmak için değil, üretimde anaç olarak kullanılmaktadır. Böylelikle hormon uygulamalarının gerek çevre gerek ise insan sağlığı açısından olumsuz etkileri tamamıyla giderilmektedir. Bu anaçların elde edilmesinde, 17α -metilttestosteron, 11β -hidroksiandrostenedion ve 17α -etinilmetilttestosteron gibi hormonlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Uygulama genellikle, yavrunun ilk 2 ya da 3 ayında hormonların yeme ilave edilmesi ile gerçekleştirilmektedir (Atar vd., 2009; Kuzminski ve Dobosz. 2010). CD dişi balıklar, genotipik olarak dişi özellikte olsalar da, gelişmelerinin ilk yıllında morfolojik olarak erkek özellikleri göstermeye başlamaktadır. Renkleri koyulaşmakta, alt çeneleri öne doğru uzayarak kanca şeklini almakta ve anal yüzgeçleri dış bükey şekilde gelişmektedir.

CD dişi bireyler, her ne kadar erkek bireylere benzese de, üreme sistemlerinde genellikle sperm kanalı oluşmamaktadır. Buna karşın, bazı morfolojik bozukluklar olabilmesine karşın, testis tek ya da çift olarak oluşmaktadır. Sperm kanalı olmadığı için, normal sağım ile semenin elde edilmesi söz konusu olmamaktadır. Bu sebeple CD dişi balıklar kesilerek testislerin alınması ve semenin, testislerden süzülerek elde edilmesi gerekmektedir (Geffen ve Evans, 2000). Sperm hücrelerinin olgunlaşmasında önemli yer tutan ve seminal plazma içeriğine katkı sağlayan sperm

kanallarının, CD dişi bireylerde olmaması sebebiyle, bunlardan elde edilen semen ile, normal erkeklerden elde edilen semen arasında ciddi farklar bulunmaktadır (Demska-Zakes vd., 1999). Bu semen direk olarak testislerden alındığı için, daha yüksek sperm hücresi yoğunluğuna, daha az akışkanlık ve sperm motilitesi göstermektedir. Bu sebeple bu sperm hücrelerinin dölleme oranı düşük olmaktadır (Robles vd., 2003; Nynca vd., 2012). Bu sperm hücrelerinin, alındıktan sonra *in vitro* şartlarda uygun sulandırma çözeltisi ile belirli bir süre inkübasyon sonrası bu sperm hücrelerinin motilite karakteristiklerinde iyileşme ve dölleme oranında yükselme gözlenmektedir (Kobayashi vd., 2004).

Sonuç olarak, balıklarda cinsiyet değişimi üzerine pek çok çalışma bulunmasına karşın, cinsiyeti değiştirilen bireylerden elde edilen sperm hücrelerinin özellikleri ve kullanılması ile ilgili sınırlı bilgi bulunmaktadır. Tez çalışması, testiküler seminal plazma parametrelerini de tanımlayarak CD dişi bireylerden elde edilen sperm hücrelerinin motilite karakteristiklerini belirleyip, antioksidan ilave edilmiş suni seminal plazma kullanılarak gerçekleştirilen uzun ve kısa süreli muhafazalarına ait motilite verilerini sunmaktadır. Ayrıca, muhafaza çalışmalarının motilite karakteristiklerine etkileri, akuakültür pratiğindeki en önemli parametrelerinden yumurtayı dölleme ve yumurtadan çıkış oranları ile desteklenmiştir.

2. MALZEME VE YÖNTEM

2.1. Malzeme

2.1.1. Deneme yeri

Bu araştırma Eşen Çayı üzerinde bulunan ticari bir gökkuşağı alabalık üretim tesisinin destekleriyle gerçekleştirilmiştir. Cinsiyeti değiştirilmiş (CD) dişi gökkuşağı alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) testiküler semeninin ve bu semendeki sperm hücrelerinin motilite özelliklerinin incelendiği tez çalışması, 2012-2013 (Aralık, Ocak ve Şubat), 2013-2014 (Aralık, Ocak ve Şubat), ve 2014-2015 (Aralık, Ocak ve Şubat) üreme sezonları boyunca gerçekleştirilmiştir. İlk iki üreme sezonunda, seminal plazma biyokimyasal analizleri ve kısa süreli muhafaza çalışmaları gerçekleştirilmiş iken 3. üreme sezonunda sperm hücreleri DNA hasarları ve uzun süreli muhafaza çalışmaları tamamlanmıştır. İlk iki sezonda, toplamda 102 normal (N) erkek bireyin ve 88 CD dişi bireyin semen özellikleri incelenmiştir. İlk sezonda 2-3 yaşında CD bireyler, ikinci sezonda 3-4 yaşındaki CD bireyler, her iki sezonda da 2-3 yaşındaki N erkek bireyler değerlendirilmiştir.

Çevre ve Şehircilik Bakanlığı'nın İl Çevre Durum Raporu'na göre (2011) Eşen Çayı, Fethiye-Muğla'nın güneyindeki en uç noktada olup 100 km kadar uzunluğa sahiptir ve Muğla-Antalya sınırında Akdeniz'e dökülür. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı verilerine göre, Eşen Çayı'nın geçtiği Seydikemer İlçesi'nde, toplamda 55 ticari alabalık işletmesi bulunmaktadır. Bunların 35 tanesi Eşen Çayı'nın üzerinde (Ören ve Sahil Ceylan Köyleri) bulunmakta, diğerleri ise çay ile dolaylı bağlantılı kollardadır. Bölgedeki yıllık alabalık üretimi 8000 tondur. Araştırmanın gerçekleştirildiği alabalık üretim tesisi, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı verilerine göre 800 ton/yıl kapasitesi ile bölgedeki en büyük tesislerden biridir. Özellikle cinsiyeti değiştirilmiş dişi gökkuşağı alabalığı anaçları, söz konusu tesiste üretimde kullanabilir durumdadır.

2.1.2. Balık, yem ve su materyali

Çalışmada, söz konusu üretim tesisinde rutin üretimde kullanılan erkek anaç bireyler ve cinsiyeti değiştirilmiş dişi bireyler kullanılmıştır. Cinsiyeti değiştirilmiş (CD) dişi alabalık bireyleri, hormon emdirilmiş yem ile beslenmiştir. Bu amaçla, 3 mg 17 α -metiltestosteron/kg yem olacak şekilde hormon çözeltisi etanol içerisinde hazırlanmış ve sürekli karıştırılan yem üzerine püskürtülerek emdirilmiştir. Vakum etüvünde çözücüsü uçurularak hazırlanan yemler +4°C’ da saklanmıştır ve 60 gün boyunca yumurtadan çıkan yavru balıklara verilmiştir (Jalabert vd., 1975; Atar vd., 2009). 2-3 yaşında erkek anaçlar her iki örnekleme yılında da kullanılırken, ilk örnekleme yılında 2-3 yaşında, ikinci örnekleme yılında 3-4 yaşındaki cinsiyeti değiştirilmiş dişi bireyler kullanılmıştır. Çalışmanın üçüncü döneminde, testiküler sperm DNA hasarı belirlenmesi ve kriyoprezervasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Anaç balıkların beslenmesinde standart alabalık yemi kullanılmıştır. Kullanılan yemin boyutlarına göre değişen teknik özellikleri Çizelge 2.1.’de sunulmuştur. Alabalık üretim tesisi bilgilerine göre, üreme sezonu boyunca tesis girişindeki su kalite parametreleri: sıcaklık 13,76 $\pm$ 0,11 °C; çözülmüş oksijen doygunluk değeri % 86,37 $\pm$ 0,25; çözülmüş oksijen 8,93 mg/L; tuzluluk 0,17 $\pm$ 0,03 ppt; pH 7,99 $\pm$ 0,06; askıda katı madde 0,0012 $\pm$ 0,0002 g/L; nitrit (NO₂⁻-N) azotu 0,02 $\pm$ 0,00; nitrat (NO₃⁻-N) azotu 0,68 $\pm$ 0,09; amonyum (NH₄⁺-N) azotu 0,39 $\pm$ 0,09; toplam fosfat (PO₄⁻³) 0,62 $\pm$ 0,21 mg/L şeklindedir.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan yemlerin boyutlarına göre içerikleri

	Yem Boyutu (mm)						
	4	5	6	8	6	8	10
İçerik (Miktar)	4	5	6	8	6	8	10
Ham Protein (Min %)	42	42	41	41	43	43	43
Ham Yağ (Min %)	22	22	23	23	18	18	18
Ham Kül (Max %)	12	12	12	12	12	12	12
Selüloz (Max %)	3	3	3	3	3	3	3
Nem (Max %)	10	10	10	10	10	10	10
Fosfor (Min %)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Metabolik Enerji (kCal/kg)	4350	4350	4375	4400	4400	4200	4200
Amino Asitler (Min %)	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
Yağ Asitleri (%)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Koruyucular (%)	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
Vitaminler (mg/kg)	125	125	125	125	125	125	125

2.1.3. Kullanılan antioksidanlar ve diğer maddeler

Çalışmada kuersetin, kurkumin, rosmarinik asit, rutin, resveratrol ve salisilik asit antioksidanları kullanılmıştır. Bu antioksidanlar, son yıllarda özellikle tedavi amaçlı rağbet gördükleri için seçilmişlerdir. Çalışmada kullanılan 6 antioksidanın yapıları Şekil 2.1.' de sunulmuştur.

Kuersetin ($C_{15}H_{10}O_7$, M_A : 302,24 g/mol), meyve ve sebzelerin özellikle yaprak ve kabuklarında yaygın olarak bulunur (Zheng vd., 2005). İnsanın normal diyetiyle alınması gerekliliği vardır. Sağlık açısından çok çeşitli faydalara sahip olduğu gösterilmiştir. Antioksidatif, serbest radikalleri süpürücü, antiviral etkileri bulunmaktadır (Morand vd., 1998; Saija vd., 2003; Jullian vd., 2007).

Kurkumin ($C_{21}H_{20}O_6$, M_A : 368,38 g/mol), özellikle Zencefilgiller (Zingiberaceae) grubundan hintsafranı, zerdeçal, zencefilde bulunur. Antioksidan, antiinflamatuvar, antiviral, antikanserojen ve antifungal etkileri bulunmaktadır (Wright, 2002; Stankovic, 2003; Modasiya ve Patel, 2012).

Rosmarinik asit ($C_{18}H_{16}O_8$, M_A : 360,31 g/mol), birçok bitki türünde bulunmakta, özellikle biberiye ve Perilla (*Perilla frutescens*) yağında yoğun olarak bulunmaktadır. Antioksidan ve antiinflamatuvar etkilerinin yanı sıra, çeşitli kanser türlerine karşı koruyucu etkisinin olabileceği düşünülmektedir. Alkollü bileşikler deri tarafından absorbe edilebilmektedir (Tóth vd., 2003; Zu vd., 2012)

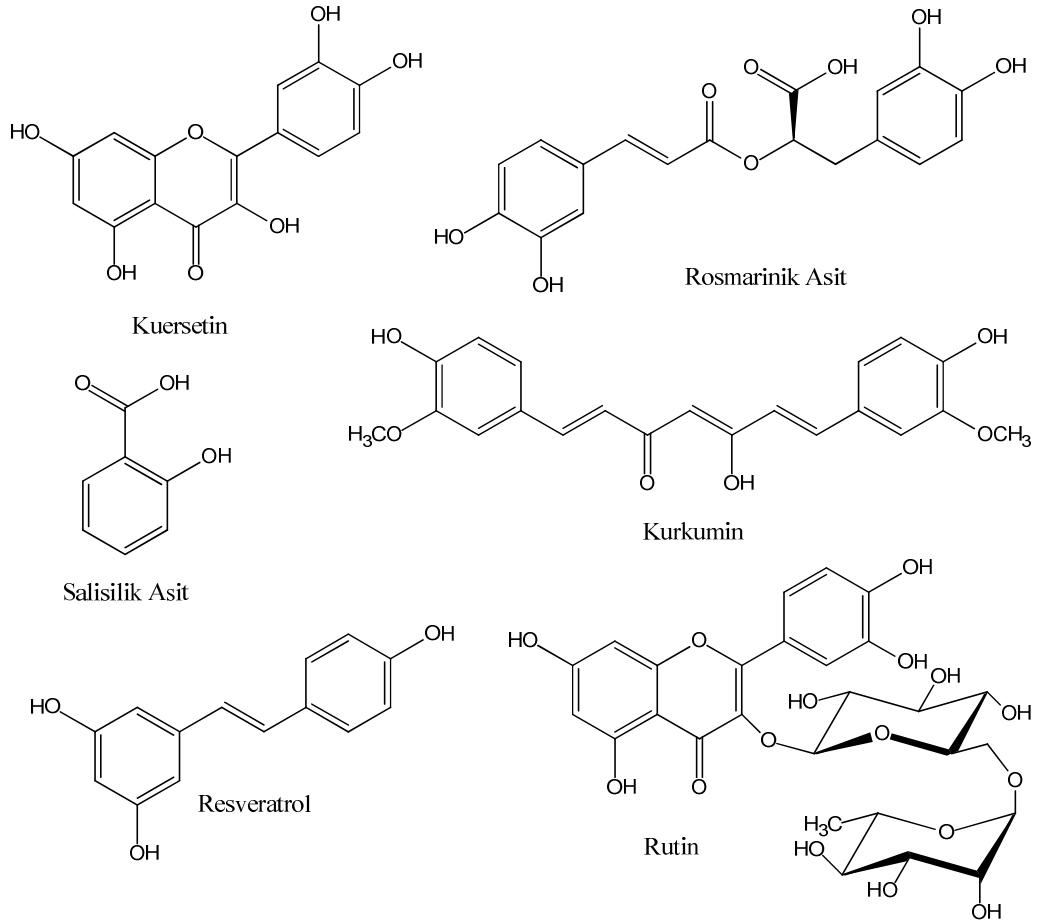
Rutin ($C_{27}H_{30}O_{16}$, M_A : 610,52 g/mol), özellikle invasif bir tür olan *Carpobrotus edulis* (katırtırnağı) ve *Fagopyrum esculentum* (karabuğday) bitkilerinde yoğun olarak bulunmaktadır. Antioksidan ve antibakteriyel özelliklerinin yanı sıra kolesterol dengeleyici özelliği bulunmaktadır. Ayrıca kan damarlarını koruyucu ve genişletici özellikleri bulunmaktadır. (Paniwynk vd., 2001; Conesa vd., 2005; Hamad, 2012)

Resveratrol ($C_{14}H_{12}O_3$, M_A : 228,24 g/mol), birçok bitki tarafından, çevresel stres ve patojenik saldırılar gibi olumsuz durumlara karşı bir yanıt olarak sentezlenmektedir. Bu sebeple bitki temelli bir antibiyotik olarak değerlendirilmektedir. Yerfıstığında, dut ve üzüm kabuğunda ve özellikle üzüm suyunda yoğun olarak bulunmaktadır. Enflamasyon, ateroskleroz ve karsinogenez gibi insan patolojik süreçlerinde koruyucu etkisi olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır. Koruyucu etkisinin, antioksidan özelliklerinden, lipit aktivitesinden ve lipoprotein metabolizmasını

dengeleyici etkisinden kaynaklandığı belirtilmektedir (Stivala vd., 2002; Zhu vd., 2008; Gülçin, 2012; Iuga vd., 2012).

Salisilik asit ($C_7H_6O_3$, M_A : 138,12 g/mol), özellikle söğüt ağacı kabuğundan elde edilmektedir. Organik bir asit olarak özellikle organik madde sentezinde kullanılmakta, bitki hormonu olarak işlev görmektedir. Akne tedavisi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca asetilsalisilik asit olarak aspirinin önemli aktif bir ara ürünüdür (Simic vd 2007; Gerailoo ve Ghasemnezhad 2011; Khalili vd 2011).

Bunların dışında, sperm sulandırıcılarında ve kimyasal analizlerde kullanılan tüm kimyasallar Sigma Aldrich (Almanya) ürünleridir. Çözeltilerin hazırlanmasında, Milli-Q sentez sisteminden (Millipore, ABD) elde edilen saf su kullanılmıştır.



Şekil 2.1. Çalışmada kullanılan antioksidanların moleküler yapıları

2.2.Yöntem

2.2.1. Balık gamet örnekleme

Araştırma 3 üreme sezonu [2012-2013 (Aralık, Ocak ve Şubat), 2013-2014 (Aralık, Ocak ve Şubat), ve 2014-2015 (Aralık, Ocak ve Şubat)] boyunca sürdürülmüştür. İncelenen ilk iki üreme sezonunda seminal plazma analizleri ve kısa süreli muhafaza çalışmaları, incelenen son üreme sezonunda ise özellikle kriyoprezervasyon ve COMET çalışmaları tamamlanmıştır. İncelenen ilk üreme sezonunda 2-3 yaşındaki CD dişi alabalık örnekleri ve 2-3 yaşındaki normal erkek örnekleri, ikinci üreme sezonunda ise 3-4 yaşındaki CD dişi balık örnekleri ve yine 2-3 yaşındaki normal erkek örnekleri incelenmiştir. İlk iki dönemde incelenen örneklerin üreme sezonu boyunca sayıları, yaşları, ağırlıkları ve boyları Çizelge 2.2.' de sunulmuştur. Çizelge 2.2.' ye göre, 2-3 yaşında 48 adet (ortalama 35,4±2,1 cm uzunluğunda, ortalama 567,4±115,1 g ağırlığında) CD dişi alabalık, 3-4 yaşında 40 adet (ortalama 49,8±3,3 cm uzunluğunda, ortalama 1819,2±268,7 g ağırlığında) CD dişi alabalık, incelenen ilk üreme sezonunda 2-3 yaşında 44 adet (ortalama 32,7±2,5 cm uzunluğunda, ortalama 619,7±33,7 g ağırlığında), ikinci üreme sezonunda 2-3 yaşında 58 adet (ortalama 33,3±3,0 cm uzunluğunda, ortalama 630,3±33,0 g ağırlığında) normal erkek bireylerden alınan örnekler incelenmiştir (Çizelge 2.2.). Örnekleme planında, üreme sezonu başlangıcı örnekleri Aralık ayı başında, üreme sezonu ortası örnekleri Ocak ayı başında ve üreme sezonu sonu örnekleri Şubat ayı başında alınan örnekleri ifade etmektedir.

Gametler normal erkek ve dişi anaçlardan abdominal masaj yöntemi ile alınmıştır. Cam tüpler içerisine sağılan semen örnekleri, buz içerisinde laboratuvara taşınmıştır. Sağım sırasında sindirim artıklarının bulaşmasını önlemek amacıyla sağımdan 48 saat öncesinden balıklara yem verilmesi kesilmiştir. CD dişi bireylerden sağım yoluyla semen örnekleri alınamadığı için, diseksiyon ile gonadlar çıkartılmıştır. Buz üzerinde gonadlar bistüri yardımı ile temizlenerek, üzerinde bulunan kan damarları atılmıştır. Daha sonrasında, gonadlar bistüri ile kesilerek, 210 µm gözenekli plankton bezinden testiküler semenin cam behere damlatılmasıyla dokudan ayrılması sağlanmıştır (Robles vd., 2009). Sağım sonrası, su, kan, idrar veya feçes ile kontamine olan semen örnekleri analizlerde kullanılmamıştır.

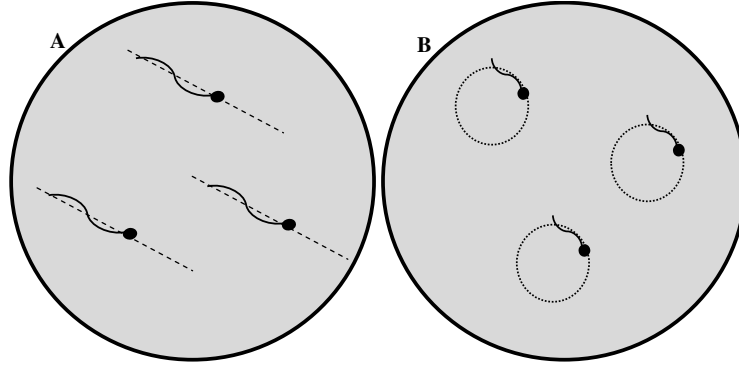
Çizelge 2.2. İncelenen iki üreme sezonu boyunca CD dişi ve N erkek birey sayıları (n) ve fiziksel özellikleri (B: sezon başlangıcı, O: sezon ortası, S: sezon sonu)

1. Üreme Sezonu				
	Özellik	B	O	S
N	Birey sayısı (n)	8	17	19
	Boy (cm)	32,8±2,4	33,5±2,4	32,0±2,6
	Ağırlık (g)	601,3±39,4	622,1±30,1	625,3±33,3
	Gonad (g)	-	-	-
	Yaş (yıl)	2-3	2-3	2-3
CD	Birey sayısı (n)	22	13	13
	Boy (cm)	35,7±2,5	35,4±1,7	34,7±1,7
	Ağırlık (g)	625,7±120,0	510,0±62,1	526,2±105,8
	Gonad (g)	20,7±6,8	27,7±8,1	26,9±4,3
	Yaş (yıl)	2-3	2-3	2-3
2. Üreme sezonu				
	Özellik	B	O	S
N	Birey sayısı (n)	14	17	27
	Boy (cm)	33,5±3,1	33,2±3,5	33,3±2,7
	Ağırlık (g)	643,6±41,6	623,8±33,5	627,6±26,3
	Gonad (g)	-	-	-
	Yaş (yıl)	2-3	2-3	2-3
CD	Birey sayısı (n)	7	14	19
	Boy (cm)	48,8±6,7	49,4±2,6	50,5±2,6
	Ağırlık (g)	1690,0±565,0	1816,4±189,6	1855,3±213,2
	Gonad (g)	88,0±51,9	79,6±20,9	82,9±20,2
	Yaş (yıl)	3-4	3-4	3-4

2.2.2. Sperm motilite karakteristikleri ve sperm yoğunluğunun belirlenmesi

Alınan her bir sperm örneğinin motilite karakteristikleri; yüzde (%) progresif motiliteye sahip spermatozoa ve spermatozoa progresif motilite süresi (s) olarak, örnek alındıktan sonra ivedilikle tayin edilmiştir. Mikroskop altında 200x büyütmede gerçekleştirilen motilite ölçümlerinde, aktivasyon çözeltisi olarak 60 mM sodyum bikarbonat (NaHCO_3), 50 mM Tris pH=9,0 tamponu (Lahnsteiner, 2000) kullanılmıştır. Sulandırma çözeltisi kullanılarak N erkek sperminde 1:200, CD dişi sperminde 1:400 veya 1:600 oranlarında seyreltme yapılmıştır. Hücrelerin, progresif motiliteye sahip olma yada olmama durumları, spermin aktivasyon sonrası aldığı yola göre tespit edilmiştir (Şekil 2.2.). Progresif motilite yüzdesi, aktivasyon çözeltisi ile spermin ilk temasında doğrusal hareket eden hücrelerin yüzdesi olarak değerlendirilmiştir (Billard ve Cosson, 1992; Horváth vd., 2003). Progresif motilite yüzdesi, hücrelerin tamamen progresif motil olmama durumu % 0, tam progresif motil olma durumu % 100 olarak ve % 10 artış aralıkları ile oluşturulan bir ölçeklendirme ile değerlendirilmiştir (Borges vd., 2005'den değiştirilerek). Progresif

motilite süresi, spermin ileri yönde doğrusal harekete başlaması ile spermin kat ettiği yolun eş merkezli dairesel harekete dönüştüğü ana kadar geçen süre olarak kabul edilmiştir ve hesaplanmıştır (Rurangwa vd., 2004). Her örneğin motilite sayımları en az 3 tekrarlı yapılmış, ortalama değer kullanılmıştır.



Şekil 2.2. Progresif (A) ve progresif olmayan (B) motilitenin şematik gösterimi

Spermatozoa yoğunluğu, hemositometrik yöntem ile belirlenmiştir. Sayımlarda, 0,0025 mm² alanlı Thoma sayım kamerası kullanılmıştır. Örnekler, 1:100 ve 1:10000 oranları arasında, Hayem çözeltisi [0,5 g sodyum klorür (NaCl), 2,5 g sodyum sülfat (Na₂SO₄) , 0,25 g civa II klorür (HgCl₂)/100 mL saf su] ile sulandırılarak 3 tekrarlı olarak sayılmıştır. Spermatozoon yoğunluk hesaplanması aşağıdaki formüle göre yapılmıştır ve sperm derişimi x10⁹ spermatozoon/mL olarak ifade edilmiştir.

$$\text{Sperm Derişimi} = \frac{\text{Toplam Sayılan Hücre}}{\text{Sayılan Kare Sayısı}} \times 4 \times 10^6 \times \text{Sulandırma Oranı} \quad (2.1)$$

Çalışmalarda, faz kontrast ve floresans özellikli, AxioCam ICc 5 kameralı Zeiss Axio Scope A1 (Almanya) ve faz kontrast özellikli Nikon DS-U3 kameralı Nikon Ci-S mikroskoplar kullanılmıştır.

2.2.3. Seminal plazma eldesi ve analizleri

Seminal plazma, semenin 13.000 rpm’de 10 dakika 4°C’ de iki kez santrifüjlenmesi ile elde edilmiştir. Seminal plazma örnekleri -20°C’ de saklanmış ve tüm analizler ivedilikle yapılmıştır.

2.2.3.1. pH ve ozmolarite ölçümü, iyon ve metabolit içeriklerinin belirlenmesi

Seminal plazma pH seviyesi, WTW pH metre 3110 set 2 cihazı standard probu ve az miktardaki örneklerde Sentix mic-D probu (Almanya) ile ölçülmüştür. Ozmolarite değerleri ise Gonotec Osmomat 030 kriyoskopik osmometre (Almanya) ile tayin edilmiştir. Seminal plazma iyon ve metabolit içerikleri, orijinal kitlerinin kullanımı ile Abbott-Aeroset otoanalizörü (Chicago, IL, USA) ile gerçekleştirilmiştir.

2.2.3.2. Protein, lipit peroksidasyonu, katalitik aktivite ve toplam antioksidan kapasitesi tayinleri

Seminal plazma protein derişimleri, lipit peroksidasyonu, katalitik aktivite ve toplam antioksidan kapasitesi değerleri spektrofotometrik yöntemlerle ölçülmüş, ölçümler Hach Lange DR 2800 spektrofotometre (Almanya) kullanılarak yapılmıştır. Toplam antioksidan kapasitesi ölçümü, Randox toplam antioksidan KIT NX 2332 (İngiltere) kit seti kullanılarak yapılmıştır. Bu kit seti; R1 (tampon), R2 (kromojen), R3 (substrat) ve standart çözeltilerden oluşmaktadır. Spektrofotometrik okumalar 600 nm'de 1 cm ışık yolu olan kuvars küvet ile yapılmıştır. Örneklerin hazırlanma prosedürü Çizelge 2.3.'de açıklanmıştır. Bu işlem ile hazırlanan örnekler karıştırılıp spektrofotometrik ölçümleri yapılmıştır (A1). Sonrasında 200 µl R3 çözeltisi eklenip, karıştırılmış ve 3 dakika sonra ikinci spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır (A2).

Çizelge 2.3. Toplam antioksidan ölçümü hesaplanmasında örneklerin hazırlanması

	Kör	Standart	Örnek
Saf su	20 µl	-	-
Standart	-	20 µl	-
Örnek	-	-	20 µl
Kromojen (R2)	1 ml	1 ml	1 ml

Hesaplama verilen formüller ile hesaplanmıştır.

$$\text{Faktör} = \text{standard derişimi} / (\Delta A \text{ kör} - \Delta A \text{ standart}) \quad (2.2)$$

$$\text{Toplam antioksidan durumu (mM)} = \text{Faktör} \times (\Delta A \text{ kör} - \Delta A \text{ örnek}) \quad (2.3)$$

Toplam protein tayini, Bradford yöntemi ile yapılmıştır (Bradford 1976). Standart protein olarak sığır serum albümini (BSA) ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi kullanılarak örneklerin protein miktarları hesaplanmıştır. Bradford çözeltisi, 0.02 g Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası 10 mL metanolde çözüldükten sonra 20 mL % 85'lik fosforik asit (H_3PO_4) eklenip, çözelti hacmi saf su ile 50 mL' ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Örnek protein yoğunluğuna göre seyreltmeler yapılarak, her örnek 3 tekrarlı olarak ölçülmüştür.

Lipit peroksidasyon (LPO) ölçümü, malondialdehit (MDA) üretimini bildiren tiyobarbitürik asit (TBA) reaktif substrat analizi ile gerçekleştirilmiş, kullanılan örnek ve kimyasalların hacimlerinde orantısal değişiklikler yapılmıştır (Buege ve Aust, 1978).

Katalaz aktivitesi (KAT), rutinde yaygın olarak kullanılan ve örneğin hidrojen peroksit (H_2O_2) ile direk reaksiyonu sonucu 240 nm' deki absorbansın azalmasından hesaplanan Aebi ölçüm metodunun (Aebi, 1983) balık seminal plazması için uygun olmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle, seminal plazma katalaz aktivitesinin ölçümü için Goth metodu kullanılmıştır. Metotta, H_2O_2 reaksiyonu amonyum molibdat $[(NH_4)_6 Mo_7O_{24}]$ ile durdurulmuş ve oluşan renkli kompleksin absorbansı 405 nm'de ölçülmüştür (Goth 1994).

2.2.3.3. *Fourier transform infra-red (FTIR) analizleri*

Seminal plazma örneklerinin FTIR spektrumları, ATR (attenuated total reflection) örnekleme probuna sahip Perkin Elmer 100 IR spektrofotometresi (Kanada) kullanılarak elde edilmiştir. İncelenen 2. üreme sezonunda alınan örnekler yüksek oranda su içermeleri nedeniyle fonksiyonel gruplara ait bandlar direk olarak gözlemlenememiştir. Bu nedenle, 50-100 μ L seminal plazma örneği üzerine 10-20 mg analitik saflıkta potasyum bromür (KBr) eklenmiş ve sperm örnekleri KBr üzerine emdirilmiştir. Suyun uzaklaştırılması amacıyla hazırlanan örnekler 35°C' de 24 s süreyle etüvde kurutulmuştur. KBr ile referans çizgisi (baseline) alınarak örneklerin FTIR spektrumları elde edilmiştir (Delerisa ve Petibois, 2003).

2.2.4. Kısa süreli muhafaza çalışmaları

Her örneklemede, alınan sperm örneklerinin motilite özellikleri belirlendikten sonra, bu özellikleri birbirine benzer olan, CD dişi bireylerden en az 3 tanesi, normal erkek bireylerden en az 5 tanesi birleştirilerek elde edilen örnekler sulandırılarak kısa süreli muhafaza çalışmalarında kullanılmıştır. Çalışma başında, uygun sulandırma oranları ve pH seviyesini tespit etmek amacıyla, 1:1, 1:3, 1:5, 1:9, 1:19 (sperm:sulandırıcı) sulandırma oranları, pH 8,0; 8,5; 9,0; 9,5; 10,0 ve 10,5 değerleri denenmiştir. Sonuçlar, örneklerin pH 9,5 sulandırma çözeltisiyle 1:3 oranında seyreltilmesinin uygun olduğunu göstermiştir. Sulandırıcı olarak, Lahnsteiner vd., 1998 tarafından önerilen 103 mM NaCl, 40 mM potasyum klorür (KCl), 1 mM kalsiyum klorür (CaCl_2), 0,8 mM magnezyum sülfat (MgSO_4) içeren 20 mM HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinethansülfonik asit) tamponu suni seminal plazma (SSP) olarak kullanılmıştır.

Antioksidan maddelerin (kuersetin, kurkumin, rosmarinik asit, rutin, resveratrol, salisilik asit) etanolde hazırlanan stok çözeltileri, son derişimleri 25, 50 ve 100 mg/L olacak şekilde SSP içirisine eklenmiştir. 100 mg/L'den yüksek derişimlerin çözünürlük problemi nedeniyle sulandırma için uygun olmadığı belirlenmiştir. Her bir antioksidan maddenin, etanol içinde stok çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan sulandırıcıya bu stoklardan eklenerek hedef antioksidan derişimleri elde edilirken, sulandırıcılarda etanol miktarının % 1 seviyesinde olması sağlanmıştır. Aynı koşullar altında, antioksidan içermeyen % 1 etanol eklenen SSP ile ve hem antioksidan hem de etanol içermeyen SSP ile kontrol grupları oluşturulmuştur. Örnekler, +4°C'de 19 mL'lik steril cam deney tüpleri içirisinde saklanarak, 3., 6., 12., 24. saatte ve sonrasında yüzde progresif motilite saptanmayıncaya kadar her 24 saatte bir değerlendirilmiştir. Her sulandırma üç tekrarlı olarak uygulanmıştır.

2.2.5. Uzun süreli muhafaza (kriyoprezervasyon) çalışmaları

Antioksidan maddelerin, kriyoprezervasyon uygulanmasına etkisini tespit etmede, kriyoprezervasyon prosedürü Figueroa vd., (2013) ve Merino vd., (2011) tarafından önerilen yöntemler temel alınmış ve optimize edilmiştir. 3-4 yaşında 10 adet CD dişi bireyin (ortalama 52,4±3,2 cm uzunluğunda, ortalama 1933,0±260,5 g ağırlığında),

gonadları çıkartılıp kan damarlarından arındırılmıştır. Gonadlar bisturi ile kesilerek 210 µm gözenekli plankton bezinden steril cam behere, bu kesitlerden süzülen semen örnekleri +4°C’de biriktirilmiştir. Motilite karakterleri birbirine benzer olan 5 bireyin örnekleri birleştirilmiş ve oluşturulan bu örnek kriyoprezervasyonda kullanılmıştır. Birleştirilmiş örnekten, her bir antioksidan madde için ve kontrol grubu için steril cam tüplere, 1:3 oranında Cortland çözeltisi ile sulandırılarak konulmuştur. Cortland çözeltisi, 32 mM NaCl, 2,1 mM CaCl₂, 96,6 mM KCl, 3,42 mM sodyum dihidrojenfosfat (NaH₂PO₄), 11,9 mM NaHCO₃, 0,933 mM MgSO₄.7H₂O, 5,55 mM glukoz, % 10 0,02 M glikol, % 10 0,02 M Tris içeren ve pH’sı 9,5 olan bir çözeltidir. Hücre yoğunluğu 40x10⁶ spermatozoa/mL olarak sulandırılan örnekler, 3 saat +4°C’de bekletilmiştir. Kriyoprezervasyon ortamı, % 40 sulandırılmış semen, % 10 dimetil sülfoksit (DMSO), % 50 normal erkek birey seminal plazması olacak şekilde hazırlanmış ve bu ortama derişimi 0,13 M süktroz ve % 2 BSA eklenmiştir. Antioksidan maddeler, derişimleri 25, 50 100 mg/L olacak şekilde DMSO içerisinde hazırlanmıştır. Normal erkek seminal plazması % 90’dan fazla motilite yüzdesine sahip bireylerden, semenin 13.000 rpm hızda 10 dakika 4°C’de iki kez santrifüjlenmesi ile elde edilmiştir. Vitrifikasyon sağlanırken, 50 µl kriyoprezervasyon ortamı, sıvı azot üzerine yerleştirilen -115°C olan alimünyum plaka üzerine damlatılmıştır. Yarım küre şeklinde olan her bir damla, 10 dakika sonra direkt olarak sıvı azot içine atılmıştır. Bu esnada, 1,8 mL hacimli kriyo-tüpler de azot içerisinde daldırılarak soğutulmuş ve her bir antioksidan için her bir derişimden 10 damla hazırlanarak bir kriyo-tüp içerisinde alınmıştır. Her bir antioksidanın farklı derişimleri için 5 kriyo-tüp hazırlanmıştır. 72 saat sıvı azot içerisinde bekletilen kriyo-tüpler, çözünme işlemi sırasında 10 saniye 25°C’de su banyosunda tutulmuştur. Çalışmada, sıcaklık kontrolleri, Hanna Instruments HI 955502 (Almanya) model -199,0°C ile +199,0°C ölçüm özelliğinde olan termometre ile sağlanmıştır.

2.2.6. Dölleme çalışmaları

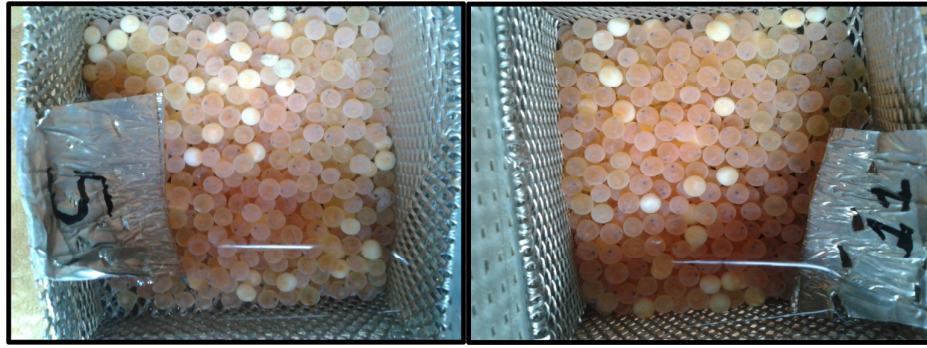
Her bir dölleme denemesinde en az 5 cinsel olgunluğa ulaşmış dişiden alınan yumurta örnekleri birleştirilmiştir. Yumurta örneklerinin su, kan, idrar veya feçes ile kontaminasyonu engellenmiştir. Dölleme çalışmaları, yumurta kalitesi

farklılıklarından kaynaklanabilecek durumları önlemek için, sezon ortası örneklemelerinde gerçekleştirilmiştir. Kısa süreli muhafazada, örnekler hedef sulandırıcılar ile muamele edildikten 6 saat sonra dölleme işlemlerinde kullanılmıştır. Dölleme çalışmalarında, motilite karakteristikleri tayinlerinde de kullanılan pH= 9,0 aktivasyon çözeltisi (Lahnsteiner, 2000) kullanılmıştır.

Her bir dölleme tekrarı 500 ± 15 yumurtadan oluşmuştur. Her bir sulandırıcı grubu için, dölleme denemeleri 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Kısa süreli muhafaza sonrası dölleme çalışmalarında, antioksidan ilave edilmemiş SSP ile sulandırılmış örnek, sulandırılmamış CD dişi birey testiküler semen örneği, normal erkek bireyden sağım yoluyla alınmış örnek olarak 3 farklı kontrol grubu oluşturulmuştur. Kriyoprezervasyon çalışmalarında, antioksidan içerikli örnekler yanında, antioksidan ilave edilmemiş kriyoprezervasyon ortamı ile sulandırılmış CD dişi spermi ve normal erkek spermi kontrol grupları olarak kullanılmıştır. Kısa süreli muhafaza çalışmalarında yumurta:sperm oranı $8,5 \times 10^6$ spermatozoa/yumurta, kriyoprezervasyon çalışmalarında ise 17×10^6 spermatozoa/yumurta olarak ayarlanmıştır (Lahnsteiner ve Weismann, 1999; Robles vd., 2009; Herráez vd., 2009). Birleştirilen yumurtalar, dölleme kaplarına ayrılırken dölleme işleminden 2-4 dakika önce ovaryum sıvılarından arındırılmıştır ve aktivasyon çözeltisinin $+4^{\circ}\text{C}$ 'de olmasına dikkat edilmiştir (Scheerer ve Thorgaard 1989). Kuru dölleme tekniğine uygun olarak gerçekleştirilen dölleme işleminden sonra, yumurtalar yıkanarak inkübasyon dolaplarına alınmıştır. Dölleme çalışmalarının yapıldığı günden sonraki 8. günde, asetik asit:metanol:saf su (1:1:1) içeren yumurta fiksasyon çözeltisine (Scheerer ve Thorgaard, 1989) alınan döllemiş yumurtaların incelenmesi ile dölleme oranı (%), 15. ve 17. günde gözlenmiş yumurtaların sayımı ile gözlenmiş yumurta oranı (%), 25. ve 27. günde yumurtadan çıkış oranı (%) belirlenmiştir (Şekil 2.3. ve 2.4.).



Şekil 2.3. Dölleme oranların belirlenmesinde yumurta fiksasyon solüsyonu ile muamele edilen örnekler ve yumurtaların sayımı



Şekil 2.4. Kuluçka dolaplarına, döllenmiş yumurtaların takibi için kurulan sistemdeki örnekler

2.2.7. DNA hasar (Comet) analizleri

DNA hasarının tespiti tek hücre jel elektroforezi (Comet analizi) tekniği ile gerçekleştirilmiştir. Bu teknik ile hem CD diş alabalık testiküler spermelerindeki hem de kriyoprezervasyon sonrası DNA hasarları tespit edilmiştir. Temel olarak Singh vd., (1998) tarafından geliştirilen alkali metodunu optimize edilerek ve Cabrita vd., (2005) tarafından önerilen hücre süspansiyonu değerlendirilerek örnekler uygulanmıştır.

Bu metod 7 basamaktan oluşmaktadır; 1) Sperm hücrelerinin süspansiyonda elde edilmesi, 2) Lamların hazırlanması, 3) Liziz, 4) DNA zincirinin çözülmesi, 5) Elektroforez, 6) Nötralizasyon, 7) Boyama ve değerlendirme.

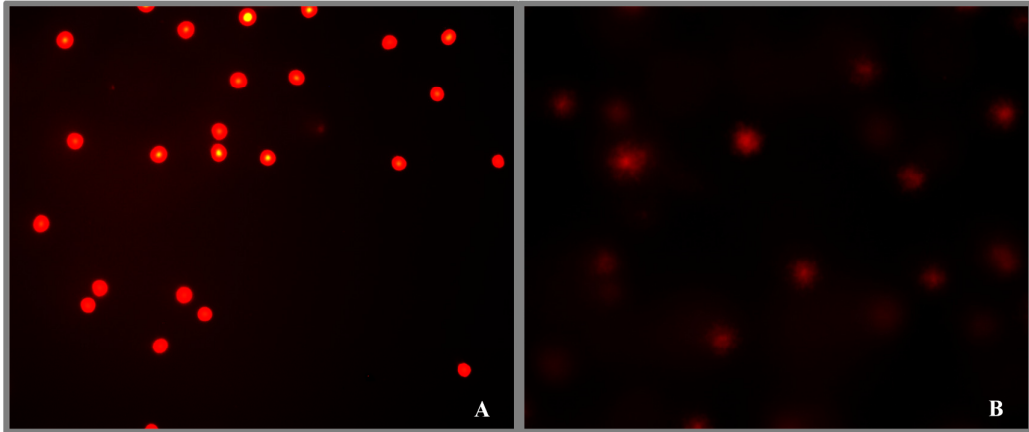
Gerek taze sperm örnekleri gerek ise kriyoprezervasyon sonrası çözünmüş örnekler, seminal sıvı mineral çözeltisi (109,7 mM NaCl, 28,2 mM KCl, 1,2 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,7 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 10 mM Bisin [2-(Bis(2-hidroksietil)amino)

asetik asit], 10 mM HEPES) (Billard, 1983) ile derişimi $8-10 \times 10^6$ spermatozoa/mL olacak şekilde sulandırılmıştır (Cabrita vd., 2005). Örneklerin inceleneyeceği lamalar üzerine, Dremel 3000 (Avusturya) el motoru ile normal agaroz jel için kare şeklinde tutunma yüzeyi oluşturulmuştur. Bu lamalar üzerindeki her bir kare üzerine, bir gün önceden 150 µl % 1 normal kaynama dereceli agaroz dökülmüş, lamel yardımı ile düzleştirilmiş ve +4°C’de saklanmıştır. Örnekler, 37°C’de su banyosunda, 1:10 oranında düşük kaynama dereceli agaroz ile karıştırılarak, lam üzerindeki normal kaynama dereceli agaroz üzerine dökülmüş ve lamel yardımı ile yüzeyi düzleştirilmiştir. Üzerlerinde örnek bulunan lamalar, cam şalelere konularak +4°C’de 15 dakika tutulmuştur. Daha sonra üzerlerine +4°C’de bulunan liziz çözeltisi (2,5 M NaCl, 100 mM etilendiamin tetraasetik asit (EDTA), 10 mM Trizma Baz ve % 1 Triton X-100) dökülerek +4°C’de 50 dakika liziz için bekletilmiştir. Liziz çözeltisinden çıkartılan lamalar, +4°C olan saf su ile dikkatlice yıkanır ve +4°C’ye soğutulmuş elektroforez çözeltisi (300 mM sodyum hidroksit (NaOH), 1 mM EDTA, pH >13) bulunan, elektroforez tankına (Uniscience Corp., ABD) alınmıştır. DNA sarmalının çözülmesi için, lamalar 25 dakika 4°C’deki elektroforez çözeltisi içerisinde bekletilmiştir. Lamalar, güç kaynağı (Consort EV261, Belçika) kullanılarak 300 mA ve 25 V’da 25 dakika eletroforeze maruz bırakılmıştır. Elektroforez sonrasında, lamaların üzerine +4°C olan nötralizasyon çözeltisi (45 mM Tris-HCl, 60 mM Trisma Baz, pH=7,5) damlatılmıştır. Lamalar üzerindeki her bir örnek bulunan bölgeye 40 µl 5 mg/L etidyum bromür dökülerek boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Örnekler 510-560 eksitasyon filtresi kullanılarak floresans mikroskopta incelenmiştir. İşlem sürecince örnekler ışıktan korunmuştur (Şekil 2.5).

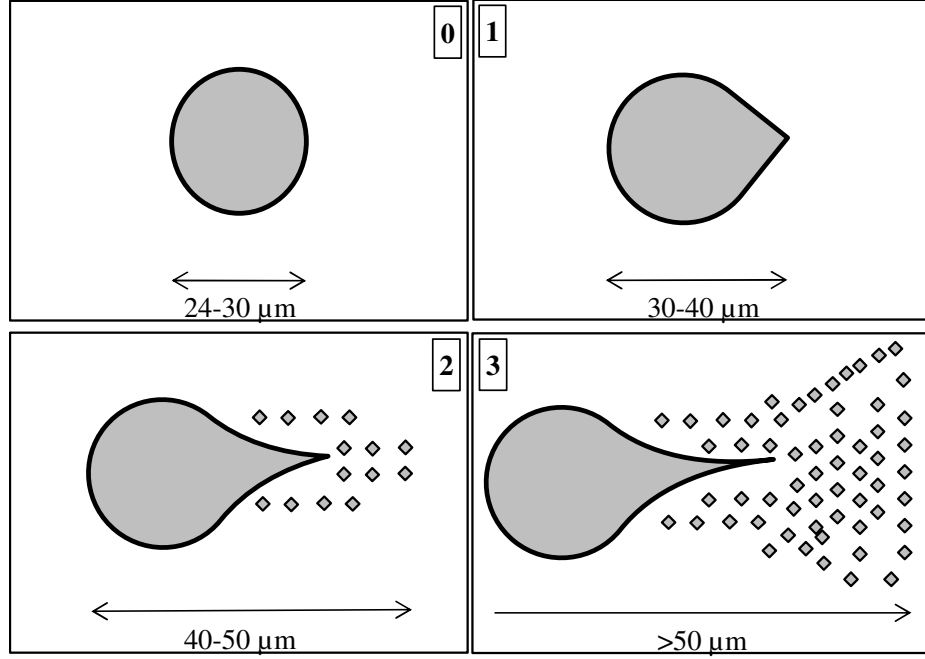
İncelenen örneklerde, hasarsız hücreler yuvarlak şekilde görülür ve non-migrasyon olarak değerlendirilmiştir (Şekil 2.6). Hasarlı hücreler ise, DNA kırıklıklarının, hasara bağımlı olarak düzensiz bir şekilde gösterdiği dağılmalara göre değerlendirilmiştir. Hasarsız hücreler “0” (24-30 µm), az hasarlı hücreler “1” (30-40 µm), hasarlı hücreler “2” (40-50 µm) ve en hasarlı hücreler “3” (>50 µm) olarak sınıflandırılmış (Şekil 2.7) ve yüzde DNA hasarları belirlenmiştir (Rigonato vd., 2005).



Şekil 2.5. Comet analizinde, lamaların hazırlanması (A), agoroz uygulaması için hazırlanmış lamaların görünümü (B) ve liziz aşaması sonrası üzerlerinde örnek bulunan lamaların elektroforez uygulaması (C)



Şekil 2.6. Comet analizi sonuçlarının görüntülenmesi, DNA hasarı olmayan hücreler (A) ve DNA hasarlı bir örneğin görünümü (B)



Şekil 2.7. Comet analizi sonunda hücrelerdeki DNA hasarının değerlendirilmesinin şematik gösterimi, hasarsız hücreler “0” (24-30 μm), az hasarlı hücreler “1” (30-40 μm), hasarlı hücreler “2” (40-50 μm) ve en hasarlı hücreler “3” (>50 μm)

2.2.8 İstatiksel analizler

Elde edilen seminal plazma parametrelerinde, farklı örnekleme büyüklüğü (n) ve Levene testi (O’neill ve Mathews, 2000) ile belirlenen eşit olmayan varyanslar sebebiyle çoklu karşılaştırma Kruskal Wallis ve ikili karşılaştırma Mann–Whitney U parametrik olmayan testleri kullanılmıştır (Mann ve Whitney, 1947). Örneklem büyüklükleri eşit yüzde ifadeler Arc-sinus transformasyonu uygulanarak, örnekleme büyüklükleri eşit diğer ölçümler normalize edilerek, varyans analizi (ANOVA) sonrasında önemli farklılık gösteren gruplarda ikili karşılaştırma için Tukey’s HSD testi ile farklılıklar gösterilmiştir (Kirk, 1968).

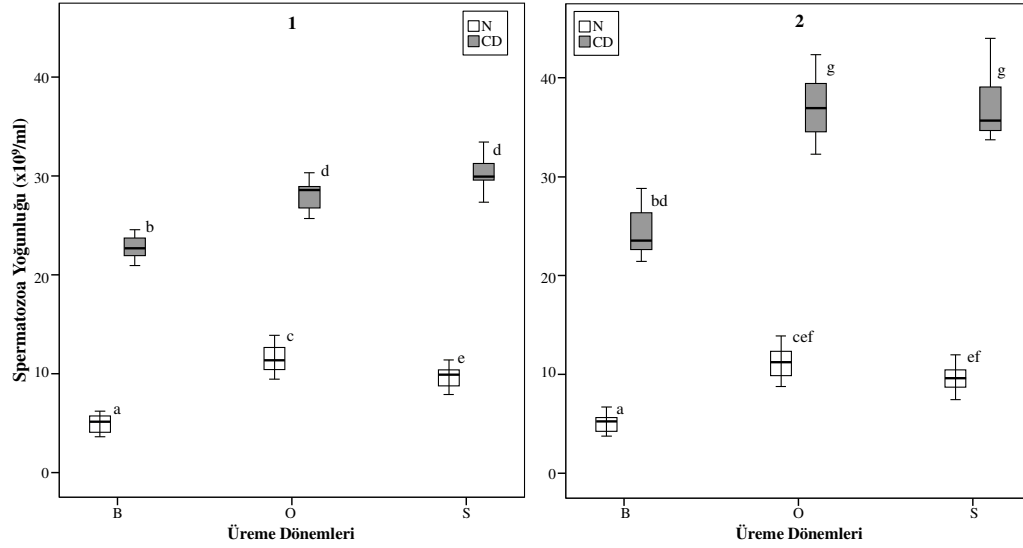
3. BULGULAR

İncelenen 1. ve 2. üreme sezonlarında sezon başlangıcı (B), ortası (O) ve sonu (S) dönemlerinde CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinden alınan örneklerin sperm yoğunlukları incelenmiş, seminal plazma pH ve ozmolarite değerleri ölçülmüştür. Seminal plazmanın içerdiği iyon ve metabolitlerin belirlenmesi amacıyla, Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} iyonlarının ve glukoz, kolesterol, üre ve trigliserit metabolitlerinin derişimleri belirlenmiştir. Seminal plazma protein içerikleri Bradford yöntemiyle belirlenmiştir. Oksidatif hasarın bir göstergesi olarak lipit peroksidasyonu değerleri ve antioksidatif durumun göstergesi olarak toplam antioksidan kapasitesi değerleri hesaplanmıştır. Enzimatik bir antioksidan olan katalazın aktivite değerleri belirlenmiştir. Seminal plazmaların FTIR spektrumları incelenmiş, seminal plazma yapısındaki fonksiyonel gruplar hakkında yorumlar yapılmıştır. Motilite karakterizasyonu amacıyla, doğrusal motilite süreleri ve % motilite değerleri ölçülmüştür. Kısa süreli muhafaza çalışmaları kapsamında, sulandırıcı çözeltinin pH değerinin ve sulandırma oranının etkileri incelenmiştir. Sonrasında ise, sulandırma çözeltilerine farklı derişimlerde eklenen 6 antioksidanın motilite karakteristikleri ve dölleme özellikleri üzerine etkileri incelenmiştir. İncelenen 3. üreme sezonunda gerçekleştirilen uzun süreli muhafaza çalışmaları, kriyoprezervasyon sulandırıcısına farklı derişimlerde eklenen 6 antioksidan eklenerek gerçekleştirilmiştir. Kriyoprezervasyon sonrası çözülen örneklerin motilite karakteristikleri ve dölleme özellikleri incelenmiş, DNA hasarları belirlenmiştir.

3.1. Spermatozoa Yoğunluğu, Seminal Plazma pH ve Ozmolarite Değerlerinin Belirlenmesi

İncelenen 1. ve 2. üreme sezonları boyunca CD dişi ve N erkek alabalık bireylerin spermatozoa yoğunlukları, seminal plazma pH ve ozmolarite değerleri incelenmiştir.

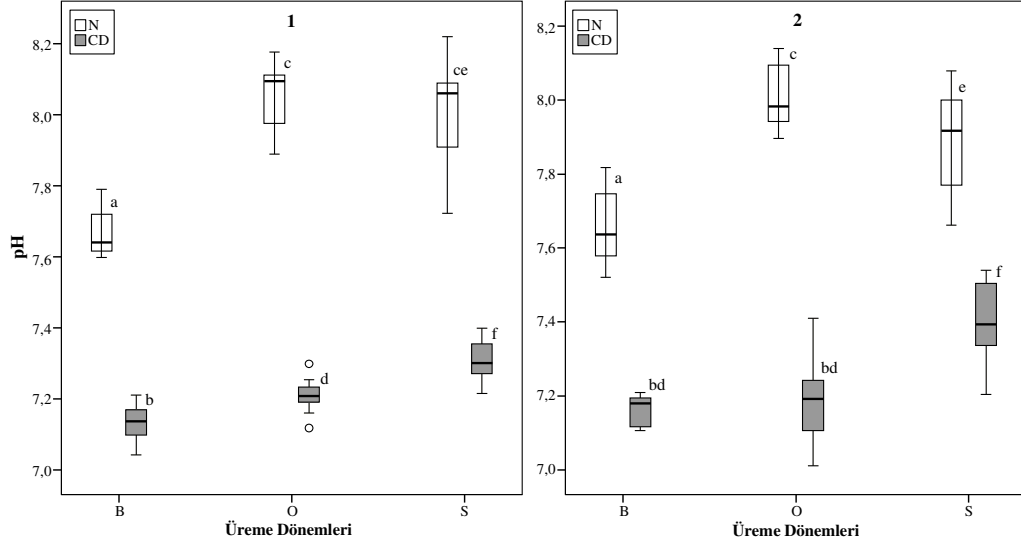
İncelenen 1. ve 2. üreme sezonlarının, sezon başlangıcı (B), ortası (O) ve sonu (S) dönemlerinde CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinden alınan örneklerde ölçümler yapılmıştır. İncelenen 1. ve 2. üreme sezonlarındaki CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinin spermatozoa yoğunlukları Şekil 3.1.'de verilmiştir. Bireyler arasındaki, üreme sezonları arasındaki ve sezon dönemleri arasındaki farklar istatistiksel olarak incelenmiş, şekil üzerindeki farklı harfler grup farklılıklarını göstermektedir ($P < 0,05$).



Şekil 3.1. İncelenen üreme sezonları sezon başlangıcı (B), ortası (O) ve sonu (S) dönemlerinde CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinin spermatozoa yoğunlukları (x10⁹/mL) ($P < 0,05$)

CD dişi alabalık bireyleri için, sırayla sezon başlangıcı, ortası ve sonu dönemleri ortalama spermatozoa yoğunlukları 1. üreme sezonunda 22,77±1,05; 28,11±1,5 ve 30,44±1,75 x10⁹/mL; 2. üreme sezonunda 25,15±3,01; 36,83±2,94 ve 37,09±3,30 x10⁹/mL olarak belirlenmiştir. N erkek alabalık bireyleri için, sırayla sezon başlangıcı, ortası ve sonu dönemleri ortalama spermatozoa yoğunlukları 1. üreme sezonunda 4,97±0,97; 11,55±1,42 ve 9,73±0,95x10⁹/mL; 2. üreme sezonunda 5,07±0,87; 11,14±1,59 ve 9,68±1,19x10⁹/mL olarak belirlenmiştir. İncelenen her iki üreme sezonunda tüm sezon dönemleri için CD dişi alabalık bireylerinin spermatozoa yoğunluklarının N erkek alabalık bireylerinkinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir ($P < 0,05$). Ayrıca, tüm bireyler için en yüksek spermatozoa yoğunlukları sezon ortası döneminde kaydedilmiştir.

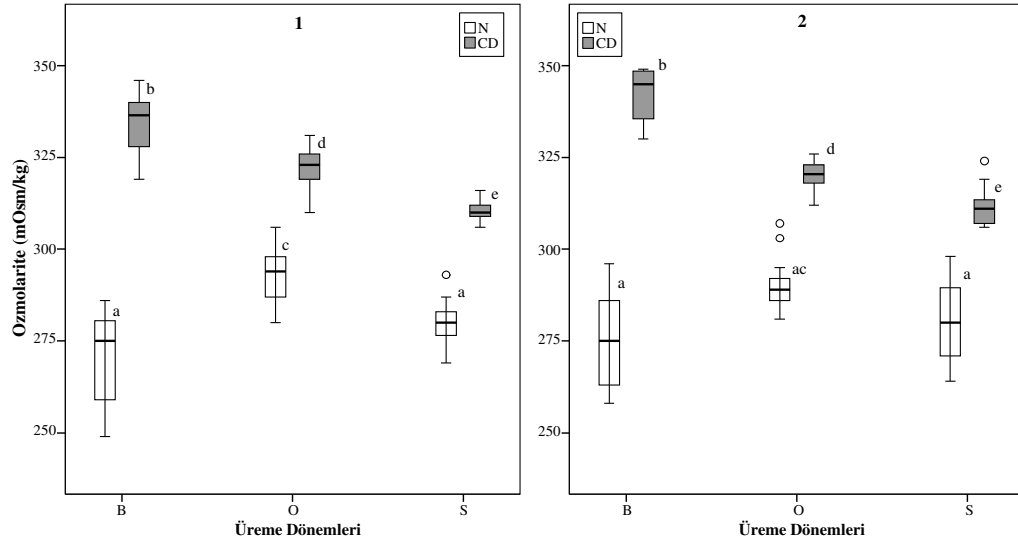
İncelenen 1. ve 2. üreme sezonlarındaki CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinin seminal plazma pH değerleri Şekil 3.2.'de verilmiştir. Bireyler arasındaki, üreme sezonları arasındaki ve sezon dönemleri arasındaki farklar istatistiksel olarak incelenmiş, şekil üzerindeki farklı harfler grup farklılıklarını göstermektedir ($P < 0,05$).



Şekil 3.2. İncelenen üreme sezonları sezon başlangıcı (B), ortası (O) ve sonu (S) dönemlerinde CD dişi ve N erkek alabalık bireylerin seminal plazma pH değerleri ($P < 0,05$)

CD dişi alabalık bireyleri için, sırayla sezon başlangıcı, ortası ve sonu dönemleri ortalama seminal plazma pH değerleri 1. üreme sezonunda $7,14 \pm 0,05$; $7,21 \pm 0,04$ ve $7,31 \pm 0,06$; 2. üreme sezonunda $7,16 \pm 0,05$; $7,18 \pm 0,11$ ve $7,40 \pm 0,10$ olarak belirlenmiştir. N erkek alabalık bireyleri için, sırayla sezon başlangıcı, ortası ve sonu dönemleri ortalama seminal plazma pH değerleri 1. üreme sezonunda $7,67 \pm 0,07$; $8,04 \pm 0,10$ ve $8,00 \pm 0,14$; 2. üreme sezonunda $7,66 \pm 0,10$; $8,01 \pm 0,09$ ve $7,89 \pm 0,14$ olarak belirlenmiştir. N erkek alabalık bireyleri için pH değerleri sezon ortasında, sezon başı ve sonu dönemlerine göre daha yüksek ortalamada iken, CD dişi alabalık bireyleri için ise pH değerlerinde sezon başından sonuna doğru göreceli olarak bir artış gözlenmiştir.

İncelenen 1. ve 2. üreme sezonlarındaki CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinin ozmolarite değerleri Şekil 3.3.'de verilmiştir. Bireyler arasındaki, üreme sezonları arasındaki ve sezon dönemleri arasındaki farklar istatistiksel olarak incelenmiş, şekil üzerindeki farklı harfler grup farklılıklarını göstermektedir ($P < 0,05$).



Şekil 3.3. İncelenen üreme sezonları sezon başlangıcı (B), ortası (O) ve sonu (S) dönemlerinde CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinin ozmolarite (mOsm/kg) değerleri ($P < 0,05$)

CD dişi alabalık bireyleri için, sırayla sezon başlangıcı, ortası ve sonu dönemleri ortalama seminal plazma ozmolarite değerleri 1. üreme sezonunda 335 ± 8 ; 322 ± 6 ve 310 ± 3 mOsm/kg; 2. üreme sezonunda 342 ± 8 ; 320 ± 4 ve 311 ± 5 mOsm/kg olarak belirlenmiştir. N erkek alabalık bireyleri için, sırayla sezon başlangıcı, ortası ve sonu dönemleri ortalama seminal plazma ozmolarite değerleri 1. üreme sezonunda 271 ± 13 ; 293 ± 7 ve 280 ± 6 mOsm/kg; 2. üreme sezonunda 276 ± 13 ; 290 ± 7 ve 280 ± 11 mOsm/kg olarak belirlenmiştir. Ozmolarite değerleri incelendiğinde, her iki üreme sezonunda da tüm sezon bölgeleri için CD dişi alabalık bireylerinin ozmolarite değerlerinin N erkek alabalık bireylerinkinden yüksek olduğu belirlenmiştir. CD dişi alabalık bireylerinin ozmolarite değerleri her iki üreme sezonunda da sezon ilerledikçe azalmaktadır. N erkek alabalık bireylerinde ise, en yüksek ozmolarite değerleri her iki üreme sezonunda da sezon ortası döneminde gözlenmektedir.

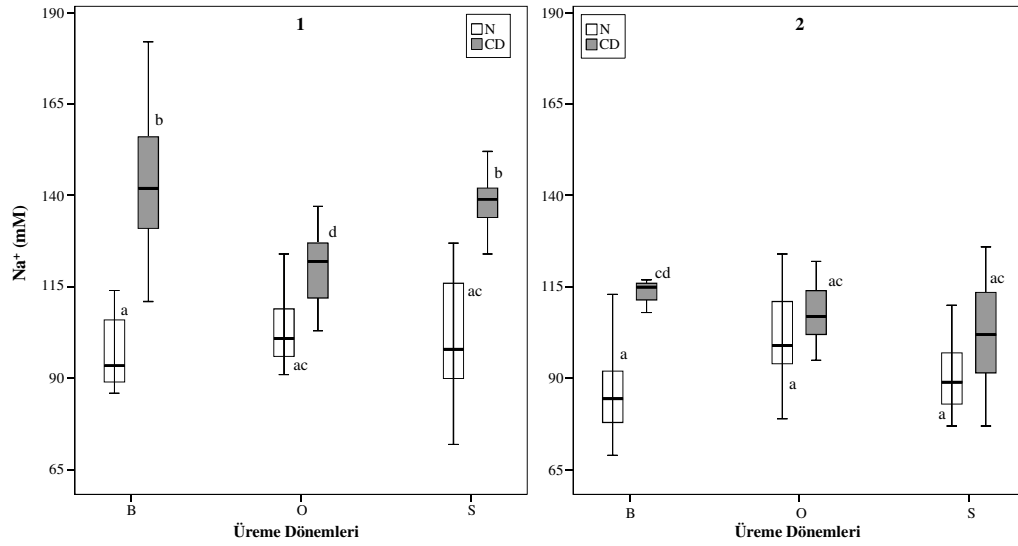
3.2. Seminal Plazma İyon ve Metabolit İçeriklerinin Belirlenmesi

İncelenen 1. ve 2. üreme sezonları boyunca CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinin seminal plazmada bulunan Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} iyonlarının derişimleri incelenmiştir. İncelenen 1. ve 2. üreme sezonları boyunca CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinin seminal plazma glukoz, kolesterol, üre ve trigliserit derişimleri

ölçülmüş, ortalama değerler verilmiştir. İncelenen her iki üreme sezonu boyunca tüm sezon dönemleri için CD dişi alabalık bireylerinin iyon derişimleri N erkek alabalık bireylerinkine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

3.2.1. Seminal plazma Na⁺ derişimleri

İncelenen 1. ve 2. üreme sezonları boyunca sezon dönemlerinde CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinin seminal plazma Na⁺ derişimleri Şekil 3.4.'de verilmiştir. Bireyler arasındaki, üreme sezonları arasındaki ve sezon dönemleri arasındaki farklar istatistiksel olarak incelenmiş, şekil üzerindeki farklı harfler grup farklılıklarını göstermektedir ($P < 0,05$).



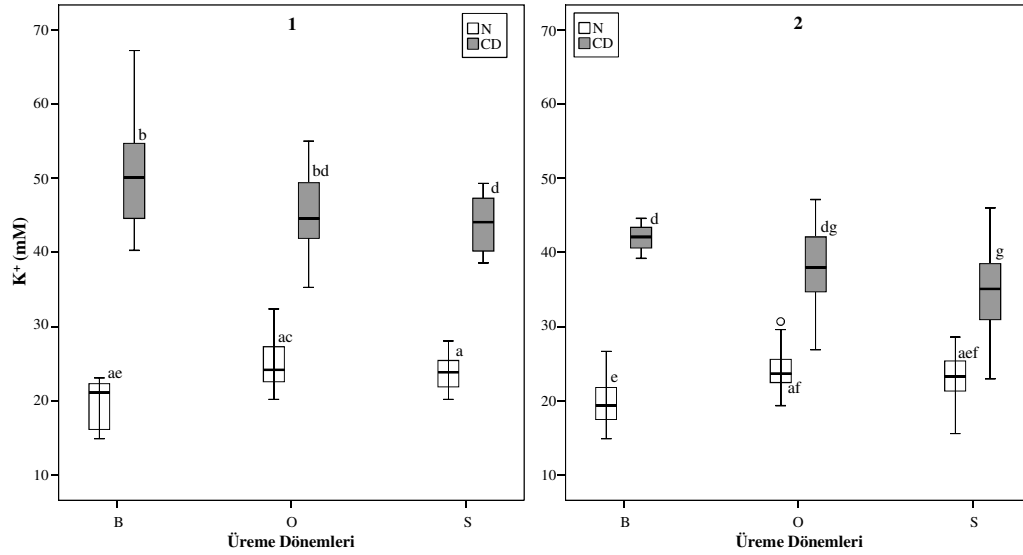
Şekil 3.4. İncelenen üreme sezonları sezon başlangıcı (B), ortası (O) ve sonu (S) dönemlerinde CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinin Na⁺ derişimleri (mM) ($P < 0,05$)

CD dişi alabalık bireyleri için, sırayla sezon başlangıcı, ortası ve sonu dönemleri ortalama seminal plazma Na⁺ derişimleri 1. üreme sezonunda $145,0 \pm 20,0$; $119,8 \pm 9,9$ ve $139,0 \pm 7,6$; 2. üreme sezonunda $113,6 \pm 3,4$; $107,2 \pm 7,9$ ve $101,7 \pm 14,9$ mM olarak belirlenmiştir. N erkek alabalık bireyleri için, sırayla sezon başlangıcı, ortası ve sonu dönemleri ortalama seminal plazma Na⁺ derişimleri 1. üreme sezonunda $97,1 \pm 10,2$; $104,2 \pm 10,2$ ve $101,2 \pm 17,0$; 2. üreme sezonunda $87,8 \pm 13,2$; $101,1 \pm 12,2$ ve $90,5 \pm 9,5$ mM olarak belirlenmiştir. İncelenen her iki üreme sezonu için tüm sezon dönemlerinde CD dişi alabalık bireylerinin seminal plazma Na⁺ derişimlerinin N

erkek alabalık bireylerinininkinden yüksek olduğu belirlenmiştir. Na^+ derişimleri her iki üreme sezonunda CD diş alabalık bireyleri için sezon başında en yüksek değere sahipken, N erkek alabalık bireyleri için sezon ortasında en yüksek değere sahip olduğu belirlenmiştir.

3.2.2. Seminal plazma K^+ derişimleri

İncelenen 1. ve 2. üreme sezonları boyunca sezon dönemlerinde CD diş ve N erkek alabalık bireylerinin seminal plazma K^+ derişimleri Şekil 3.5.'de verilmiştir. Bireyler arasındaki, üreme sezonları arasındaki ve sezon dönemleri arasındaki farklar istatistiksel olarak incelenmiş, şekil üzerindeki farklı harfler grup farklılıklarını göstermektedir ($P < 0,05$).



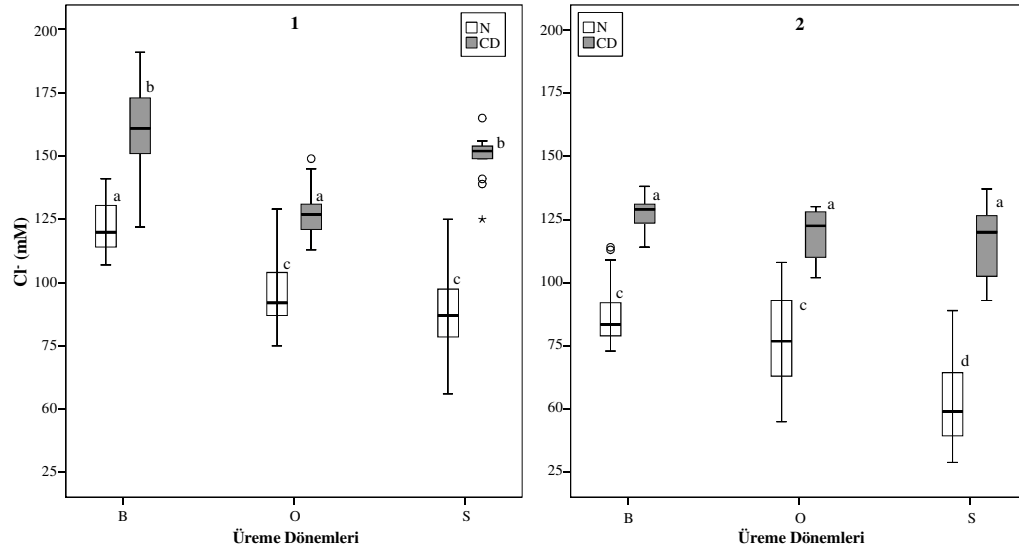
Şekil 3.5. İncelenen üreme sezonları sezon başlangıcı (B), ortası (O) ve sonu (S) dönemlerinde CD diş ve N erkek alabalık bireylerinin K^+ derişimleri (mM) ($P < 0,05$)

CD diş alabalık bireyleri için, sırayla sezon başlangıcı, ortası ve sonu dönemleri ortalama seminal plazma K^+ derişimleri 1. üreme sezonunda $51,4 \pm 7,4$; $44,9 \pm 5,4$ ve $43,7 \pm 3,9$; 2. üreme sezonunda $42,0 \pm 2,1$; $38,1 \pm 6,4$ ve $34,0 \pm 6,3$ mM olarak belirlenmiştir. N erkek alabalık bireyleri için, sırayla sezon başlangıcı, ortası ve sonu dönemleri ortalama seminal plazma K^+ derişimleri 1. üreme sezonunda $19,7 \pm 3,4$; $25,2 \pm 3,5$ ve $23,8 \pm 2,4$; 2. üreme sezonunda $19,7 \pm 3,3$; $24,4 \pm 3,0$ ve $22,9 \pm 3,2$ mM olarak belirlenmiştir. İncelenen her iki üreme sezonu için tüm sezon dönemlerinde

CD dişi alabalık bireylerinin seminal plazma K^+ derişimlerinin N erkek alabalık bireylerinininkinden yüksek olduğu belirlenmiştir. K^+ derişimleri her iki üreme sezonunda CD dişi alabalık bireyleri için sezon başında en yüksek değere sahipken, N erkek bireyler için sezon ortasında en yüksek değere sahip olduğu belirlenmiştir.

3.2.3. Seminal plazma Cl^- derişimleri

İncelenen 1. ve 2. üreme sezonları boyunca sezon dönemlerinde CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinin seminal plazma Cl^- derişimleri Şekil 3.6.'da verilmiştir. Bireyler arasındaki, üreme sezonları arasındaki ve sezon dönemleri arasındaki farklar istatistiksel olarak incelenmiş, şekil üzerindeki farklı harfler grup farklılıklarını göstermektedir ($P < 0,05$).



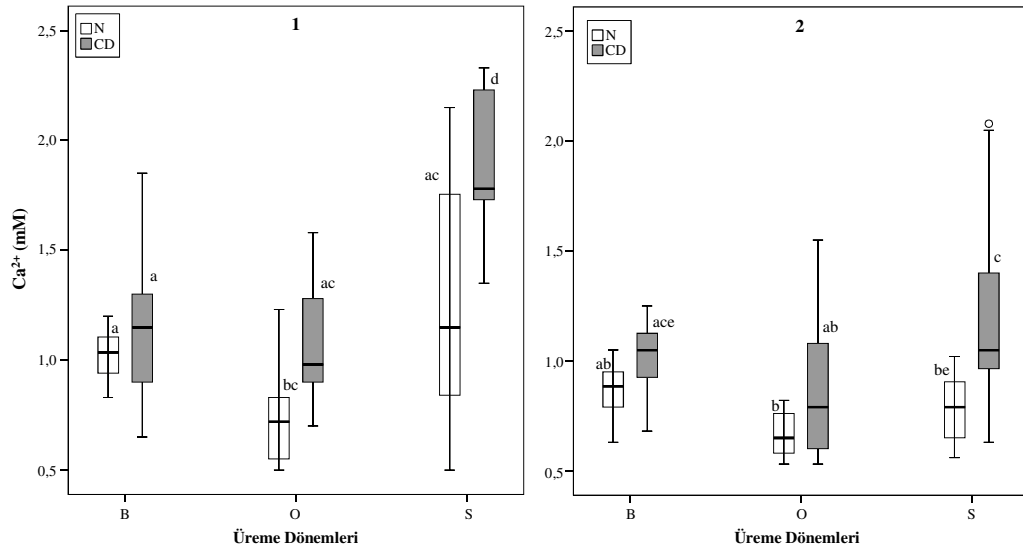
Şekil 3.6. İncelenen üreme sezonları sezon başlangıcı (B), ortası (O) ve sonu (S) dönemlerinde CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinin Cl^- derişimleri (mM) ($P < 0,05$)

CD dişi alabalık bireyleri için, sırayla sezon başlangıcı, ortası ve sonu dönemleri ortalama seminal plazma Cl^- derişimleri 1. üreme sezonunda $161,4 \pm 19,2$; $127,4 \pm 10,4$ ve $149,3 \pm 9,8$; 2. üreme sezonunda $127,1 \pm 7,7$; $119,6 \pm 9,7$ ve $115,6 \pm 14,2$ mM olarak belirlenmiştir. N erkek alabalık bireyleri için, sırayla sezon başlangıcı, ortası ve sonu dönemleri ortalama seminal plazma Cl^- derişimleri 1. üreme sezonunda $122,1 \pm 11,5$; $95,8 \pm 15,6$ ve $89,9 \pm 18,7$ mM; 2. üreme sezonunda $88,3 \pm 14,0$; $77,2 \pm 19,4$ ve $53,4 \pm 18,4$ mM olarak belirlenmiştir. İncelenen her iki üreme sezonu boyunca hem

CD dişi hem de N erkek alabalık bireyleri için en yüksek Cl^- derişimleri sezon başı döneminde gözlenmiştir.

3.2.4. Seminal plazma Ca^{2+} derişimleri

İncelenen 1. ve 2. üreme sezonları boyunca sezon dönemlerinde CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinin seminal plazma Ca^{2+} derişimleri Şekil 3.7.'de verilmiştir. Bireyler arasındaki, üreme sezonları arasındaki ve sezon dönemleri arasındaki farklar istatistiksel olarak incelenmiş, şekil üzerindeki farklı harfler grup farklılıklarını göstermektedir ($P < 0,05$).

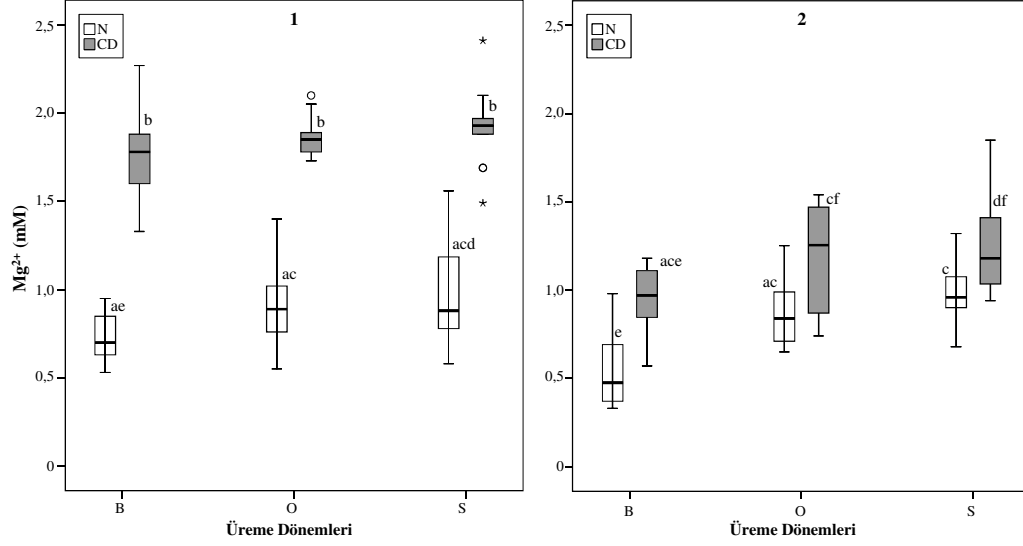


Şekil 3.7. İncelenen üreme sezonları sezon başlangıcı (B), ortası (O) ve sonu (S) dönemlerinde CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinin Ca^{2+} derişimleri (mM) ($P < 0,05$)

CD dişi alabalık bireyleri için, sırayla sezon başlangıcı, ortası ve sonu dönemleri ortalama seminal plazma Ca^{2+} derişimleri 1. üreme sezonunda $1,15 \pm 0,32$; $1,09 \pm 0,29$ ve $1,91 \pm 0,31$; 2. üreme sezonunda $1,01 \pm 0,19$; $0,83 \pm 0,29$ ve $1,21 \pm 0,41$ mM olarak belirlenmiştir. N erkek alabalık bireyleri için, sırayla sezon başlangıcı, ortası ve sonu dönemleri ortalama seminal plazma Ca^{2+} derişimleri 1. üreme sezonunda $1,02 \pm 0,12$; $0,74 \pm 0,23$ ve $1,24 \pm 0,53$; 2. üreme sezonunda $0,87 \pm 0,11$; $0,67 \pm 0,11$ ve $0,78 \pm 0,14$ mM olarak belirlenmiştir. İncelenen tüm üreme sezonları için hem CD dişi hem de N erkek alabalık bireyleri için Ca^{2+} derişimleri geniş dağılım aralığı göstermesine rağmen, en yüksek Ca^{2+} derişimlerine sezon sonu dönemlerinde rastlanılmıştır.

3.2.5. Seminal plazma Mg^{2+} derişimleri

İncelenen 1. ve 2. üreme sezonları boyunca sezon dönemlerinde CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinin seminal plazma Mg^{2+} derişimleri Şekil 3.8.'de verilmiştir. Bireyler arasındaki, üreme sezonları arasındaki ve sezon dönemleri arasındaki farklar istatistiksel olarak incelenmiş, şekil üzerindeki farklı harfler grup farklılıklarını göstermektedir ($P < 0,05$).



Şekil 3.8. İncelenen üreme sezonları sezon başlangıcı (B), ortası (O) ve sonu (S) dönemlerinde CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinin Mg^{2+} derişimleri (mM) ($P < 0,05$)

CD dişi alabalık bireyleri için, sırayla sezon başlangıcı, ortası ve sonu dönemleri ortalama seminal plazma Mg^{2+} derişimleri 1. üreme sezonunda $1,76 \pm 0,26$; $1,86 \pm 0,12$ ve $1,91 \pm 0,22$; 2. üreme sezonunda $0,95 \pm 0,21$; $1,19 \pm 0,28$ ve $1,27 \pm 0,28$ mM olarak belirlenmiştir. N erkek alabalık bireyleri için, sırayla sezon başlangıcı, ortası ve sonu dönemleri ortalama seminal plazma Mg^{2+} derişimleri 1. üreme sezonunda $0,73 \pm 0,14$; $0,93 \pm 0,25$ ve $0,98 \pm 0,26$; 2. üreme sezonunda $0,56 \pm 0,22$; $0,88 \pm 0,20$ ve $0,97 \pm 0,15$ mM olarak belirlenmiştir.

3.2.6. Seminal plazma metabolit derişimleri

İncelenen 1. ve 2. üreme sezonları boyunca sezon dönemlerinde CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinin glukoz, kolesterol, üre ve trigliserit metabolitlerinin en düşük-en

yüksek değer aralıkları Çizelge 3.1.'de verilmiştir. Metabolit değişimleri analizlerinde, minimum tespit edilebilir değerler, glukoz için 5 mg/dL, kolesterol için 7 mg/dL, üre için 4,3 mg/dL, trigliserit için 7 mg/dL'dir.

Çizelge 3.1. İncelenen üreme sezonu sezon başlangıcı (B), ortası (O) ve sonu (S) dönemlerinde CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinin glukoz, kolesterol, üre ve trigliserit metabolitlerinin en düşük-en yüksek değer aralıkları

1. Üreme Sezonu				
	Metabolit	B (mg/dL)	O (mg/dL)	S (mg/dL)
N	Glukoz	<5	<5	<5
	Kolesterol	<7	<7	<7
	Üre	<4,3-6,3	<4,3	<4,3
	Trigliserit	<7-25	<7-21	<7-33
CD	Glukoz	<5-63	<5-16	<5-6
	Kolesterol	<7-46	<7-20	<7-14
	Üre	<4,3-14,8	<4,3-14	<4,3-4,9
	Trigliserit	16-55	<7-75	15-68
2. Üreme Sezonu				
	Metabolit	B (mg/dL)	O (mg/dL)	S (mg/dL)
N	Glukoz	<5	<5	<5
	Kolesterol	<7	<7	<7
	Üre	<4,3	<4,3	<4,3
	Trigliserit	<7-15	<7-25	<7-13
CD	Glukoz	<5-7	<5-7	<5-18
	Kolesterol	<7-8	<7-35	<7-21
	Üre	<4,3-6,2	<4,3-7	<4,3-11
	Trigliserit	13-21	13-58	11-55

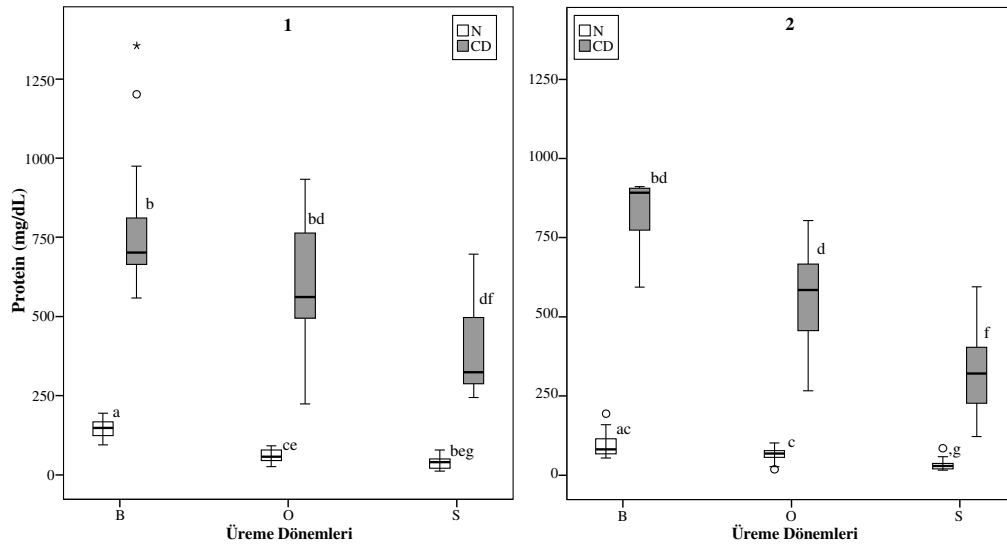
İncelenen 1. üreme sezonunda CD dişi alabalık bireyleri saptanan metabolit değerleri, 2. üreme sezonunda tespit edilenlere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. İncelenen 1. ve 2. üreme sezonları boyunca N erkek alabalık bireylerinde glukoz, kolesterol ve üre değerleri genel olarak en düşük tespit edilebilir değerlerin altında belirlenmiştir (sırasıyla <5, <7 ve <4,3 mg/dL). N erkek alabalık bireylerinde saptanan trigliserit değerlerinde ise, göreceli olarak sezon sonuna doğru artış gözlenmektedir. Genel olarak, söz konusu metabolitlerin CD dişi alabalık bireylerinde daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

3.3. Seminal Plazma Protein Derişimleri, Lipit Peroksidasyonu, Katalaz Aktivitesi ve Toplam Antioksidan Kapasitesi Değerlerinin Belirlenmesi

İncelenen 1. ve 2. üreme sezonlarında sezon dönemleri için CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinin Bradford yöntemiyle hesaplanan protein içeriklerinin ortalama değerleri verilmiştir. Lipit peroksidasyon değerleri, TBA reaktif substrat analizi ile ölçölmüş, sonuçlar nmol/mg protein olarak ifade edilmiştir. Katalaz aktivite ölçömleri, Goth metodu kullanılarak $(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24}$ ile oluşın kompleksten belirlenmiştir. Katalaz aktivitesi mg protein başına enzim ünitesi olarak ifade edilmiştir. Toplam antioksidan kapasitesi değerleri, Randox toplam antioksidan kiti kullanılarak ölçölmüştür.

3.3.1. Seminal plazma protein derişimleri

İncelenen 1. ve 2. üreme sezonları boyunca sezon dönemlerinde CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinin seminal plazma protein derişimleri Şekil 3.9.'da verilmiştir. Bireyler arasındaki, üreme sezonları arasındaki ve sezon dönemleri arasındaki farklar istatistiksel olarak incelenmiş, şekil üzerindeki farklı harfler grup farklılıklarını göstermektedir ($P < 0,05$).

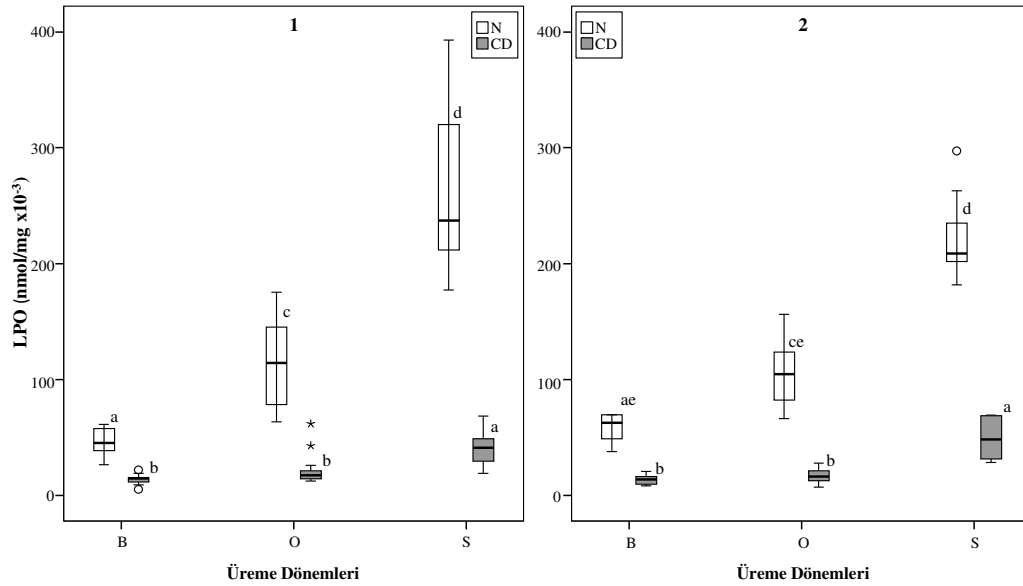


Şekil 3.9. İncelenen üreme sezonu sezon başlangıcı (B), ortası (O) ve sonu (S) dönemlerinde CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinin protein derişimleri (mg/dL) ($P < 0,05$)

CD dişi alabalık bireyleri için, sırayla sezon başlangıcı, ortası ve sonu dönemleri ortalama seminal plazma protein derişimleri 1. üreme sezonunda $777,3 \pm 191,0$; $610,8 \pm 204,8$ ve $399,0 \pm 161,7$; 2. üreme sezonunda $822,5 \pm 130,7$; $569,5 \pm 139,4$ ve $339,2 \pm 135,3$ mg/dL olarak belirlenmiştir. N erkek alabalık bireyleri için, sırayla sezon başlangıcı, ortası ve sonu dönemleri ortalama seminal plazma protein derişimleri 1. üreme sezonunda $145,6 \pm 32,6$; $60,7 \pm 20,6$ ve $38,6 \pm 19,6$; 2. üreme sezonunda $97,7 \pm 41$; $66,3 \pm 22,7$ ve $32,2 \pm 15,7$ mg/dL olarak belirlenmiştir. CD dişi alabalık bireylerinin protein derişimleri sezon dönemlerine göre kıyaslandığında, 2. üreme sezonu değerlerinin 1. üreme sezonu değerlerinden yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, CD dişi alabalık bireyleri için en yüksek protein derişimleri her iki üreme sezonu için de sezon başı dönemlerinde belirlenmiştir.

3.3.2. Seminal plazma lipit peroksidasyonu (LPO) değerleri

İncelenen 1. ve 2. üreme sezonları boyunca sezon dönemlerinde CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinin seminal plazma protein derişimleri Şekil 3.10.'da verilmiştir. Bireyler arasındaki, üreme sezonları arasındaki ve sezon dönemleri arasındaki farklar istatistiksel olarak incelenmiş, şekil üzerindeki farklı harfler grup farklılıklarını göstermektedir ($P < 0,05$).



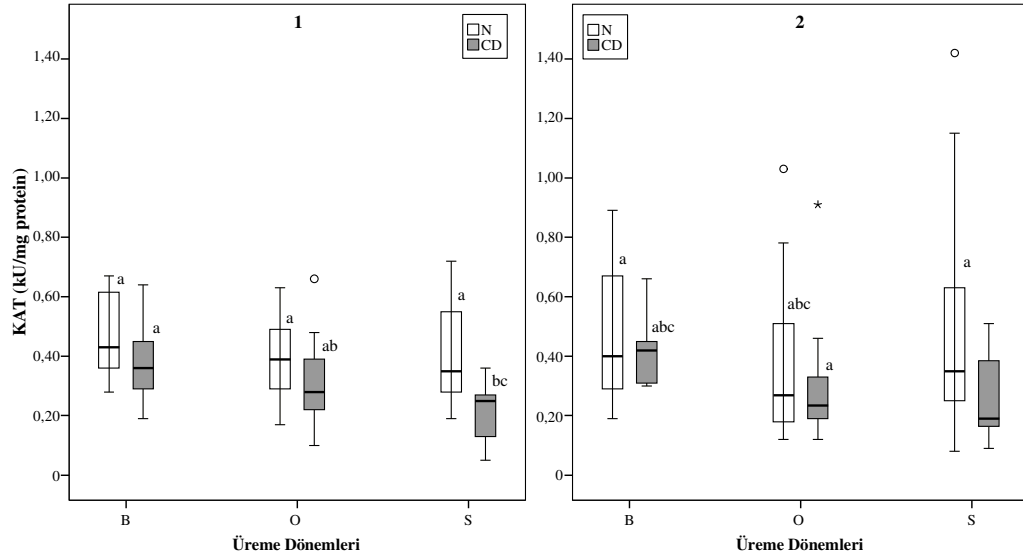
Şekil 3.10. İncelenen üreme sezonları sezon başlangıcı (B), ortası (O) ve sonu (S) dönemlerinde CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinin LPO değerleri (nmol/mg x 10⁻³) ($P < 0,05$)

CD dişi alabalık bireyleri için, sırayla sezon başlangıcı, ortası ve sonu dönemleri ortalama seminal plazma LPO değerleri 1. üreme sezonunda 14,01±3,81; 22,65±14,25 ve 41,00±12,05; 2. üreme sezonunda 13,87±4,98; 16,95±5,52 ve 48,49±17,31 nmol/mg x10⁻³ olarak belirlenmiştir. N erkek alabalık bireyleri için, sırayla sezon başlangıcı, ortası ve sonu dönemleri ortalama seminal plazma LPO değerleri 1. üreme sezonunda 46,33±12,05; 112,23±38,53 ve 270,02±70,64; 2. üreme sezonunda 58,63±13,36; 105,65±29,55 ve 222,86±37,91 nmol/mg x10⁻³ olarak belirlenmiştir. N erkek alabalık bireyleri için LPO değerlerinin CD dişi alabalık bireylerinkine göre oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. N erkek alabalık bireylerdeki LPO değerlerinin sezon ilerledikçe anlamlı artışlar gözlenmiştir. Ayrıca, N erkek alabalık bireyler için LPO değerleri sezon dönemlerine göre kıyaslandığında, 1. üreme sezonu değerlerinin 2. üreme sezonu değerlerinden yüksek olduğu belirlenmiştir.

3.3.3. Seminal plazma katalaz aktivite (KAT) değerleri

İncelenen 1. ve 2. üreme sezonları boyunca sezon dönemlerinde CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinin seminal plazma protein derişimleri Şekil 3.11.'de verilmiştir. Bireyler arasındaki, üreme sezonları arasındaki ve sezon dönemleri arasındaki farklar istatistiksel olarak incelenmiş, şekil üzerindeki farklı harfler grup farklılıklarını göstermektedir ($P < 0,05$).

CD dişi alabalık bireyleri için, sırayla sezon başlangıcı, ortası ve sonu dönemleri ortalama seminal plazma KAT aktivite değerleri 1. üreme sezonunda 0,37±0,11; 0,31±0,15 ve 0,21±0,10; 2. üreme sezonunda 0,43±0,15; 0,30±0,20 ve 0,26±0,14 kU/mg protein olarak belirlenmiştir. N erkek alabalık bireyleri için, sırayla sezon başlangıcı, ortası ve sonu dönemleri ortalama seminal plazma KAT aktivite değerleri 1. üreme sezonunda 0,47±0,15; 0,40±0,14 ve 0,43±0,17; 2. üreme sezonunda 0,45±0,22; 0,38±0,26 ve 0,47±0,32 kU/mg protein olarak belirlenmiştir. KAT aktivite değerlerinin her iki üreme sezonu boyunca tüm sezon dönemleri için N erkek alabalık bireylerinin KAT aktivite değerlerinin CD dişi alabalık bireylerinkinden yüksek olduğu belirlenmiştir.

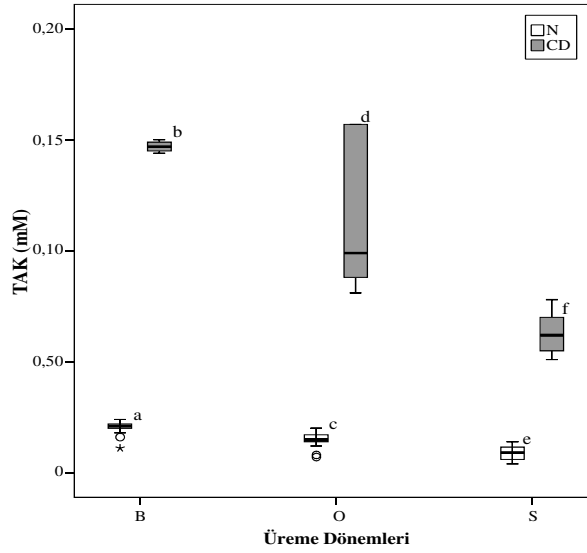


Şekil 3.11. İncelenen üreme sezonları sezon başlangıcı (B), ortası (O) ve sonu (S) dönemlerinde CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinin KAT aktivite değerleri (kU/mg protein) ($P < 0,05$)

3.3.4. Seminal plazma toplam antioksidan kapasite (TAK) değerleri

İncelenen 2. üreme sezonu boyunca sezon dönemlerinde CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinin seminal plazma toplam antioksidan kapasite değerleri Şekil 3.12.'de verilmiştir. Bireyler arasındaki, üreme sezonları arasındaki ve sezon dönemleri arasındaki farklar istatistiksel olarak incelenmiş, şekil üzerindeki farklı harfler grup farklılıklarını göstermektedir ($P < 0,05$).

İncelenen 2. üreme sezonu boyunca CD dişi alabalık bireyleri için, sırayla sezon başlangıcı, ortası ve sonu dönemleri ortalama seminal plazma TAK değerleri $0,147 \pm 0,002$; $0,116 \pm 0,033$ ve $0,063 \pm 0,009$ mM olarak belirlenmiştir. N erkek alabalık bireyleri için, sırayla sezon başlangıcı, ortası ve sonu dönemleri ortalama seminal plazma TAK değerleri $0,020 \pm 0,003$; $0,015 \pm 0,004$ ve $0,009 \pm 0,003$ mM olarak belirlenmiştir. CD dişi alabalık bireylerinin TAK değerlerinin sezon ilerledikçe anlamlı azalma gösterdiği ve ayrıca N erkek alabalık bireylerinin TAK değerlerine göre oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir ($P < 0,005$).

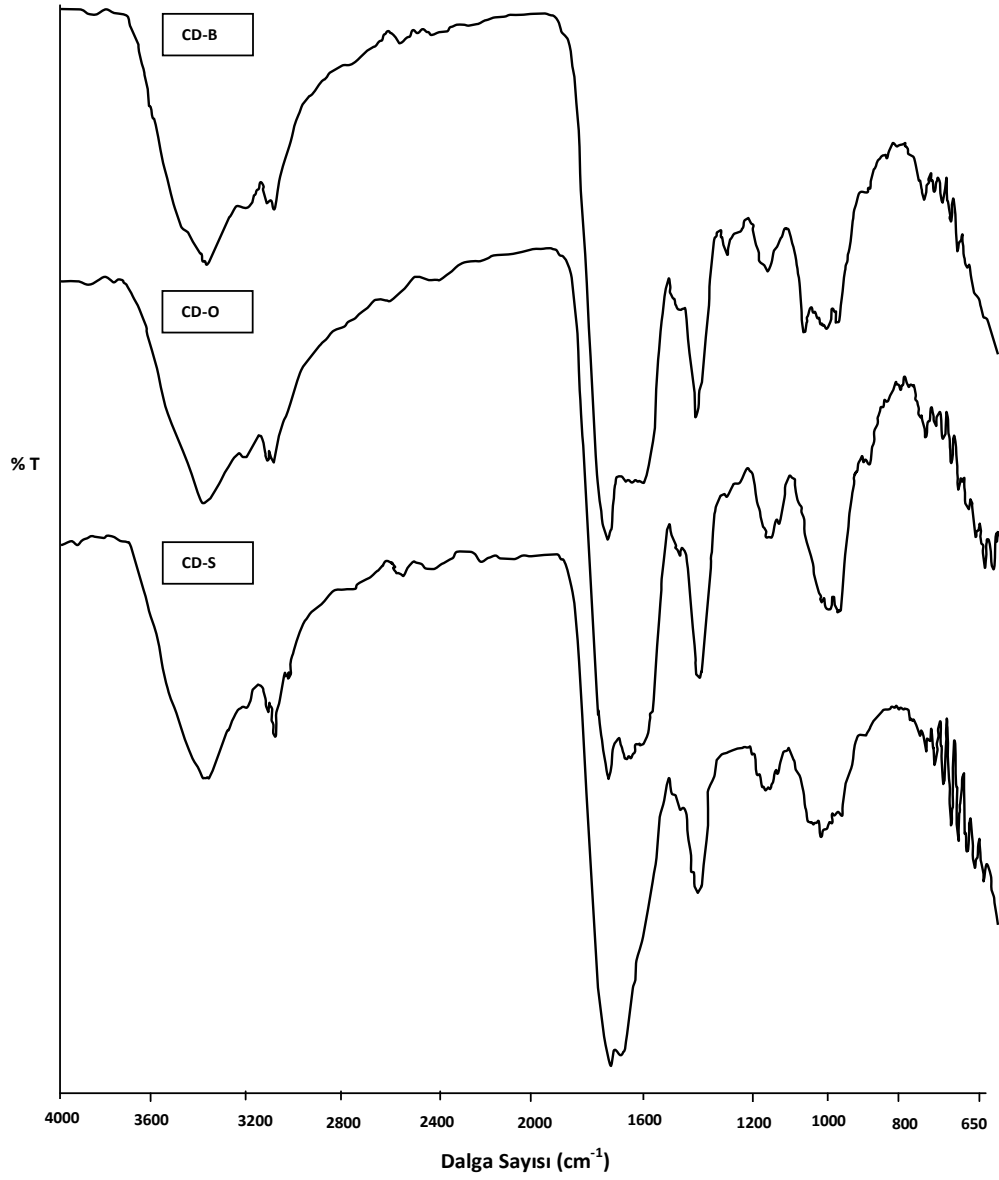


Şekil 3.12. İncelenen üreme sezonu başlangıcı (B), ortası (O) ve sonu (S) dönemlerinde CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinin TAK değerleri (mM) ($P < 0,05$)

3.4. Seminal Plazma FTIR Spektrumlarının İncelenmesi

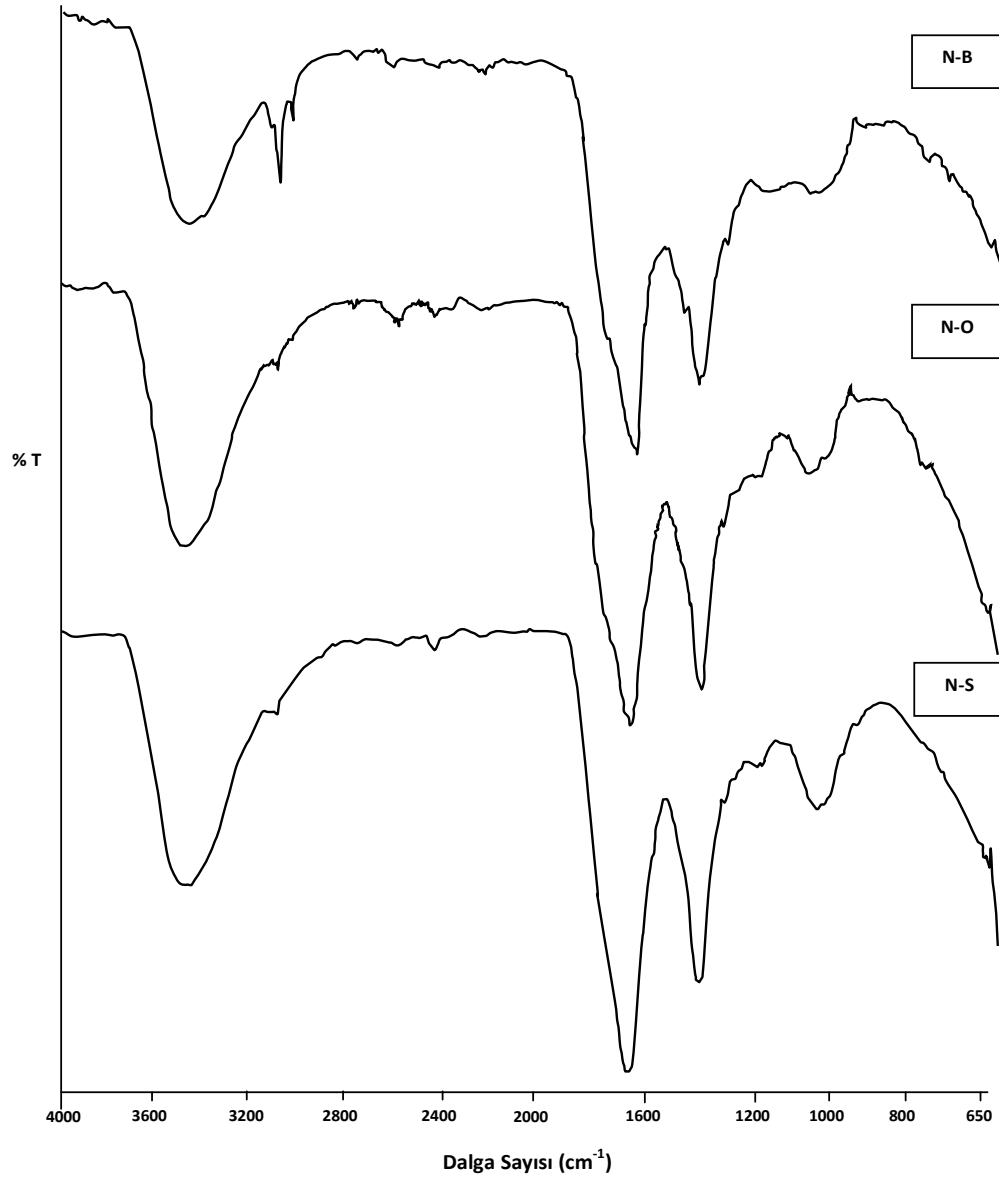
İncelenen 2. üreme sezonu boyunca CD dişi ve N erkek alabalık bireylerinden sezon başlangıcı, ortası ve sonu dönemlerinde alınan örneklerin FTIR spektrumları incelenmiştir. CD dişi alabalık bireyleri için sezon dönemlerine ait FTIR spektrumları Şekil 3.13.'de verilmiştir.

Şekil 3.13. incelendiğinde, CD dişi alabalık bireyleri için sezon başlangıcı, ortası ve sonu dönemlerinde alınan örneklerin spektrumları birbirine oldukça benzerdir. Aynı fonksiyonel gruplara ait bandlar gözlenmektedir. 3280 cm^{-1} civarında gözlenen geniş bandın O-H gerilme ya da N-H gerilme titreşimlerine ait olduğu düşünülmektedir. 1560 cm^{-1} 'de gözlenen band N-H eğilme titreşimlerine ait olabilir. 1078 ve 1125 cm^{-1} 'de gözlenen bandlar, sırayla C-O gerilmeleri ve C-O-H eğilmeleri olarak yorumlanabilir. Bu da, yapıda hem amin hem de alkollere ait hidroksil gruplarının olduğunu düşündürmektedir. 750 cm^{-1} 'de gözlenen band aromatik halka varlığına işaret etmektedir. 3060 ve 2960 cm^{-1} 'de gözlenen bandlar sırayla aromatik ve alifatik -C-H gerilme titreşimlerine aittir. Ayrıca, $1600-1400 \text{ cm}^{-1}$ civarında gözlenen bandlar aromatik C=C gerilme titreşimlerine aittir. Bu da, yapıda aromatik halka varlığını desteklemektedir.



Şekil 3.13. İncelenen üreme sezonu boyunca CD diş alabalık bireyleri için sezon dönemleri (B,O,S) FTIR spektrumları

N erkek alabalık bireyleri için dönemlerine ait FTIR spektrumları Şekil 3.14.'de verilmiştir.



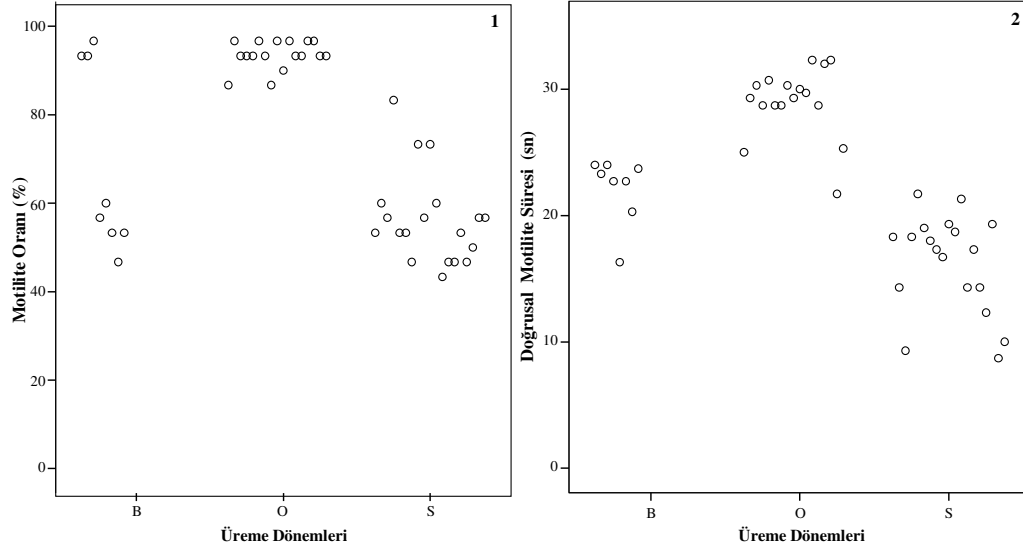
Şekil 3.14. İncelenen üreme sezonu boyunca N erkek alabalık bireyleri için sezon dönemleri (B,O,S) FTIR spektrumları

Şekil 3.14. incelendiğinde, N erkek alabalık bireyleri için sezon başlangıcı, ortası ve sonu dönemlerinde alınan örneklerin spektrumları 2900-2950 cm⁻¹ civarında gözlenen C-H gerilme piklerinin genişliği dışında birbirine oldukça benzerdir. CD dişi alabalık bireyleri için elde edilen spektrumlarla karşılaştırıldığında N erkek alabalık bireylerinin FTIR spektrumlarında daha az fonksiyonel gruba ait band gözlenmektedir. 3400 cm⁻¹ civarında gözlenen bandın N-H gerilme titreşimlerine ait olabileceği düşünülmektedir. 1582 cm⁻¹ 'de gözlenen band N-H eğilme titreşimlerine

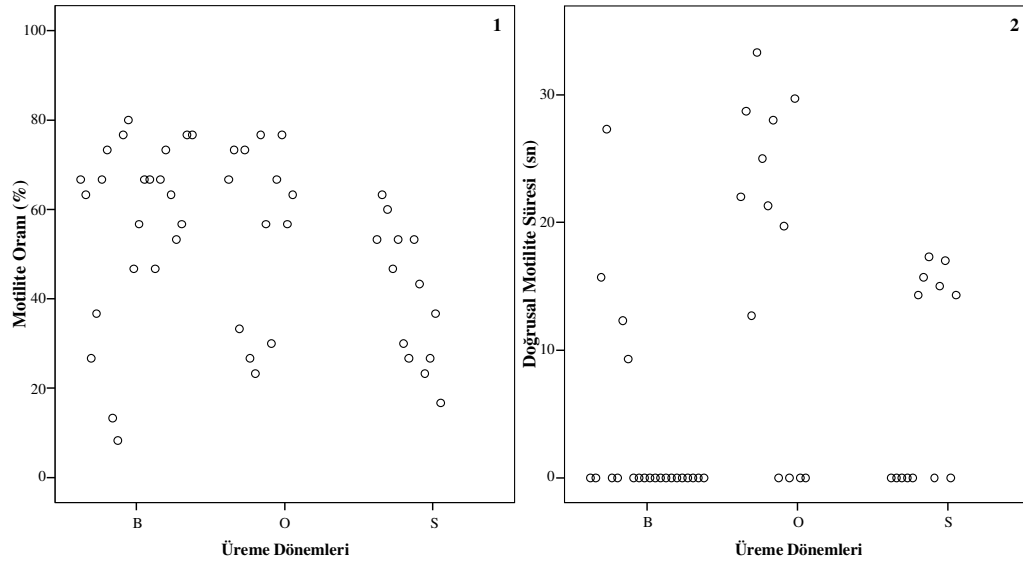
ait olabilir. Bu da, yapıda amin grubu bulunduğunu düşündürmektedir. 2915 cm^{-1} civarındaki band olası amin pikleri nedeniyle perdelenmekte, C-H gerilme titreşimlerini göstermektedir. 1400 cm^{-1} 'deki band C-H eğilme titreşimlerine aittir. 1700 cm^{-1} bölgesinde herhangi bir band gözlenmemesi karbonil grubu olmadığını ifade etmektedir. Benzer şekilde, $2100\text{-}2200\text{ cm}^{-1}$ bölgesinde band gözlenmemesi yapıda çifte bağlı C'ların ($\text{C}=\text{C}$) bulunmadığını göstermektedir.

3.5. Motilite Karakteristiklerinin İncelenmesi

Motilite karakteristiklerinin incelenmesi amacıyla, 1. ve 2. üreme sezonları boyunca sperm örneklerinin motilite oranları ve doğrusal motilite süreleri, her bir örnek alındıktan hemen sonra ivedilikle incelenmiştir. İncelenen 1. üreme sezonu boyunca sezon dönemleri için N erkek alabalık bireylerinin sperm motilite oranları ve doğrusal motilite süreleri Şekil 3.15.'te sunulmuştur. Genel olarak, N erkek alabalık bireylerinde, hem motilite oranları hem de doğrusal motilite süreleri üreme sezonu ortasında artış göstermiştir. Üreme sezonu ortasında tüm örneklerde, üreme sezonu başlangıcındaki bazı örneklerde $> \%90$ motilite oranları tespit edilmişken, üreme sezonu sonunda bu değerde örnek tespit edilmemiştir. Üreme sezonundaki örneklerde en düşük motilite oranı $\%43,3\pm5,8$ olarak kaydedilmiştir. Üreme sezonu başlangıcında kaydedilen en düşük ve en yüksek doğrusal motilite süre ortalamaları sırasıyla $16,3\pm0,6$ ve $24,0\pm1,0$ sn iken, bu değerler üreme sezonu ortasında sırasıyla $21,7\pm1,5$ ve $32,3\pm0,6$ sn, sonunda ise sırasıyla $8,7\pm1,2$ ve $21,7\pm1,2$ sn olarak belirlenmiştir. İncelenen 1. üreme sezonu boyunca CD dişi alabalık bireylerinin sperm motilite oranları ve doğrusal motilite süreleri Şekil 3.16.'da verilmiştir. Genel olarak motilite oranları üreme sezonu başından sonuna doğru azalma göstermiştir. Bu üreme sezonunda incelenen toplam 48 farklı örnekten 29'unda doğrusal motilite saptanmamıştır.

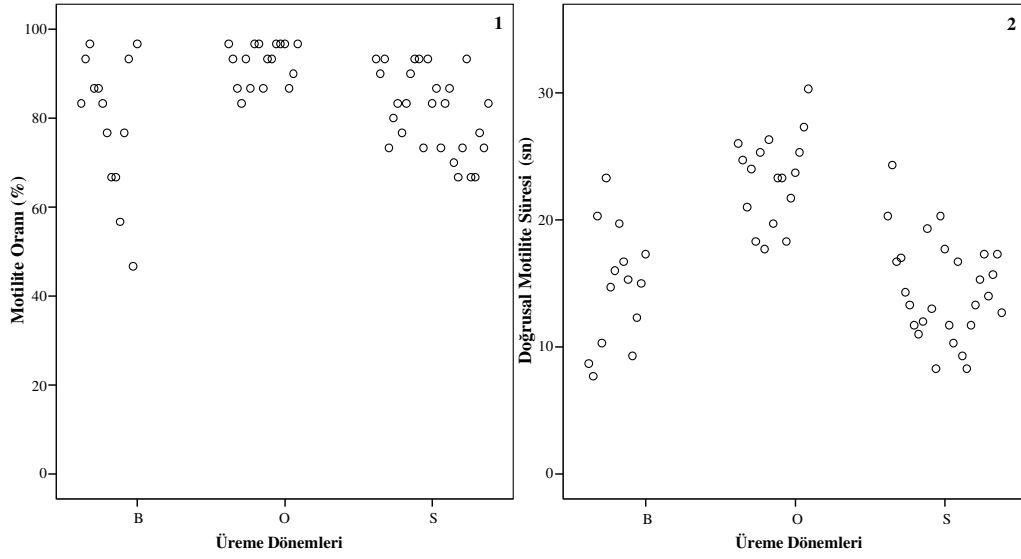


Şekil 3.15. İncelenen 1. üreme sezonu sezon başlangıcı (B), ortası (O) ve sonu (S) dönemlerinde N erkek alabalık bireylerinin motilite oranları (1) ve doğrusal motilite süreleri (2)

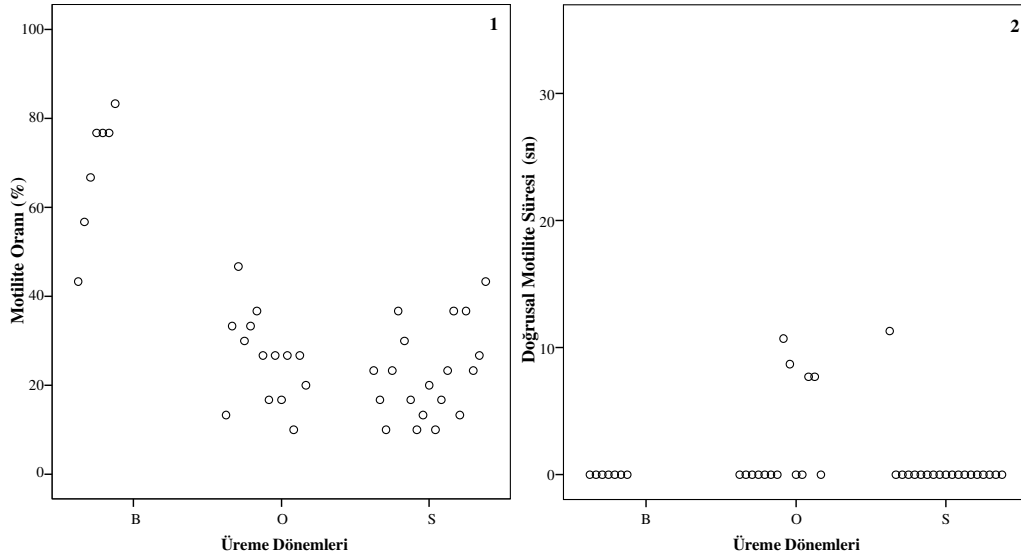


Şekil 3.16. İncelenen 1. üreme sezonu sezon başlangıcı (B), ortası (O) ve sonu (S) dönemlerinde CD dişi bireylerin motilite oranları (1) ve doğrusal motilite süreleri (2)

İncelenen 2. üreme sezonu boyunca sezon dönemleri için N erkek alabalık bireylerinin sperm motilite oranları ve doğrusal motilite süreleri Şekil 3.17.'de; CD dişi alabalık bireylerinin sperm motilite oranları ve doğrusal motilite süreleri Şekil 3.18.'de verilmiştir.



Şekil 3.17. İncelenen 2. üreme sezonu sezon başlangıcı (B), ortası (O) ve sonu (S) dönemlerinde N erkek alabalık bireylerinin motilite oranları (1) ve doğrusal motilite süreleri (2)



Şekil 3.18. İncelenen 2. üreme sezonu sezon başlangıcı (B), ortası (O) ve sonu (S) dönemlerinde CD dişi alabalık bireylerinin motilite oranları (1) ve doğrusal motilite süreleri (2)

N erkek alabalık bireylerinde, hem motilite oranları hem de doğrusal motilite süreleri üreme sezonu ortasında artış göstermiştir. N erkek alabalık bireylerinde en düşük ve en yüksek motilite oranı ortalamaları, 2. üreme sezonu başlangıcında sırasıyla $96,7 \pm 5,8$ ve $46,7 \pm 5,8$ iken, sezon ortasında $96,7 \pm 5,8$ ve $83,3 \pm 5,8$; sezon sonunda ise $93,3 \pm 5,8$ ve $66,7 \pm 5,8$ olarak kaydedilmiştir. Buna karşın, üreme sezonu başlangıcında kaydedilen en düşük ve en yüksek doğrusal motilite süre ortalamaları

sırasıyla $23,3 \pm 0,6$ ve $7,7 \pm 0,6$ sn iken, bu değerler üreme sezonu ortasında sırasıyla $30,3 \pm 1,2$ ve $17,7 \pm 1,5$ sn, sonunda ise sırasıyla $24,3 \pm 0,6$ sn ve $8,3 \pm 0,6$ sn olarak kaydedilmiştir.

CD dişi alabalık bireylerinde, genel olarak, motilite oranları üreme sezonu başından sonuna doğru azaldığı gözlenmiştir. Bu sezonda, en yüksek motilite oranı, sezon başında $83,3 \pm 5,8$ olarak saptanmışken, en düşük motilite oranı ortalamaları sezon ortası ve sonunda $10,0 \pm 0,0$ olarak kaydedilmiştir. 2. üreme sezonunda incelenen toplam 40 farklı CD dişi alabalık bireyinden 35 tanesinde doğrusal motilite saptanmamıştır.

3.6. Testiküler Sperm DNA Hasarlarının Değerlendirilmesi

Testiküler sperm DNA hasarlarının değerlendirilmesi amacıyla incelenen 3. üreme sezonu ortasında 14 N erkek ve 10 CD dişi alabalık bireyinden alınan örnekler incelenmiştir. Bu değerlendirme için, $> 90\%$ motilite oranına sahip 3 farklı N erkek alabalık bireyinden alınarak birleştirilmiş örnek kullanılarak, öncelikli olarak özellikle DNA hasarının durumunu tanımlamak için bir derecelendirme belirlenmiştir. Bu amaçla lizis çözeltisi içerisine farklı derişimlerde H_2O_2 içeren çözeltiyle incelemeler yapılmıştır. DNA hasarsız hücrelerin belirlenmesi için, H_2O_2 içermeyen lizis çözeltisi kullanılmıştır. 1. derecede DNA hasarlı hücrelerin belirlenmesi için $12 \mu M$, 2. derecede DNA hasarlı hücrelerin belirlenmesi için $25 \mu M$ ve 3. derecede DNA hasarlı hücrelerin belirlenmesi için $50 \mu M$ H_2O_2 içeren lizis çözeltileri kullanılmıştır. Uygulama sonrası DNA hasarsız ve hasarlı hücre oranları Çizelge 3.2.'de verilmiştir. Çizelge 3.2.'de görüldüğü üzere, H_2O_2 eklenen örnek hücrelerinin tamamı hasara uğramıştır. Lizis çözeltisine eklenen H_2O_2 derişimi arttıkça, hasar derecesinde artış gözlenmektedir. Ölçümler sonucu, DNA hasarsız hücrelerin $24-30 \mu m$ çapın kürecikler şeklinde olduğu saptanmıştır. DNA hasarına bağlı olarak artan kuyruklu yıldız görünümünün uzunluğu 1. derecede DNA hasarlı hücreler için $30-40 \mu m$, 2. derecede DNA hasarlı hücreler için $40-50 \mu m$ ve 3. derecede DNA hasarlı hücreler için $>50 \mu m$ olarak ölçeklendirilmiştir.

Çizelge 3.2. DNA hasarı sınıflandırması için lizis solüsyonuna farklı seviyelerdeki H₂O₂ eklenerek elde edilmiş DNA hasarı oranları (%)

Hedeflenen Ölçüm	Uygulama	DNA Hasarsız Hücre (%)	DNA Hasarlı Hücre (%)	DNA Hasarlı Hücre		
				1. derece	2. derece	3. derece
DNA Hasarsız Hücre	H ₂ O ₂ içermeyen lizis çözeltisi	98,8±0,8	1,2±0,8	1,2±0,8	0,0	0,0
1.Derecede DNA Hasarlı Hücre	12 µM H ₂ O ₂ içeren lizis çözeltisi	0,0	100,0±0,0	78,7±0,8	21,3±0,8	0,0
2.Derecede DNA Hasarlı Hücre	25 µM H ₂ O ₂ içeren lizis çözeltisi	0,0	100,0±0,0	7,3±1,8	83,8±1,5	8,8±1,3
3.Derecede DNA Hasarlı Hücre	50 µM H ₂ O ₂ içeren lizis çözeltisi	0,0	100,0±0,0	0,0±0,0	8,0±1,3	92,0±1,3

İncelenen üreme sezonu boyunca sezon ortası dönemi N erkek bireylerdeki sperm DNA hasar oranları Çizelge 3.3.' te, CD dişi bireylerdeki sperm DNA hasarı Çizelge 3.4.'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. İncelenen üreme sezonu boyunca sezon ortası dönemi N erkek alabalık bireylerindeki sperm DNA hasar oranları (%)

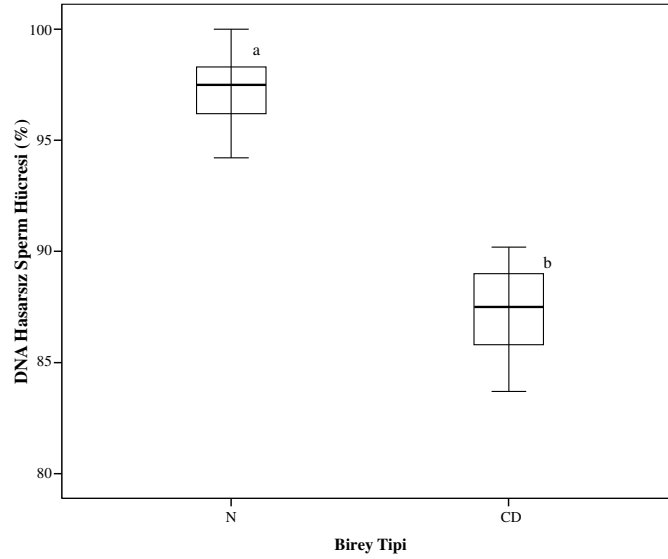
Örnek No	DNA Hasarsız Hücre (%)	DNA Hasarlı Hücre (%)	DNA Hasarlı Hücre (%)		
			1. derece	2. derece	3.derece
N1	94,2±1,3	5,8±1,3	5,8±1,3	0,0	0,0
N2	94,7±1,3	5,3±1,3	5,3±1,3	0,0	0,0
N3	97,7±0,3	2,3±0,3	2,3±0,3	0,0	0,0
N4	97,3±1,0	2,7±1,0	2,7±1,0	0,0	0,0
N5	99,7±0,6	0,3±0,6	0,3±0,6	0,0	0,0
N6	98,3±0,8	1,7±0,8	1,7±0,8	0,0	0,0
N7	100,0±0,0	0,0	0,0±0,0	0,0	0,0
N8	96,2±1,5	3,8±1,5	3,8±1,5	0,0	0,0
N9	97,8±0,6	2,2±0,6	2,2±0,6	0,0	0,0
N10	98,3±0,6	1,7±0,6	1,7±0,6	0,0	0,0
N11	95,2±1,2	4,8±1,2	4,8±1,2	0,0	0,0
N12	96,8±0,6	3,2±0,6	3,2±0,6	0,0	0,0
N13	96,2±1,6	3,8±1,6	3,8±1,6	0,0	0,0
N14	100,0±0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ort	97,3±1,9	2,7±1,9	2,7±1,9	0,0	0,0

Çizelge 3.4. İncelenen üreme sezonu boyunca sezon ortası dönemi CD dişi alabalık bireylerindeki sperm DNA hasar oranları (%)

Örnek No	DNA Hasarsız Hücre (%)	DNA Hasarlı Hücre (%)	DNA Hasarlı Hücre (%)		
			1. derece	2. derece	3. derece
CD1	86,5±2,0	13,5±2,0	4,7±4,2	5,7±2,1	3,2±1,3
CD2	89,0±1,3	11,0±1,3	6,5±1,8	1,8±0,8	2,7±0,3
CD3	88,0±1,5	12,0±1,5	5,2±0,8	3,3±0,3	3,5±0,5
CD4	89,3±1,5	10,7±1,5	3,3±0,3	3,3±1,2	4,0±0,5
CD5	85,8±2,0	14,2±2,0	4,3±2,3	4,2±0,8	5,7±0,6
CD6	83,7±3,3	16,3±3,3	7,5±3,5	3,3±1,0	5,5±1,3
CD7	88,3±2,8	11,7±2,8	7,3±1,6	1,8±0,8	2,5±0,9
CD8	84,8±2,5	15,2±2,5	9,0±2,3	3,3±0,3	2,8±0,3
CD9	90,2±1,3	9,8±1,3	6,3±1,6	3,5±0,5	0,0±0,0
CD10	87,0±2,5	13,0±2,5	7,7±2,5	5,3±1,5	0,0±0,0
Ort	87,3±2,1	12,7±2,1	6,2±1,8	3,6±1,3	3,0±1,9

Sonuçlar incelendiğinde, N erkek alabalık bireylerindeki DNA hasarlı hücre oranının CD dişi alabalık bireylerinkine göre oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, N erkek alabalık bireylerde 2. ve 3. derecede DNA hasarlı sperm hücrelerine rastlanmazken, CD dişi alabalık bireylerde her derecede DNA hasarlı hücre gözlenmiştir. İncelenen üreme sezonu boyunca sezon ortası dönemi CD dişi (n=10) ve N erkek (n=14) alabalık bireylerinde saptanan DNA hasarsız sperm hücreleri oranları (%) Şekil 3.19.'da verilmiştir. Bireyler arasındaki, üreme sezonları arasındaki ve sezon dönemleri arasındaki farklar istatistiksel olarak incelenmiş, şekil üzerindeki farklı harfler grup farklılıklarını göstermektedir ($P < 0,05$).

Şekil 3.19. incelendiğinde, incelenen üreme sezonu boyunca sezon ortası dönemi için DNA hasarsız hücre oranı, N erkek alabalık bireyler için % 97,3±1,9 CD dişi alabalık bireyler için % 87,3±2,1 olarak belirlenmiştir.



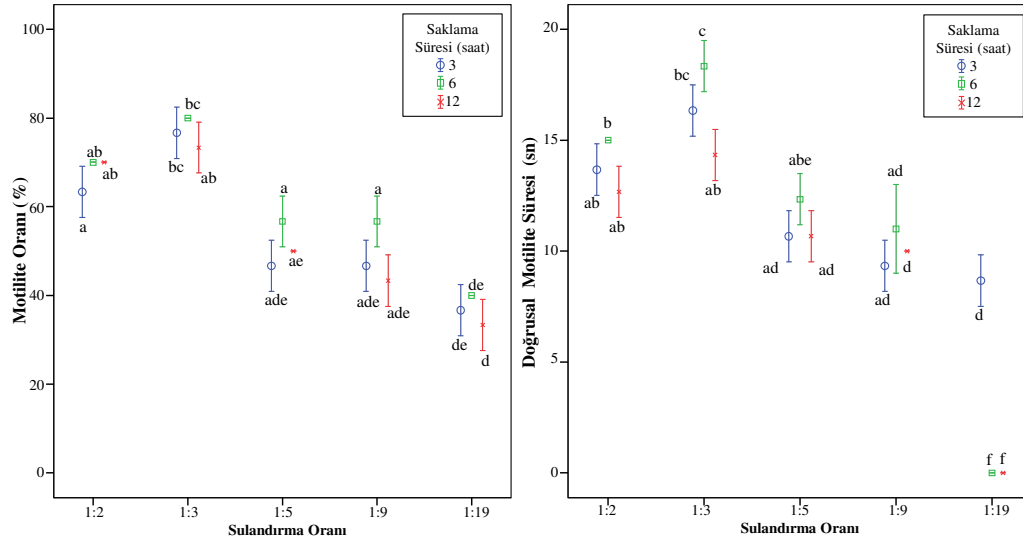
Şekil 3.19. İncelenen üreme sezonu boyunca sezon ortası dönemi CD dişi (n=10) ve N erkek (n=14) bireylerde saptanan DNA hasarsız sperm hücreleri oranları (%) ($P < 0,05$)

3.7. Kısa Süreli Muhafaza Çalışmaları

Kısa süreli muhafaza çalışmalarında kullanılacak en uygun sulandırma oranı ve pH seviyesini saptamak amacıyla, 5 farklı sulandırma oranı ve 6 farklı pH değerinin motilite oranları ve doğrusal motilite süreleri üzerine etkileri incelenmiştir. İncelenen 1. ve 2. üreme sezonlarının da sezon başında, sonunda ve ortasında, farklı bireylerden alınarak oluşturulan testiküler sperm örnekleri, farklı derişimlerdeki hedef antioksidanları (resveratrol, rutin, rosmarinik asit, kurkumin, kuersetin ve salisilik asit) içeren SSP ile sulandırılmıştır. Farklı derişimlerdeki hedef antioksidanları içeren sulandırıcı ile muamele edilen sperm örneklerindeki motilite karakteristikleri (motilite oranları ve doğrusal motilite süreleri) takip edilmiştir. İncelenen 1. ve 2. üreme sezonları ortasında, farklı derişimlerdeki antioksidanları içeren sulandırıcı ilave edilen örneklerin yumurtayı dölleme, yumurtanın gözlenmesi ve yumurtadan çıkış oranları incelenmiştir.

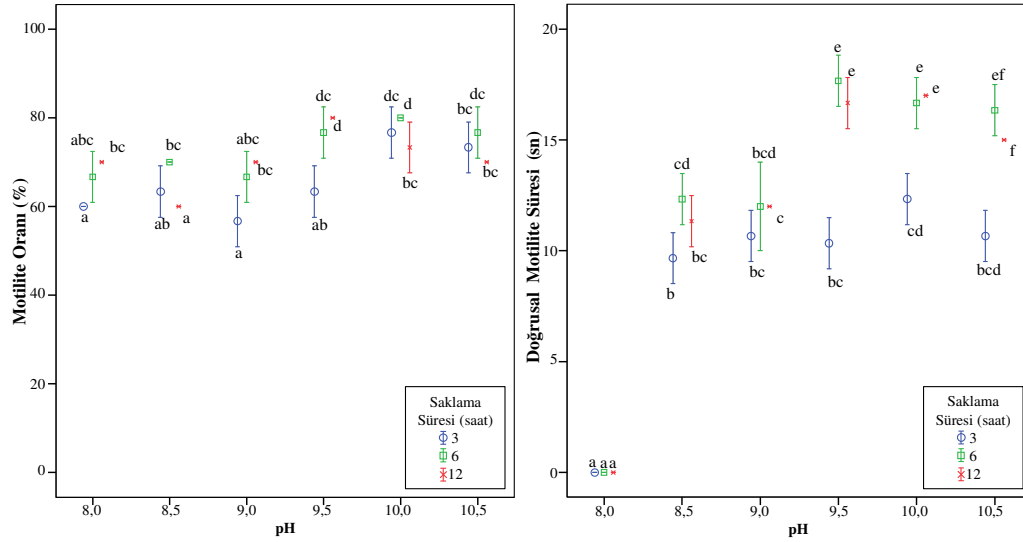
3.7.1. Sulandırma oranlarının ve pH değerlerinin motilite karakteristikleri üzerine etkileri

Sulandırma oranlarının motilite karakteristikleri üzerine etkileri Şekil 3.20.'de; pH değerlerinin motilite karakteristikleri üzerine etkileri Şekil 3.21.'de verilmiştir. Ölçülen motilite karakteristiklerinde farklı sulandırma oranları ve farklı pH değerlerindeki zamana bağımlı değişimler arasındaki farklar istatistiksel olarak incelenmiş, şekil üzerindeki farklı harfler grup farklılıklarını göstermektedir ($P < 0,05$). Uygun sulandırma oranı ve pH değerlerini belirleme çalışmaları için birleştirilmiş örneklerin sperm motilite yüzdesi ortalamaları sırasıyla $53,3 \pm 5,8$ ve $60 \pm 0,0$ olarak kaydedilmiş ve bu örneklerde doğrusal motilite süresi saptanmamıştır.



Şekil 3.20. Farklı oranlarda SSP (pH 9,5) ile sulandırılan örnekler için 3., 6. ve 12. saat için motilite oranları ve doğrusal motilite süreleri ($P < 0,05$)

Uygun sulandırma oranı tespiti için sperm örneği farklı oranlarında SSP (pH 9,5) ile seyreltilmiş ve 3., 6. ve 12. saatlerde kaydedilen motilite özellikleri açısından istatistiksel açıdan önemli farklılıklar bulunmaktadır (Şekil 3.20.). Genel olarak, tüm sulandırma oranları için hem motilite oranı hem de doğrusal motilite süreleri 6. saatte en yüksek ortalama değerler olduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.21. Farklı pH değerlerinde SSP sulandırılan örneklerde 3, 6 ve 12 saatte kaydedilen motilite oranları ve doğrusal motilite süreleri ($P < 0,05$)

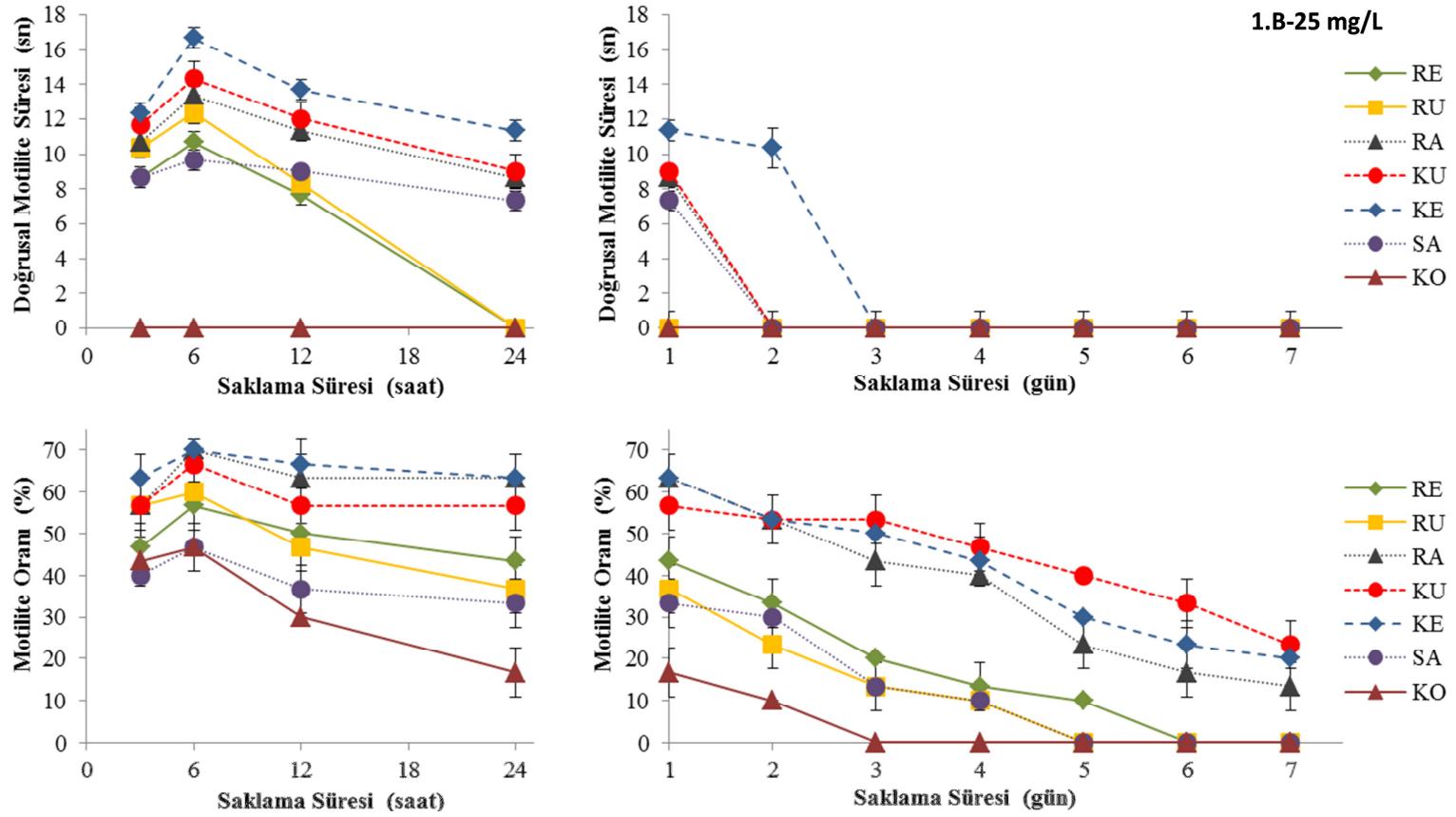
Sulandırma oranlarına göre 6. saat motilite oranları sırayla 1:2, 1:3, 1:5, 1:9 ve 1:19 sulandırma oranları için % 70,0±0,0; % 80,0±0,0; % 56,7±5,8; % 56,7±5,8 ve % 40,0±0,0 olarak belirlenmiştir. Sulandırma oranlarına göre 6. saat doğrusal motilite süreleri sırayla 1:2, 1:3, 1:5, 1:9 ve 1:19 sulandırma oranları için 15,0±0,0; 18,3±0,6; 12,3±0,6; 11,0±1,0 ve 0,0±0,0 sn olarak belirlenmiştir. Hem en yüksek ortalama motilite oranları hem de en yüksek ortalama doğrusal motilite süreleri 1:2 ve 1:3 sulandırma oranları ile elde edilmiştir. 1:3 oranının üzerinde sulandırma oranı arttıkça örneklerin motilite oranları ve doğrusal motilite süreleri azalmaktadır. Diğer taraftan, farklı pH değerlerindeki SSP ile sulandırılmış sperm örneklerine ait kaydedilen ve Şekil 3.20’de sunulan motilite özellikleri, seyreltilme anında itibaren farklılıklar göstermiştir ($P < 0,05$). Motilite oranlarından daha çok özellikle doğrusal motilite süreleri, pH 9,5, 10,0 ve 10,5 değerlerinde 6. saat (sırasıyla 17,7±0,6; 16,7±0,6 ve 16,3±0,6 sn) ve 12. saat sonunda (sırasıyla 16,7±0,6; 17,0±0,0 ve 15,0±0,0 sn) en yüksek değerlerde kaydedilmiştir.

3.7.2. Farklı antioksidan içeren sulandırıcıların motilite karakteristikleri üzerine etkileri

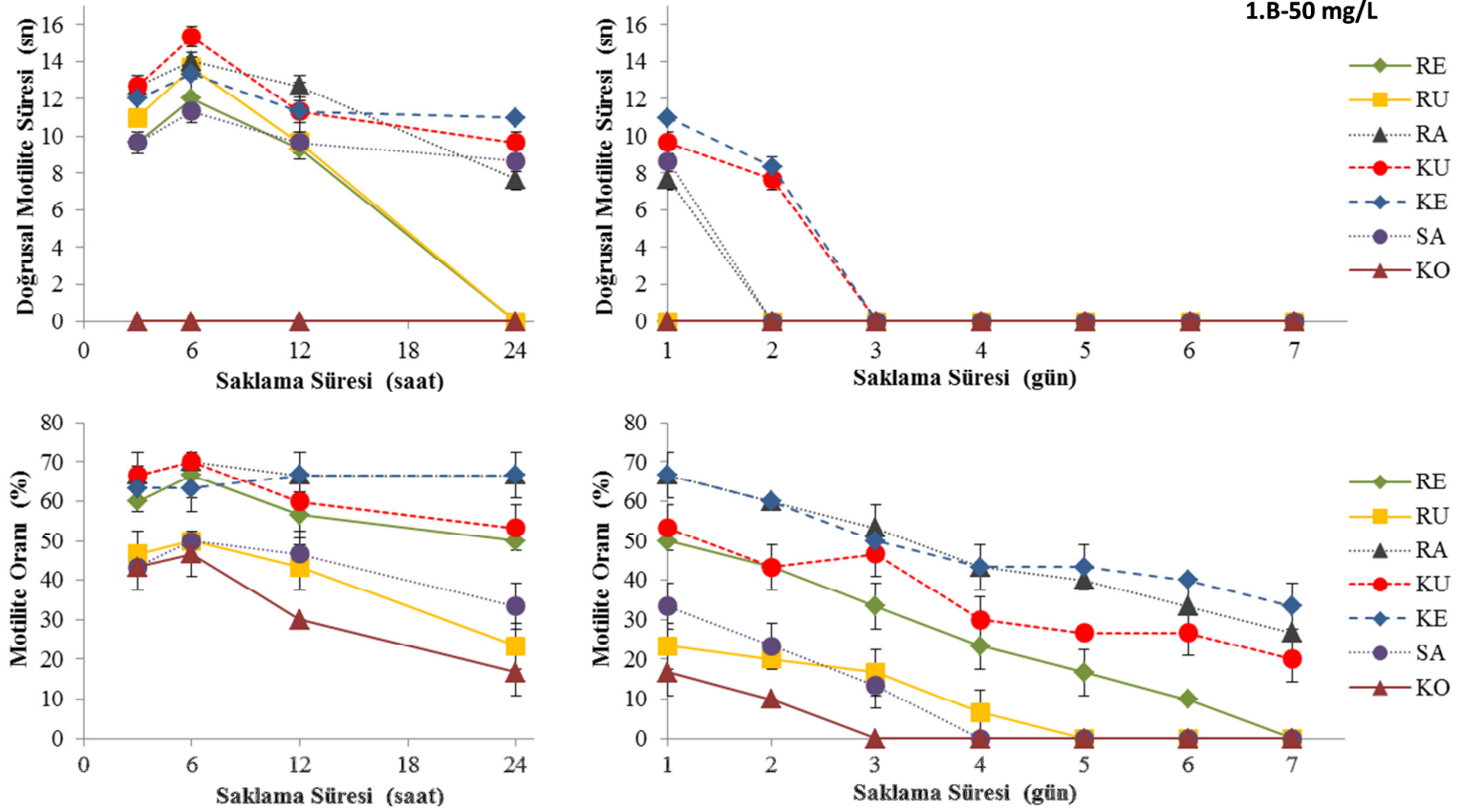
Kısa süreli muhafaza çalışmalarında, incelenen 1. ve 2. üreme sezonu boyunca sezon dönemlerinde CD dişi alabalık bireylerinden alınan örnekler son derişimleri 25, 50

ve 100 mg/L olacak şekilde resveratrol (RE), rutin (RU), rosmarinik asit (RA), kurkumin (KU), kuersetin (KE) ve salisilik asit (SA) antioksidanları SSP ile sulandırılarak, motilitenin hiç saptanamadığı duruma gelinceye kadar doğrusal motilite süreleri (sn) ve motilite oranları (%) kaydedilmiştir.

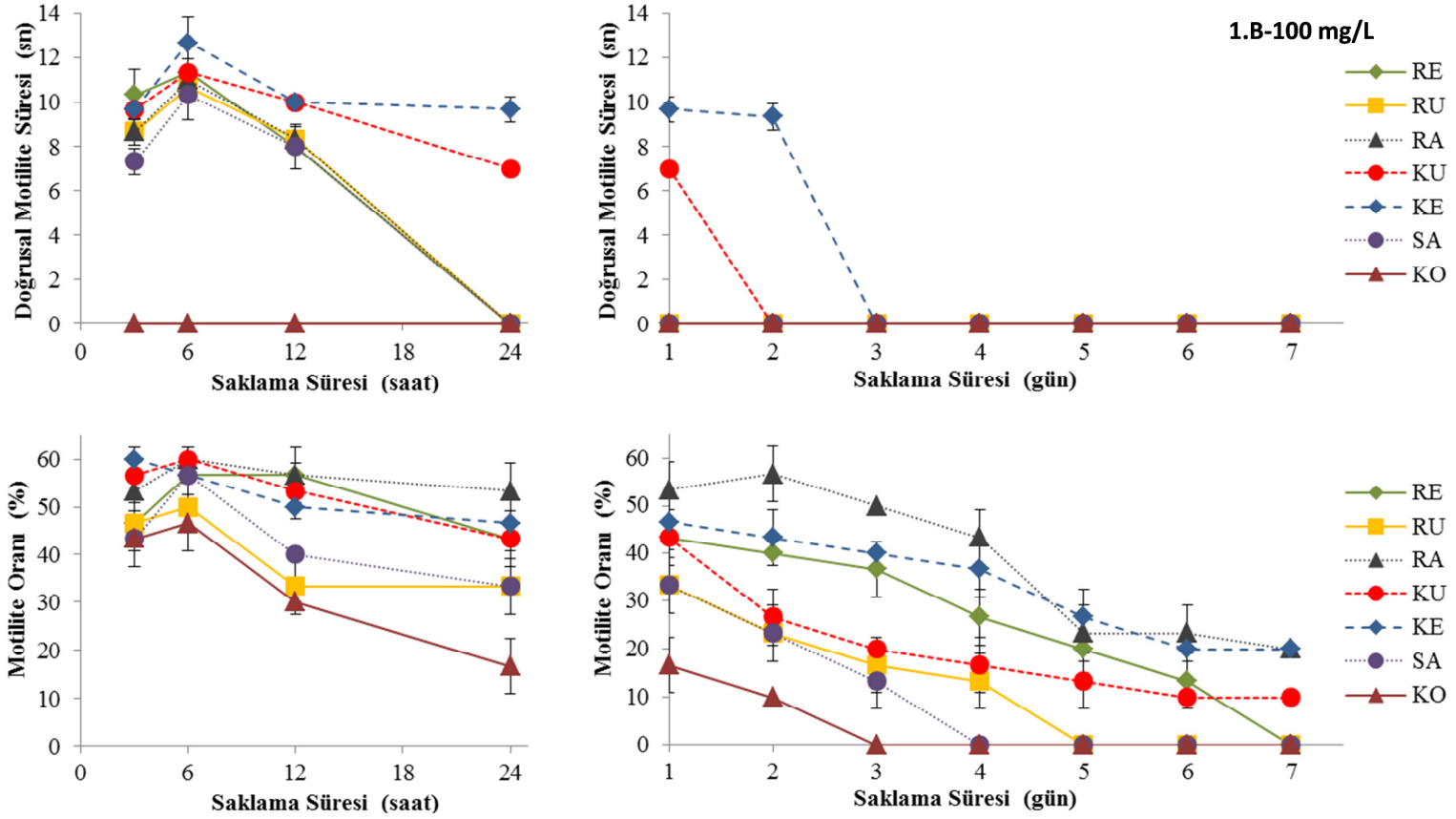
İncelenen 1. üreme sezonu boyunca sulandırılan örneklerin motilite karakteristikleri sezon başı dönemi çalışmalarında 9 gün, sezon ortası dönemi çalışmalarında 22 gün, sezon sonu dönemi çalışmalarında ise 15 gün takip edilmiş ve ilk 7 günlük veriler şekillerde sunulmuştur. Sezon başı dönemi için son derişimleri 25, 50 ve 100 mg/L olacak şekilde antioksidan eklenmiş ve eklenmemiş SSP ile sulandırılan CD dişi alabalık bireylerine ait örneklerin motilite karakteristikleri sırayla Şekil 3.22., Şekil 3.23. ve 3.24.'de, sezonun ortası dönemi için motilite karakteristikleri aynı derişimler için sırasıyla Şekil 3.25., Şekil 3.26. ve 3.27.'de, sezon sonu dönemi için motilite karakteristikleri ise Şekil 3.28., Şekil 3.29. ve 3.30.'da sunulmuştur.



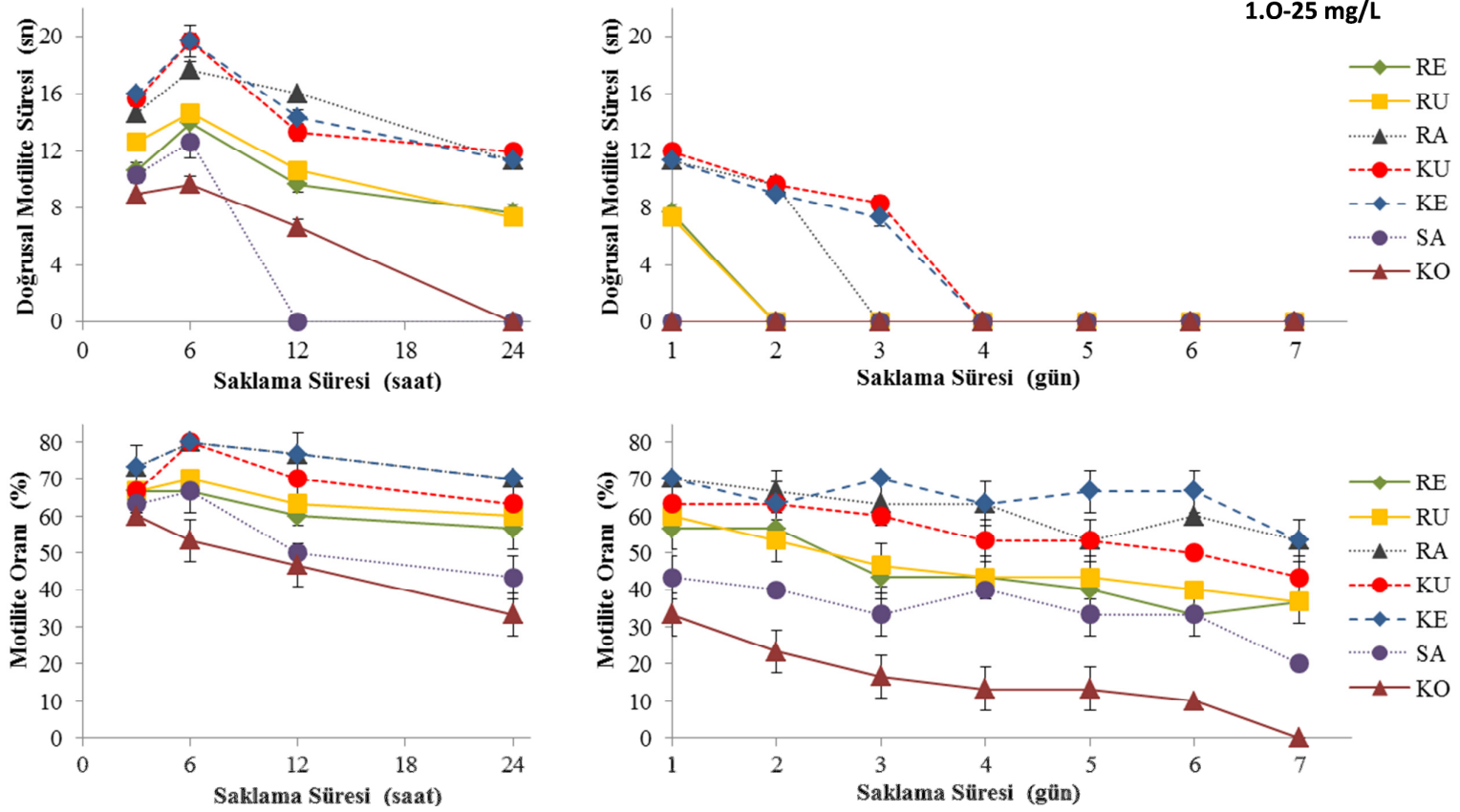
Şekil 3.22. Kısa süreli muhafaza çalışmalarında 25 mg/L derişimdeki antioksidanların 1. üreme sezonu sezon başı örneklerinin doğrusal motilite süresi ve % motilite değerleri (RE: Resveratrol, RU: Rutin, RA: Rosmarinik Asit, KU: Kurkumin, KE: Kuersetin, SA: Salisilik asit, KO: Kontrol)



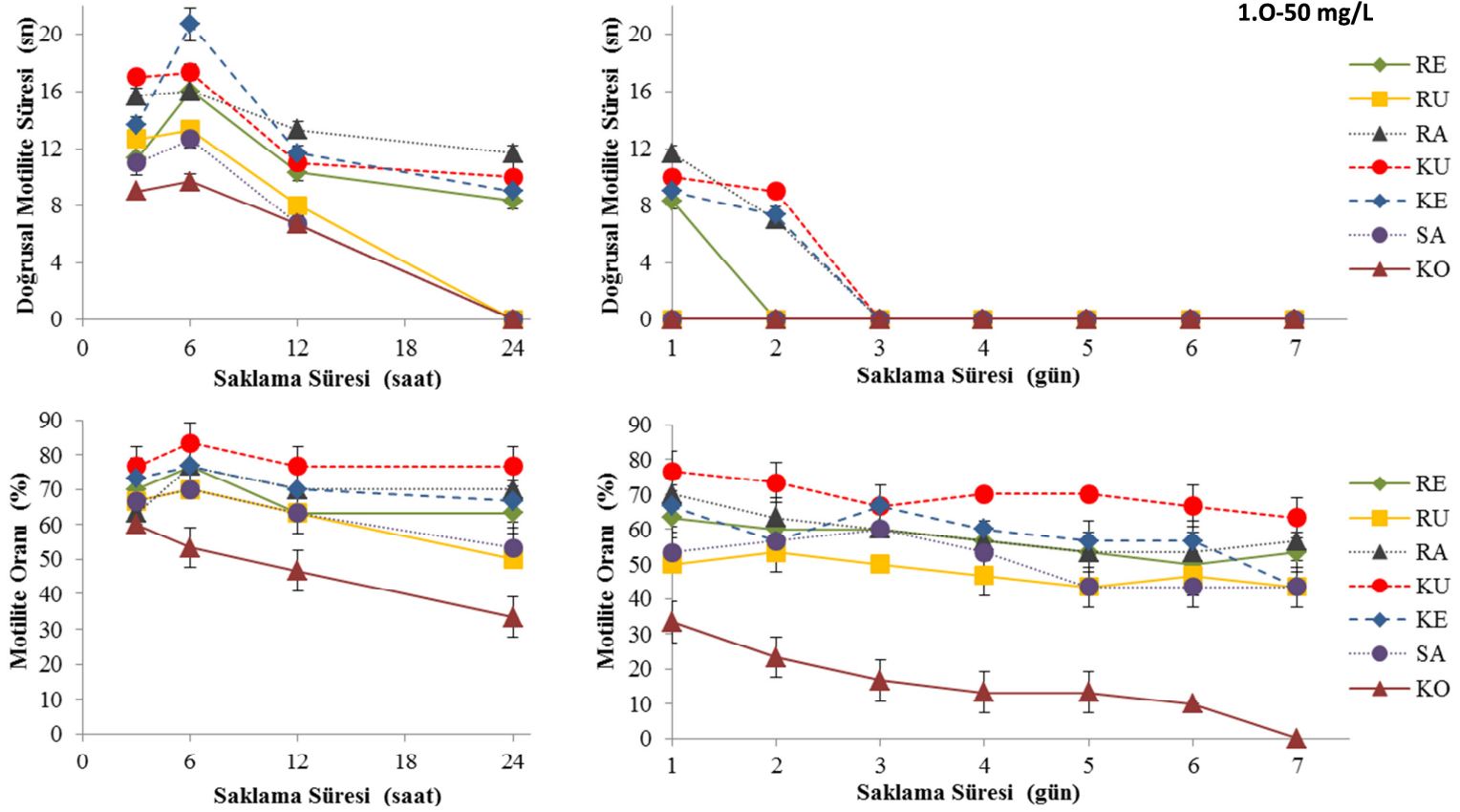
Şekil 3.23. Kısa süreli muhafaza çalışmalarında 50 mg/L derişimdeki antioksidanların 1. üreme sezonu sezon başı örneklerinin doğrusal motilite süresi ve % motilite değerleri (RE: Resveratrol, RU: Rutin, RA: Rosmarinik Asit, KU: Kurkumin, KE: Kuersetin, SA: Salisilik asit, KO: Kontrol)



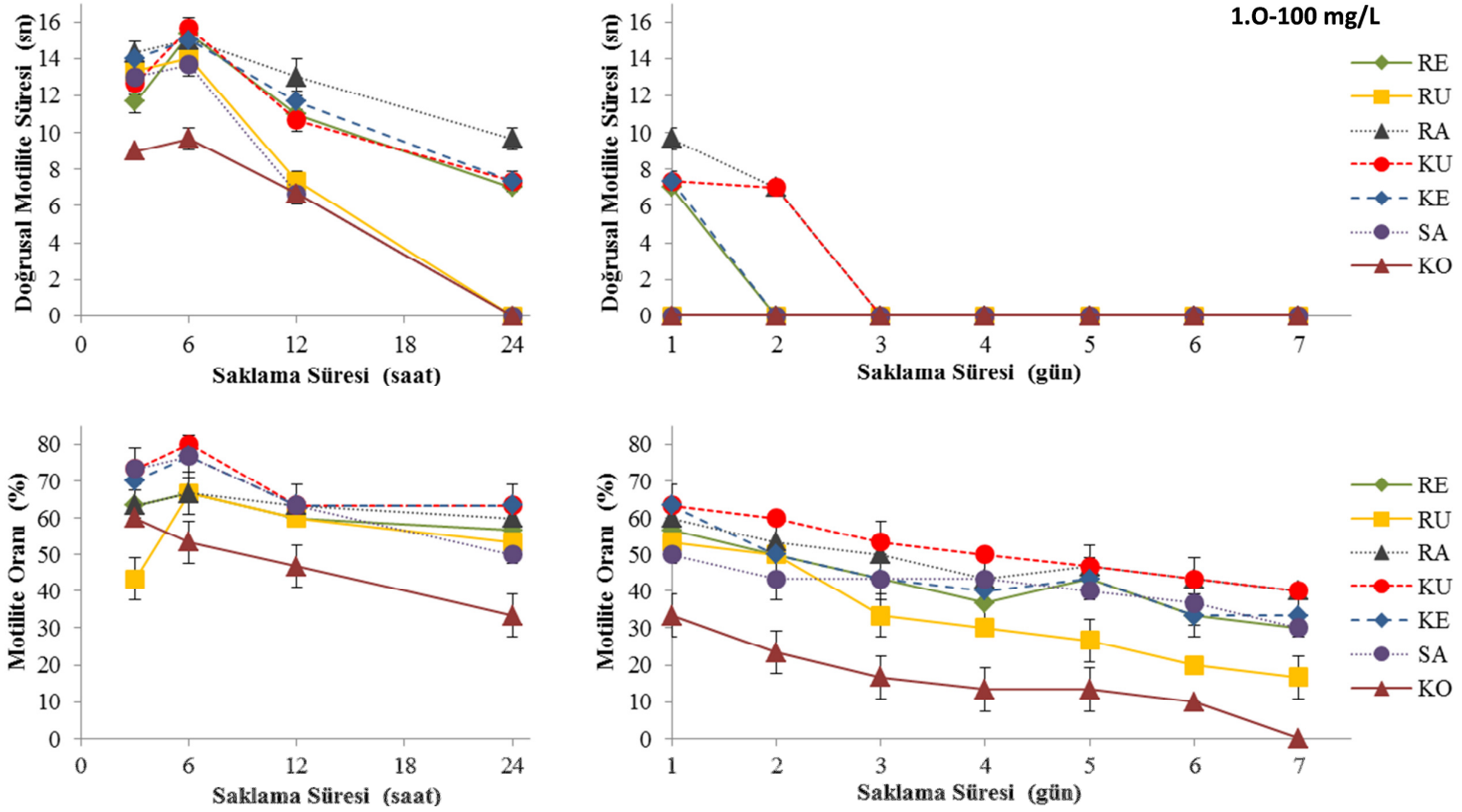
Şekil 3.24. Kısa süreli muhafaza çalışmalarında 100 mg/L derişimdeki antioksidanların 1. üreme sezonu sezon başı örneklerinin doğrusal motilite süresi ve % motilite değerleri (RE: Resveratrol, RU: Rutin, RA: Rosmarinik Asit, KU: Kurkumin, KE: Kuersetin, SA: Salisilik asit, KO: Kontrol)



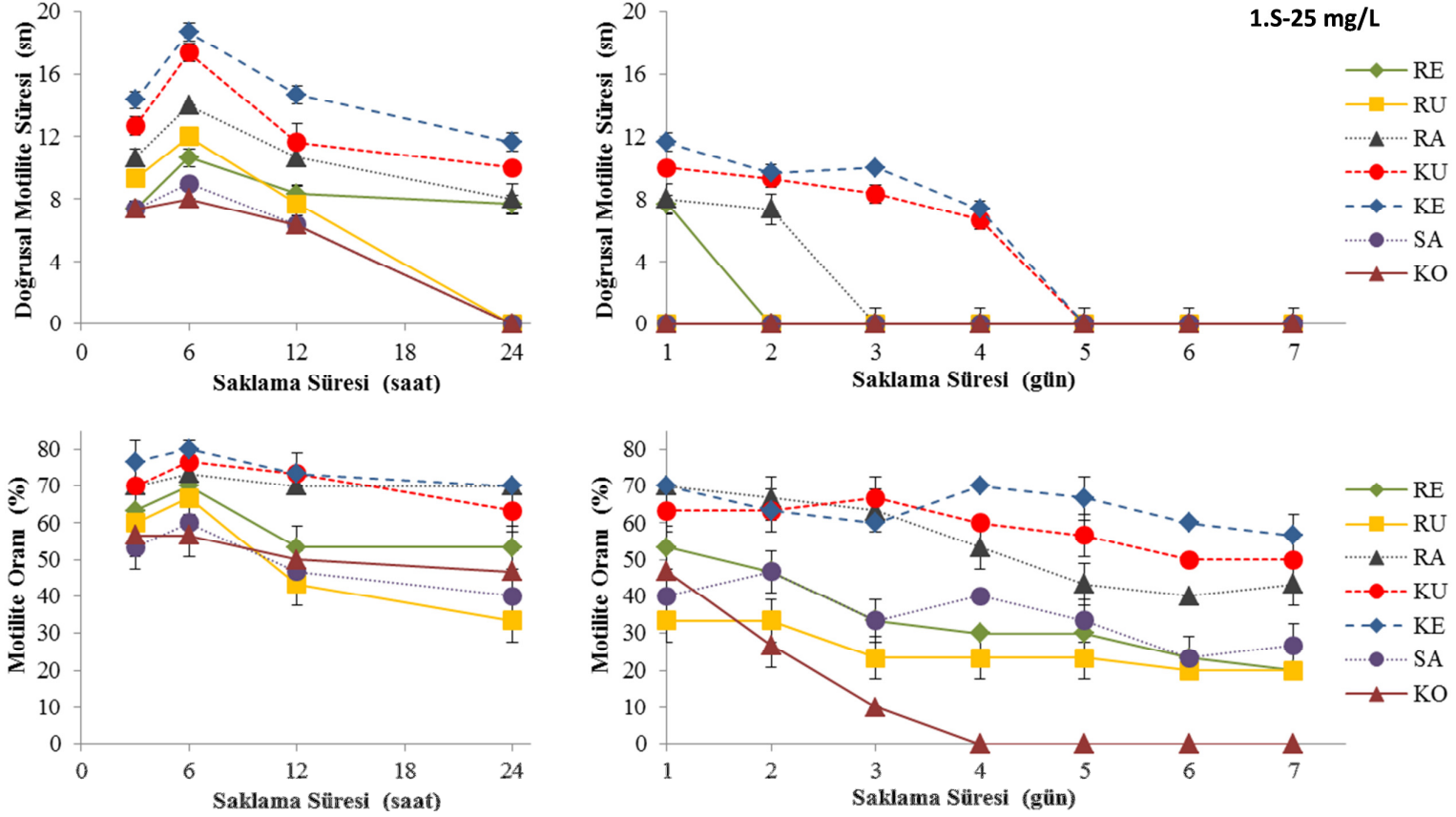
Şekil 3.25. Kısa süreli muhafaza çalışmalarında 25 mg/L derişimdeki antioksidanların 1. üreme sezonu sezon ortası örneklerinin doğrusal motilite süresi ve % motilite değerleri (RE: Resveratrol, RU: Rutin, RA: Rosmarinik Asit, KU: Kurkumin, KE: Kuersetin, SA: Salisilik asit, KO: Kontrol)



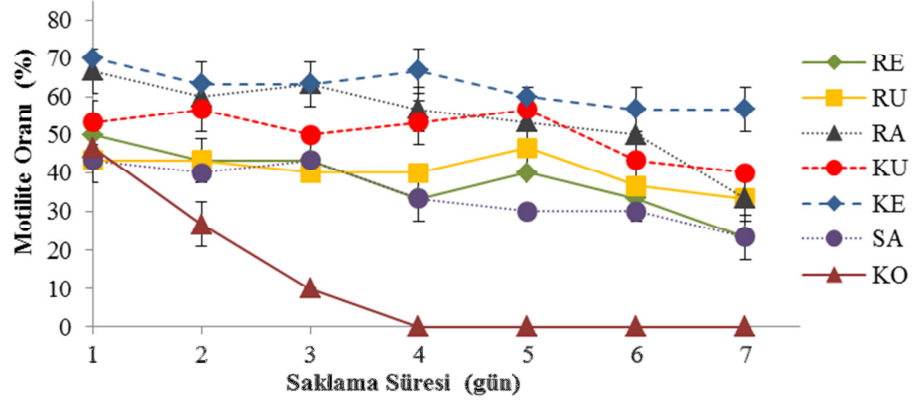
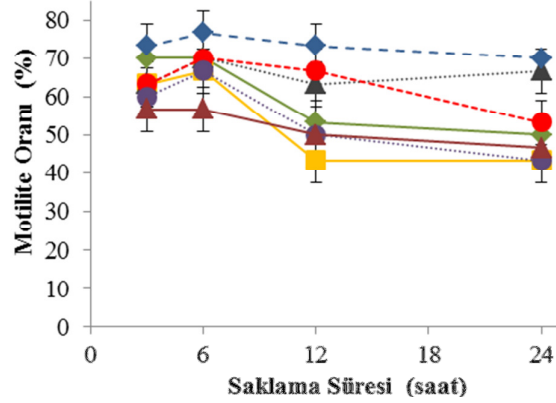
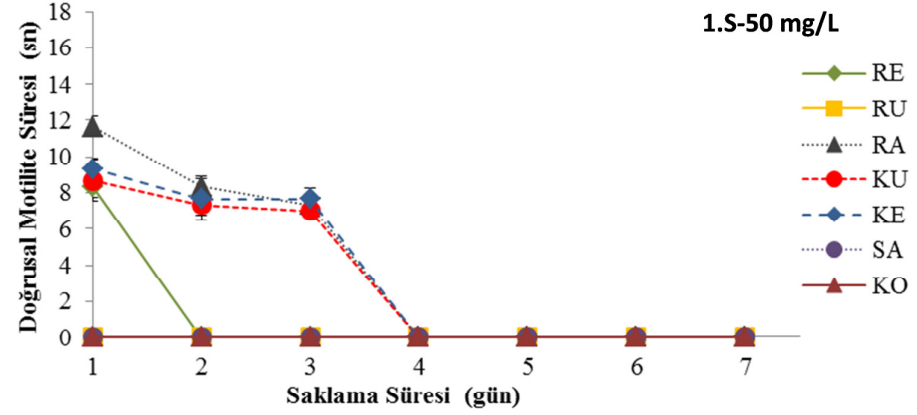
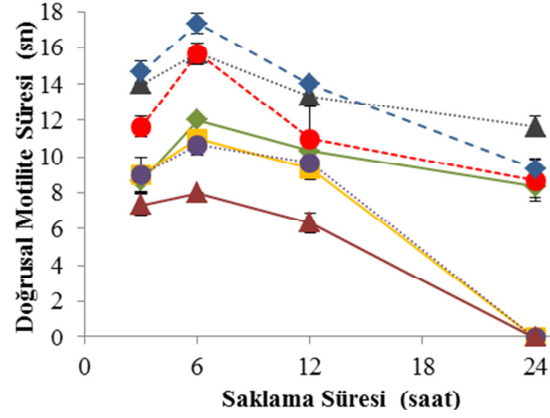
Şekil 3.26. Kısa süreli muhafaza çalışmalarında 50 mg/L derişimdeki antioksidanların 1. üreme sezonu sezon ortası örneklerinin doğrusal motilite süresi ve % motilite değerleri (RE: Resveratrol, RU: Rutin, RA: Rosmarinik Asit, KU: Kurkumin, KE: Kuersetin, SA: Salisilik asit, KO: Kontrol)



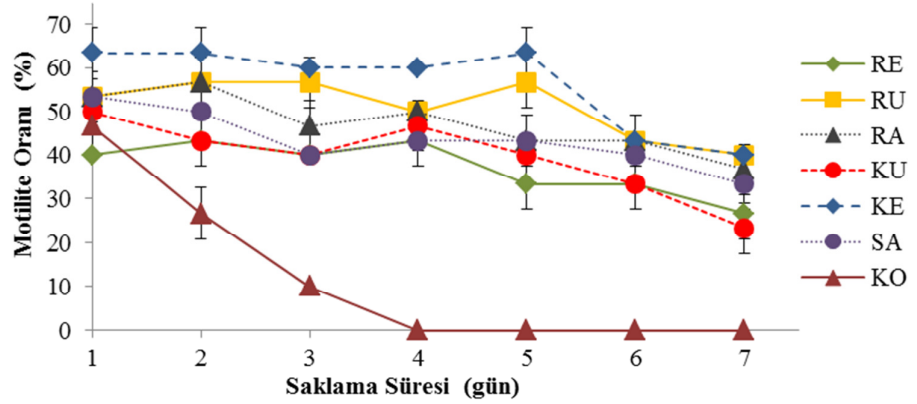
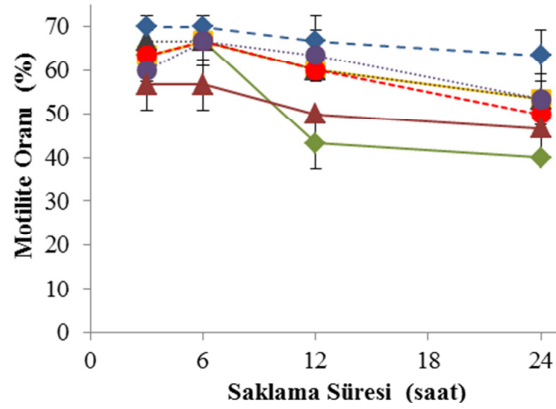
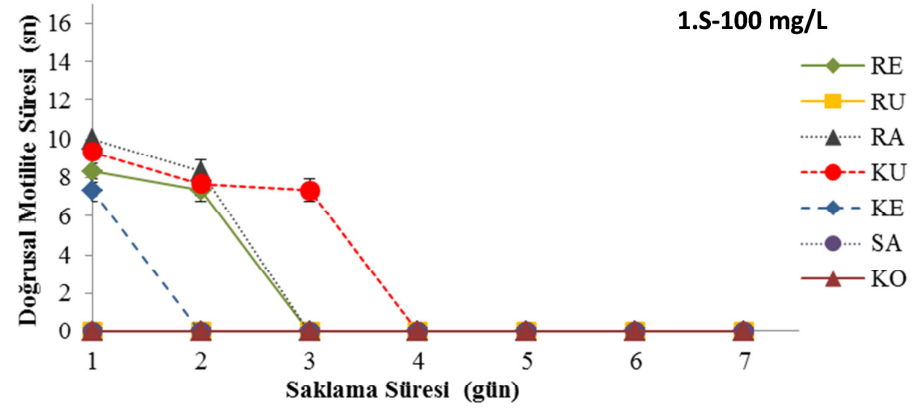
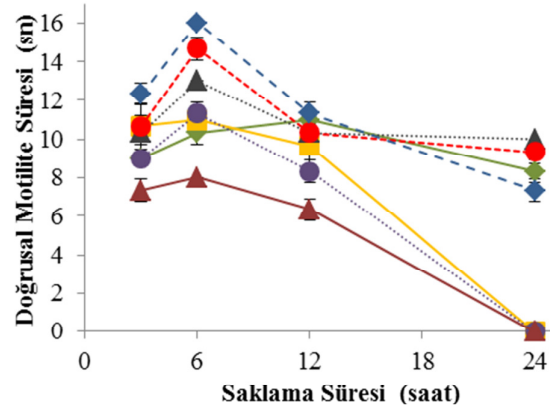
Şekil 3.27. Kısa süreli muhafaza çalışmalarında 100 mg/L derişimdeki antioksidanların 1. üreme sezonu sezon ortası örneklerinin doğrusal motilite süresi ve % motilite değerleri (RE: Resveratrol, RU: Rutin, RA: Rosmarinik Asit, KU: Kurkumin, KE: Kuersetin, SA: Salisilik asit, KO: Kontrol)



Şekil 3.28. Kısa süreli muhafaza çalışmalarında 25 mg/L derişimdeki antioksidanların 1. üreme sezonu sezon sonu örneklerinin doğrusal motilite süresi ve % motilite değerleri (RE: Resveratrol, RU: Rutin, RA: Rosmarinik Asit, KU: Kurkumin, KE: Kuersetin, SA: Salisilik asit, KO: Kontrol)



Şekil 3.29. Kısa süreli muhafaza çalışmalarında 50 mg/L derişimdeki antioksidanların 1. üreme sezonu sezon sonu örneklerinin doğrusal motilite süresi ve % motilite değerleri (RE: Resveratrol, RU: Rutin, RA: Rosmarinik Asit, KU: Kurkumin, KE: Kuersetin, SA: Salisilik asit, KO: Kontrol)

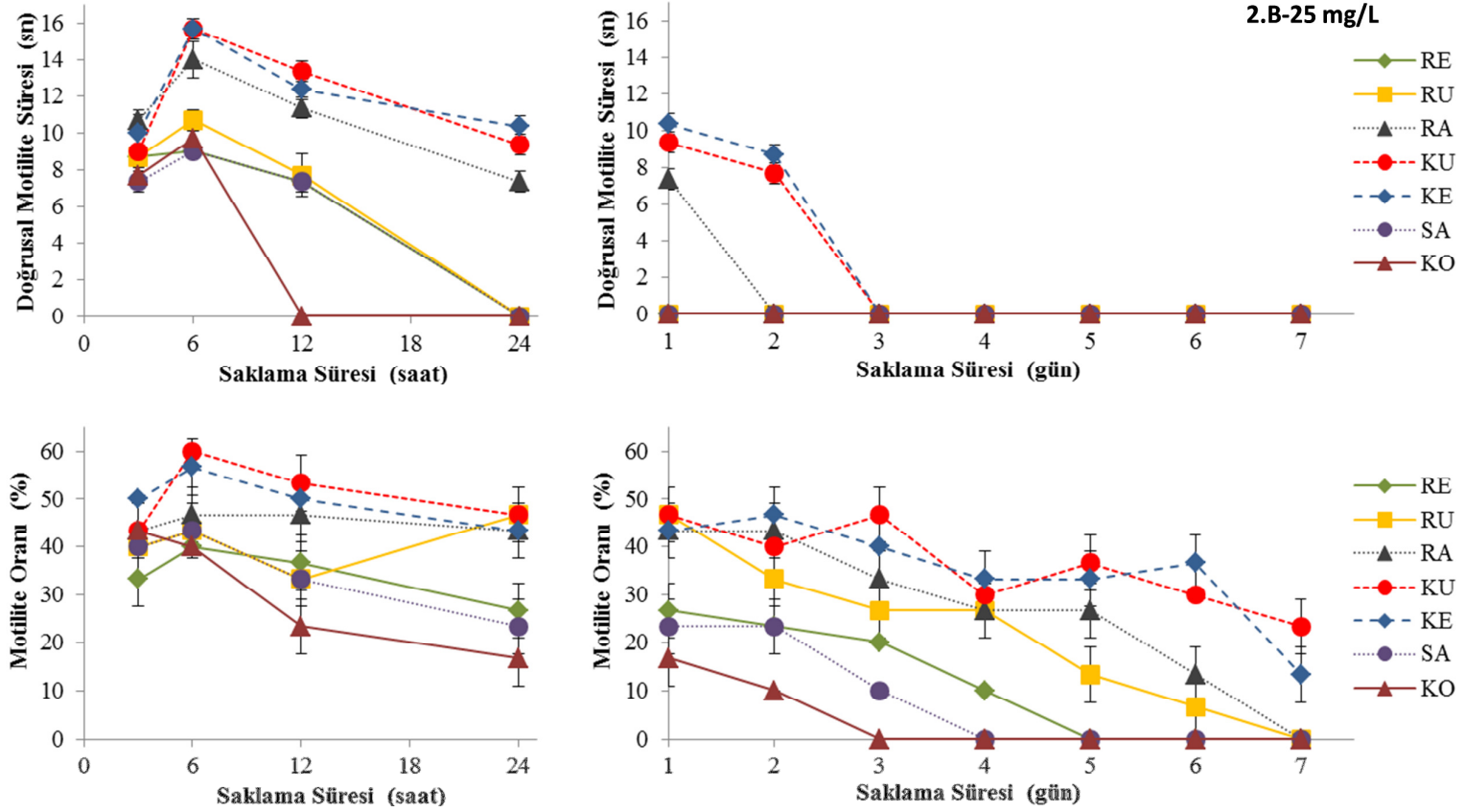


Şekil 3.30. Kısa süreli muhafaza çalışmalarında 100 mg/L derişimdeki antioksidanların 1. üreme sezonu sezon sonu örneklerinin doğrusal motilite süresi ve % motilite değerleri üzerine etkisi (RE: Resveratrol, RU: Rutin, RA: Rosmarinik Asit, KU: Kurkumin, KE: Kuersetin, SA: Salisilik asit, KO: Kontrol)

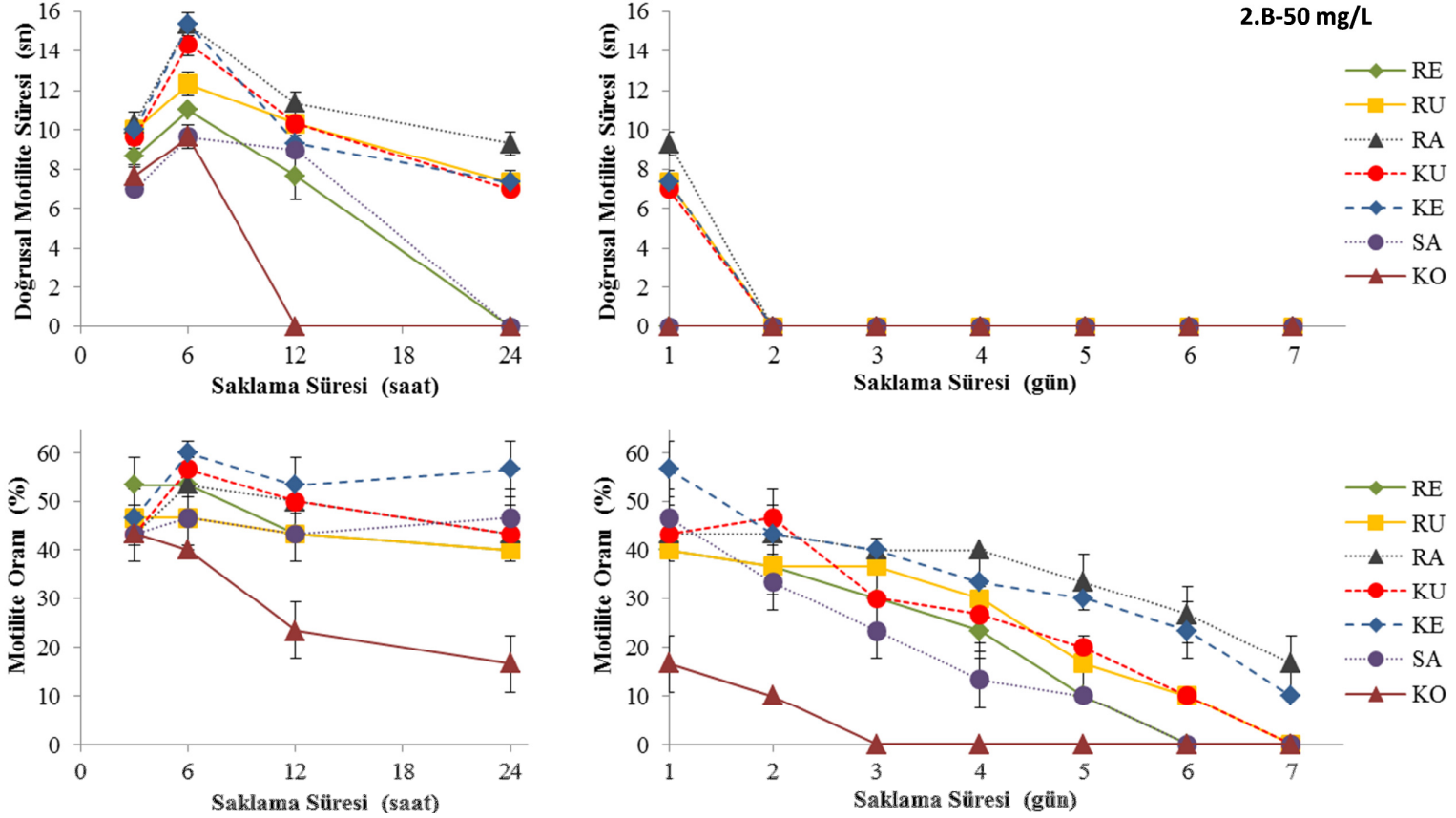
İncelenen 1. üreme sezonu boyunca balıklardan alındıktan sonra birleştirilen ve sulandırma çalışmalarında kullanılan örneklerinin motilite değerleri sezon başlangıcı, ortası ve sonu dönemleri için sırayla %56,7±5,8; %70,0±0,0; ve %66,7±5,8 olarak belirlenmiştir. Sulandırmalarda kullanılan bu örneklerde doğrusal motilite belirlenmemiştir.

1. üreme sezonu boyunca sulandırılan örnekler için hem doğrusal motilite süreleri hem de motilite oranları açısından incelendiğinde, tüm sezon dönemleri ve kullanılan tüm derişimleri için en etkin iki antioksidanın kuersetin ve kurkumin olduğu belirlenmiştir. Saklama süresinin etkisi incelendiğinde, en yüksek doğrusal motilite süreleri ve motilite oranları uygulamanın 6. saatinde gözlenmiştir. Tüm antioksidan derişimleri ve sezon dönemleri için, kontrol örneklerinin doğrusal motilite süreleri 24 saatte 0 sn.'ye düşerken, çeşitli antioksidanlar eklenmiş örneklerin doğrusal motilite süreleri 4-5 gün sürede 0 sn.' ye düşmektedir. Derişim etkisi incelendiğinde, tüm sezon dönemlerinde hem doğrusal motilite süreleri hem de motilite oranları açısından en etkili derişimin 50 mg/L olduğu görölmektedir. Örnek olarak, 1. üreme sezonu boyunca sezon ortası dönemi için sırayla 25, 50 ve 100 mg/L kurkumin eklenmiş örneklerin motilite oranları % 80,0; % 83,3 ve % 80,0 (Şekil 3.25, 3.26, 3.27) olarak belirlenmiştir. Sonuçlar sezon dönemleri açısından incelendiğinde, sezon ortası dönem için daha uzun doğrusal motilite süreleri ve daha yüksek motilite oranları belirlenmiştir. Örnek olarak, 1. üreme sezonu boyunca sırayla sezon başı, ortası ve sonu dönemleri için 50 mg/L kurkumin eklenmiş örneklerin motilite oranları % 70,0; % 83,3 ve % 70,0 (Şekil 3.23, 3.26, 3.29) olarak belirlenmiştir.

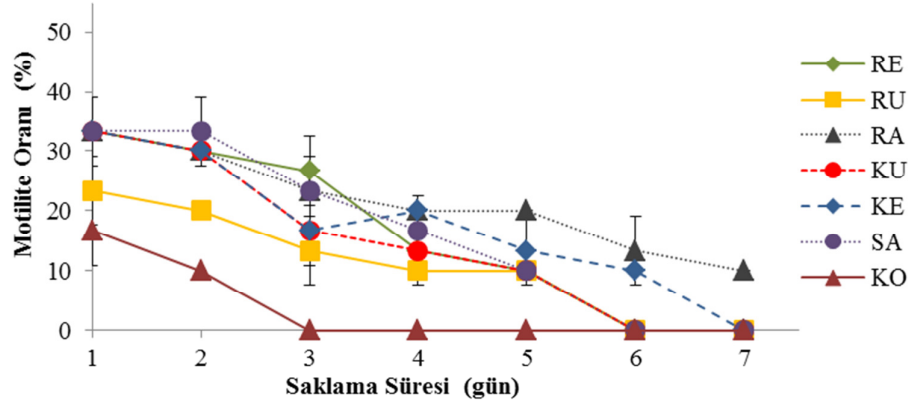
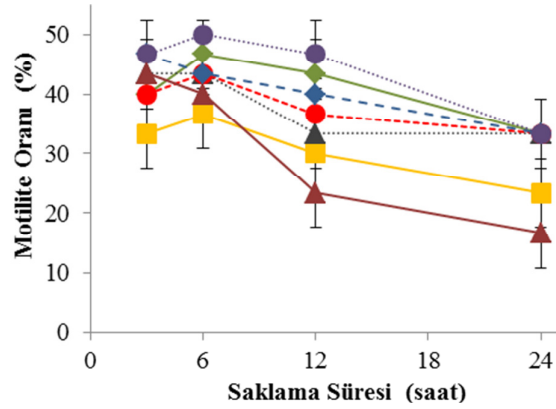
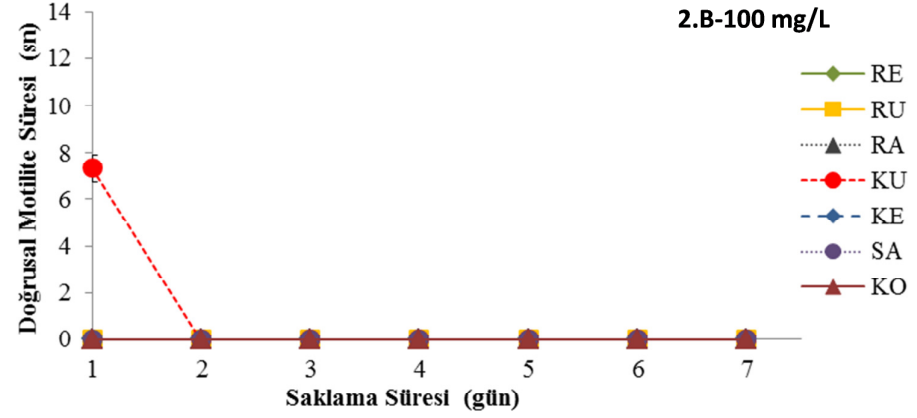
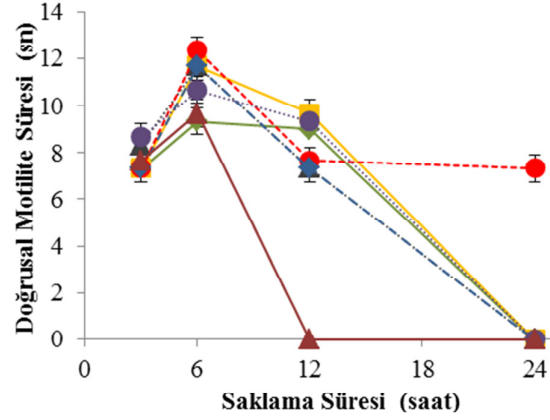
İncelenen 2. üreme sezonu boyunca sulandırılan örneklerin motilite karakteristikleri sezon başı dönemi çalışmalarında 8 gün, sezon ortası dönemi çalışmalarında 17 gün, sezon sonu dönemi çalışmalarında sonunda ise 12 gün takip edilmiş ve ilk 7 günlük veriler şekillerde sunulmuştur. Sezon başı dönemi için son derişimleri 25, 50 ve 100 mg/L olacak şekilde antioksidan eklenmiş ve eklenmemiş SSP ile sulandırılan CD dişi bireylere ait örneklerin motilite karakteristikleri Şekil 3.31., Şekil 3.32. ve 3.33.'de, sezonun ortası dönemi için motilite karakteristikleri aynı derişimler için sırasıyla Şekil 3.34., Şekil 3.35. ve 3.36.'da, sezon sonu dönemi için motilite karakteristikleri ise Şekil 3.37., Şekil 3.38. ve 3.39.'da sunulmuştur.



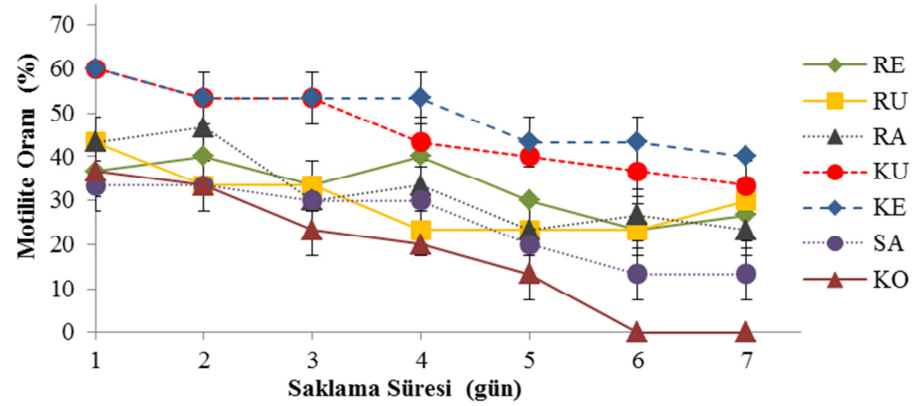
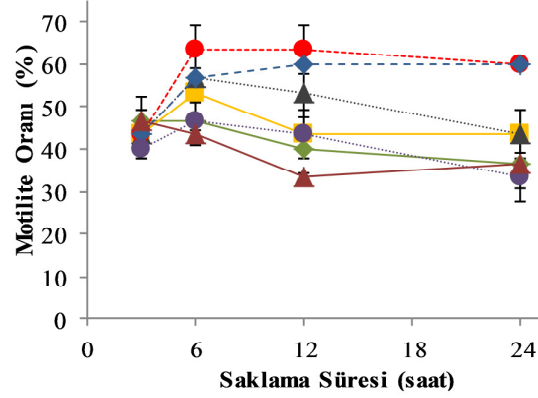
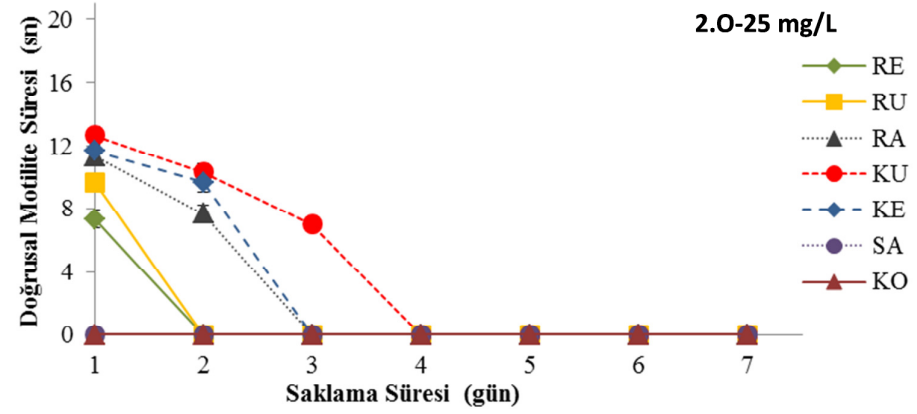
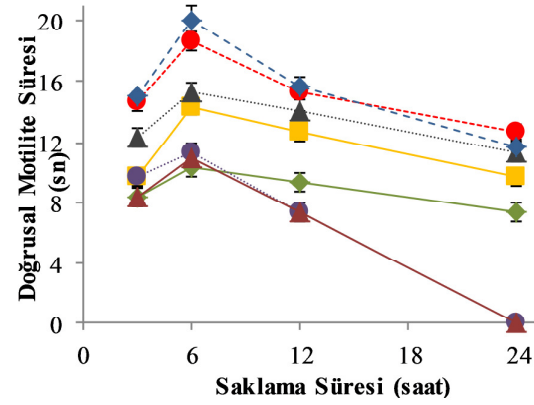
Şekil 3.31. Kısa süreli muhafaza çalışmalarında 25 mg/L derişimdeki antioksidanların 2. üreme sezonu sezon başı örneklerinin doğrusal motilite süresi ve % motilite değerleri (RE: Resveratrol, RU: Rutin, RA: Rosmarinik Asit, KU: Kurkumin, KE: Kuersetin, SA: Salisilik asit, KO: Kontrol)



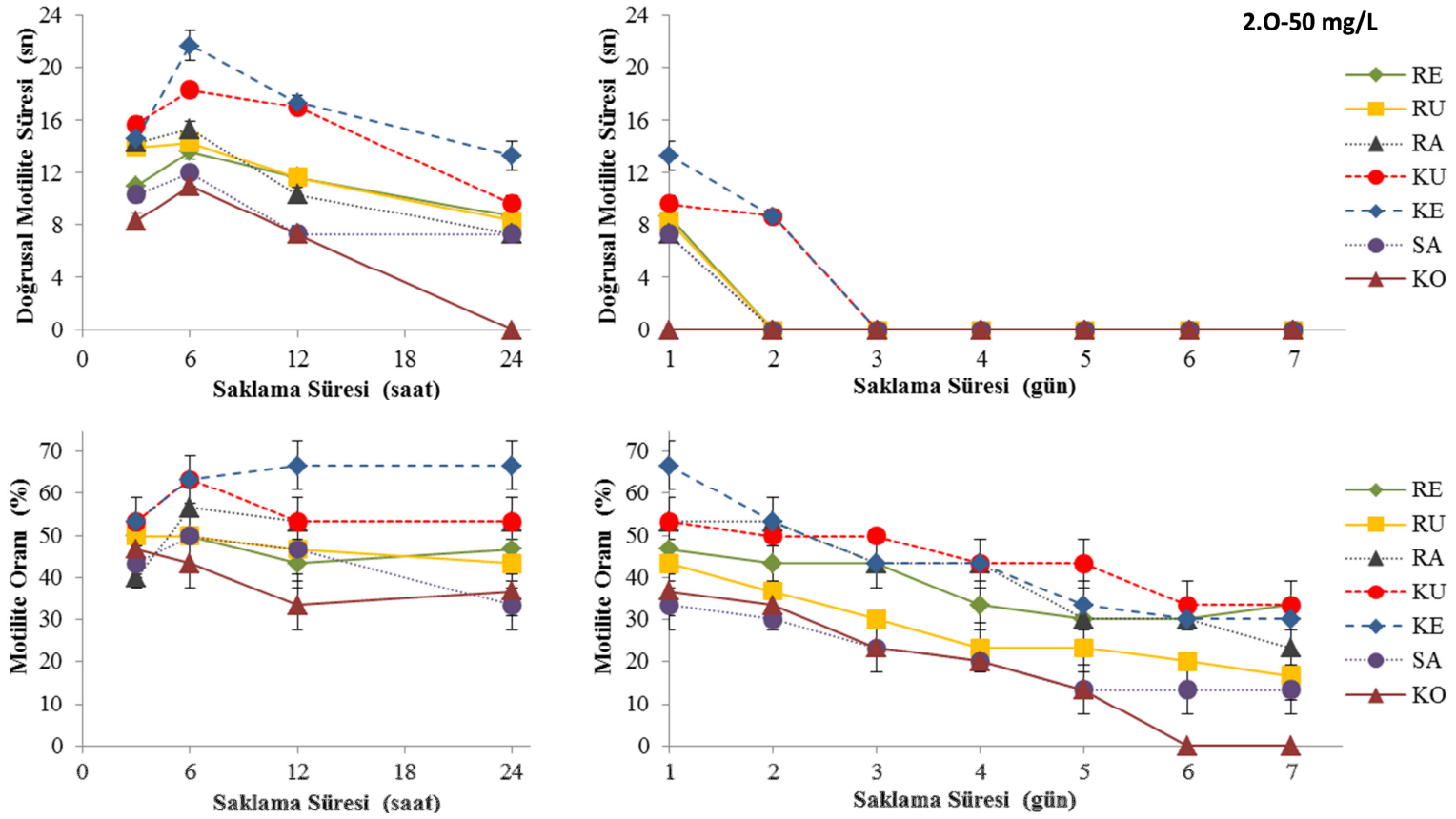
Şekil 3.32. Kısa süreli muhafaza çalışmalarında 50 mg/L derişimdeki antioksidanların 2. üreme sezonu sezon başı örneklerinin doğrusal motilite süresi ve % motilite değerleri (RE: Resveratrol, RU: Rutin, RA: Rosmarinik Asit, KU: Kurkumin, KE: Kuersetin, SA: Salisilik asit, KO: Kontrol)



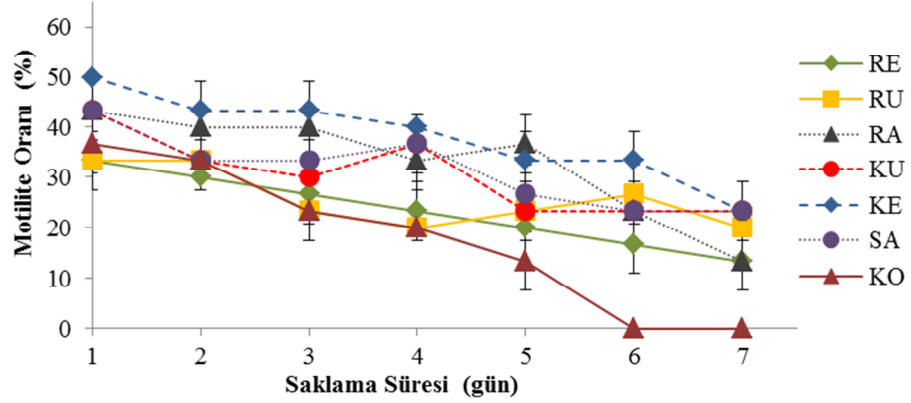
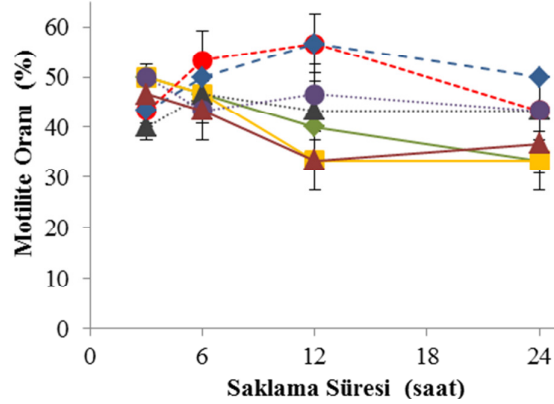
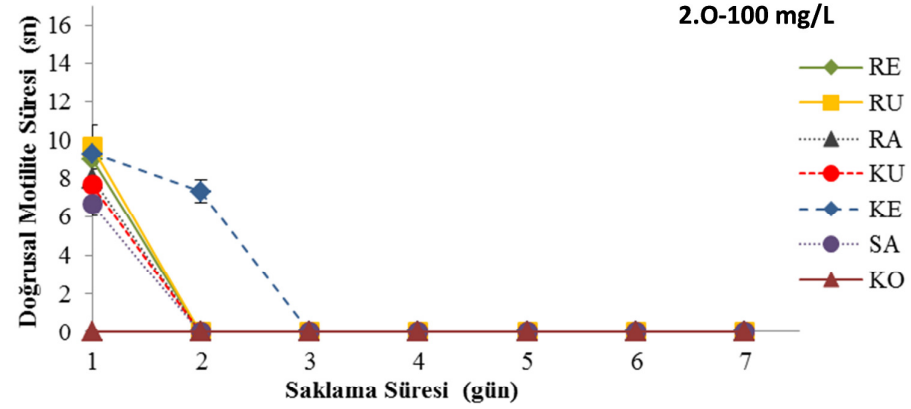
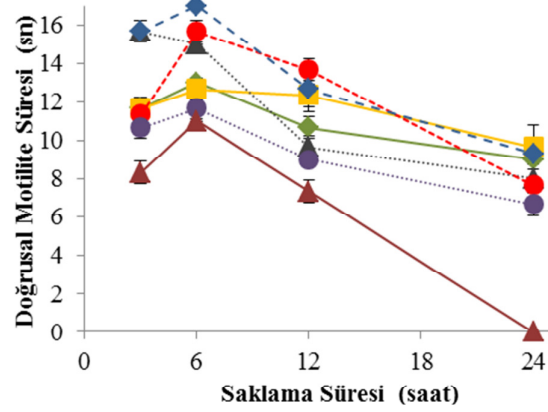
Şekil 3.33. Kısa süreli muhafaza çalışmalarında 100 mg/L derişimdeki antioksidanların 2. üreme sezonu sezon başı örneklerinin doğrusal motilite süresi ve % motilite değerleri (RE: Resveratrol, RU: Rutin, RA: Rosmarinik Asit, KU: Kurkumin, KE: Kuersetin, SA: Salisilik asit, KO: Kontrol)



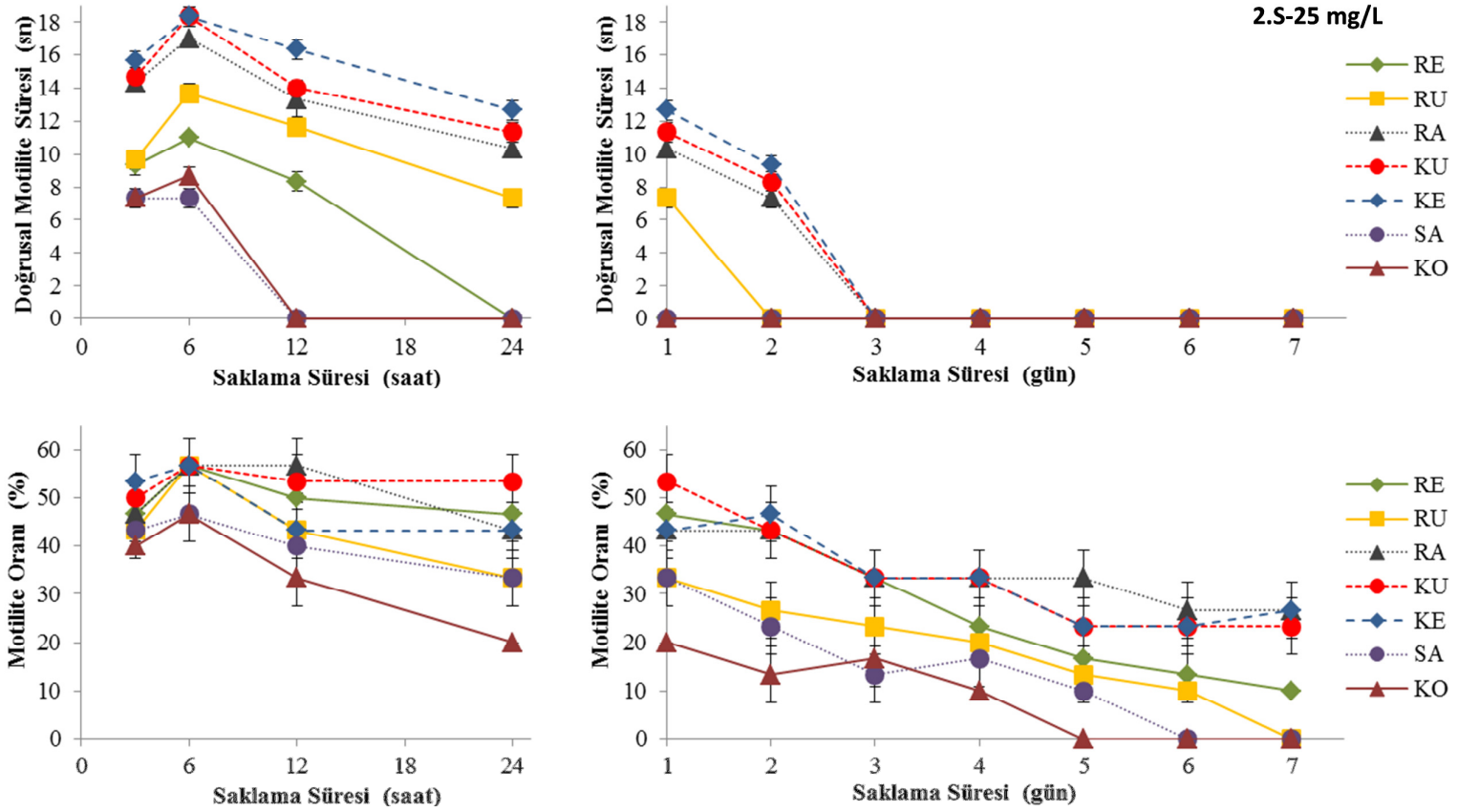
Şekil 3.34. Kısa süreli muhafaza çalışmalarında 25 mg/L derişimdeki antioksidanların 2. üreme sezonu sezon ortası örneklerinin doğrusal motilite süresi ve % motilite değerleri (RE: Resveratrol, RU: Rutin, RA: Rosmarinik Asit, KU: Kurkumin, KE: Kuersetin, SA: Salisilik asit, KO: Kontrol)



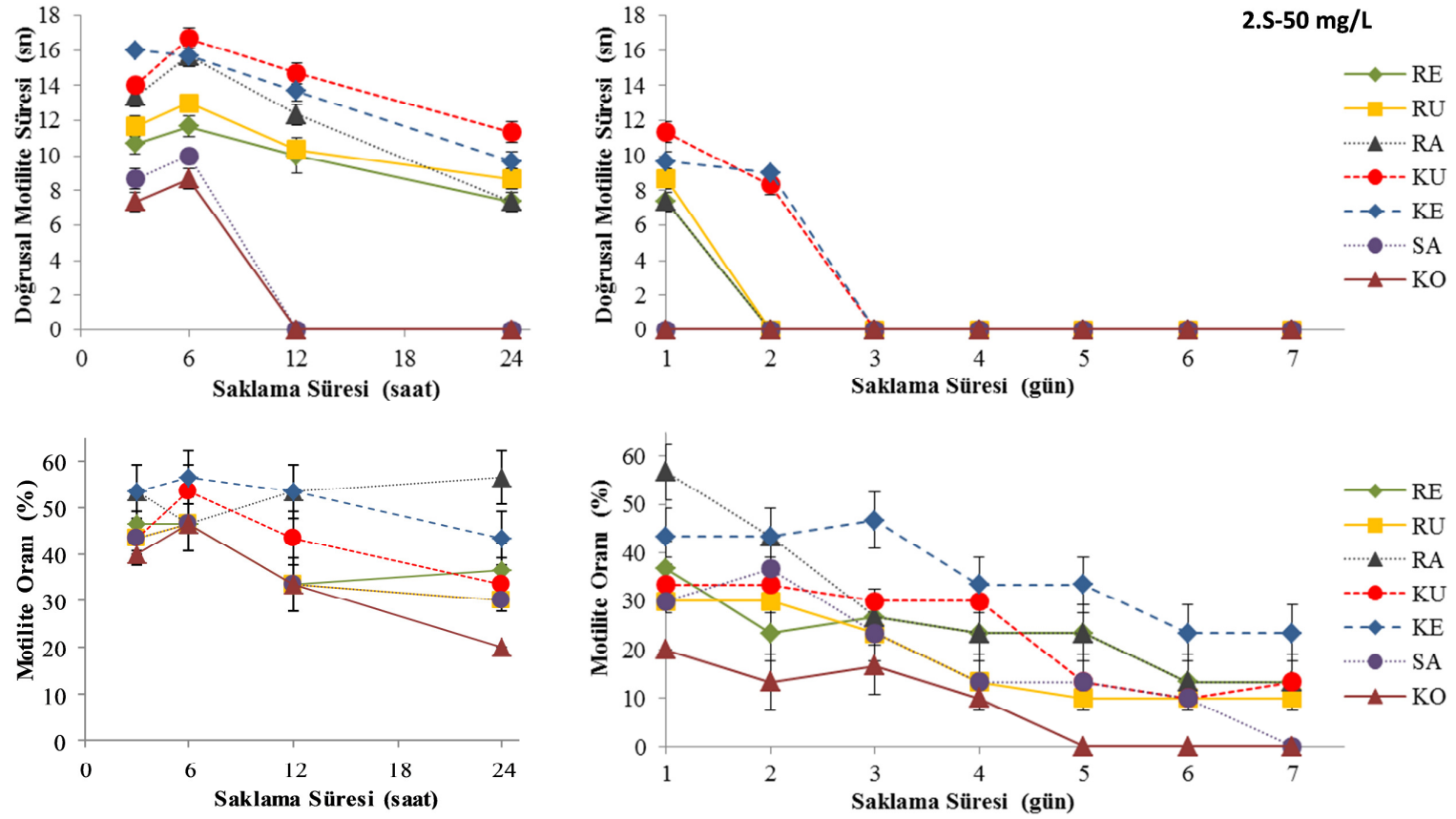
Şekil 3.35. Kısa süreli muhafaza çalışmalarında 50 mg/L derişimdeki antioksidanların 2. üreme sezonu sezon ortası örneklerinin doğrusal motilite süresi ve % motilite değerleri (RE: Resveratrol, RU: Rutin, RA: Rosmarinik Asit, KU: Kurkumin, KE: Kuersetin, SA: Salisilik asit, KO: Kontrol)



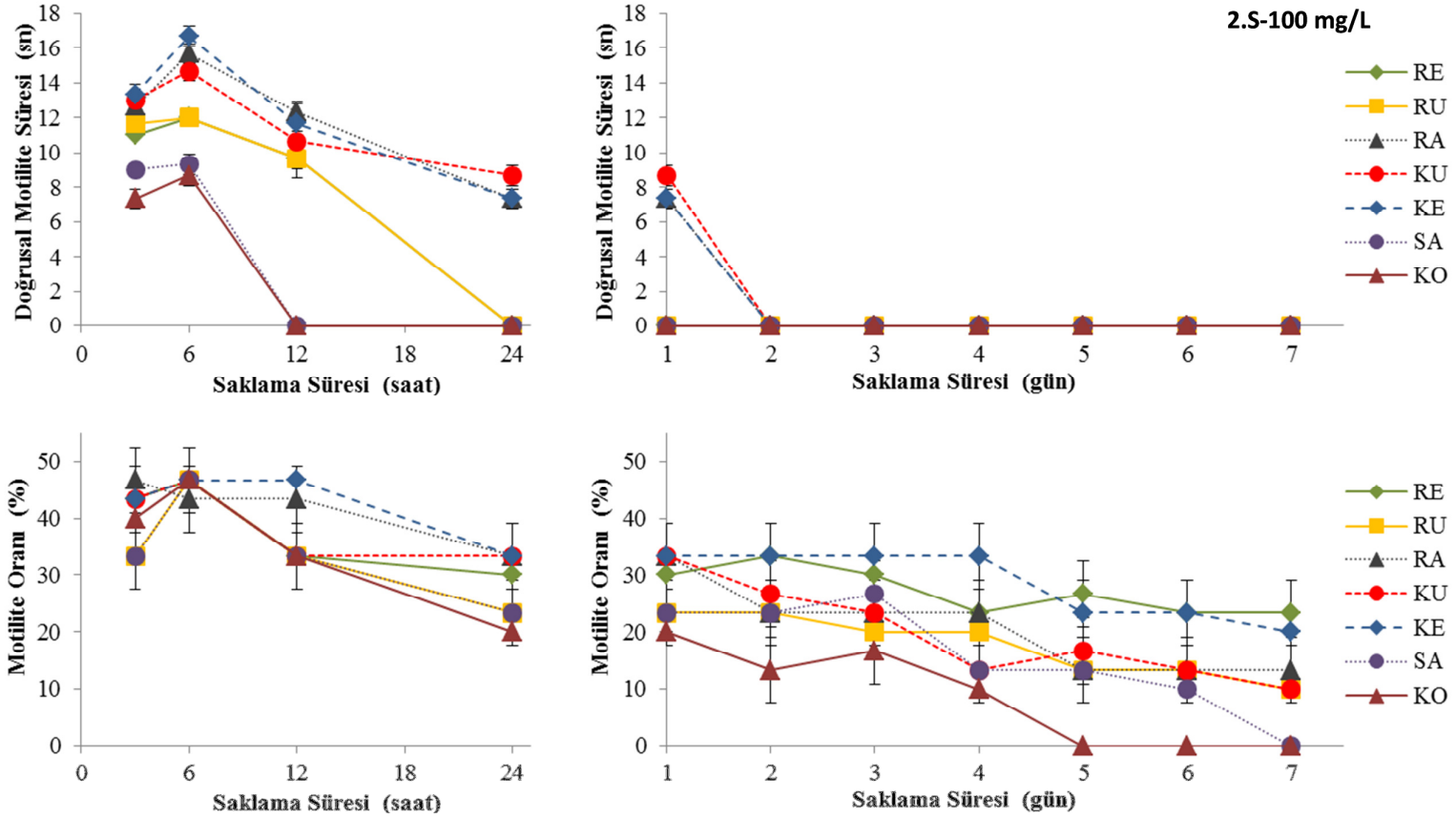
Şekil 3.36. Kısa süreli muhafaza çalışmalarında 100 mg/L derişimdeki antioksidanların 2. üreme sezonu sezon ortası örneklerinin doğrusal motilite süresi ve % motilite değerleri (RE: Resveratrol, RU: Rutin, RA: Rosmarinik Asit, KU: Kurkumin, KE: Kuersetin, SA: Salisilik asit, KO: Kontrol)



Şekil 3.37. Kısa süreli muhafaza çalışmalarında 25 mg/L derişimdeki antioksidanların 2. üreme sezonu sezon sonu örneklerinin doğrusal motilite süresi ve % motilite değerleri (RE: Resveratrol, RU: Rutin, RA: Rosmarinik Asit, KU: Kurkumin, KE: Kuersetin, SA: Salisilik asit, KO: Kontrol)



Şekil 3.38. Kısa süreli muhafaza çalışmalarında 50 mg/L derişimdeki antioksidanların 2. üreme sezonu sezon sonu örneklerinin doğrusal motilite süresi ve % motilite değerleri (RE: Resveratrol, RU: Rutin, RA: Rosmarinik Asit, KU: Kurkumin, KE: Kuersetin, SA: Salisilik asit, KO: Kontrol)



Şekil 3.39. Kısa süreli muhafaza çalışmalarında 100 mg/L derişimdeki antioksidanların 2. üreme sezonu sezon sonu örneklerinin doğrusal motilite süresi ve % motilite değerleri (RE: Resveratrol, RU: Rutin, RA: Rosmarinik Asit, KU: Kurkumin, KE: Kuersetin, SA: Salisilik asit, KO: Kontrol)

İncelenen 2. üreme sezonu boyunca balıklardan alındıktan sonra birleştirilen ve sulandırma çalışmalarında kullanılan örneklerinin motilite değerleri sezon başlangıcı, ortası ve sonu dönemleri için sırayla $36,7 \pm 5,8$; $46,7 \pm 5,8$ ve $43,3 \pm 5,8$ olarak belirlenmiştir. Sulandırmalarda kullanılan bu örneklerde doğrusal motilite belirlenmemiştir.

İncelenen 2. üreme sezonu için hem doğrusal motilite süreleri hem de motilite oranları açısından, tüm sezon dönemleri ve kullanılan tüm derişimler için en etkin iki antioksidanın kuersetin ve kurkumin olduğu belirlenmiştir. Saklama süresinin etkisi incelendiğinde, en yüksek doğrusal motilite sürelerinin ve motilite oranlarının uygulamanın 6. saatinde gözlenmiştir. Tüm antioksidan derişimleri ve sezon dönemleri için, antioksidan eklenmemiş kontrol örneklerinin doğrusal motilite süreleri 12 ya da 24 saatte 0 sn.'ye düşerken, çeşitli antioksidanlar eklenmiş örneklerin doğrusal motilite süreleri 2-4 gün sürede 0 sn.'ye düşmektedir. Derişim etkisi incelendiğinde, tüm sezon dönemlerinde hem doğrusal motilite süreleri hem de motilite oranları açısından en etkili son derişimin 50 mg/L olduğu görülmektedir. Örnek olarak, 2. üreme sezonu boyunca sezon ortası dönemi için sırayla son derişimleri 25, 50 ve 100 mg/L olan kuersetin eklenmiş örneklerin motilite oranları $56,7$; $63,3$ ve $50,0$ (Şekil 3.34, 3.35, 3.36) olarak belirlenmiştir. Sonuçlar sezon dönemleri açısından incelendiğinde, sezon ortası dönem için daha uzun doğrusal motilite süreleri ve yüksek motilite oranları belirlenmiştir. Örnek olarak, 2. üreme sezonu boyunca sırayla sezon başı, ortası ve sonu dönemleri için son derişimleri 50 mg/L olan kuersetin eklenmiş örneklerin motilite oranları $60,0$; $63,3$ ve $56,7$ (Şekil 3.32, 3.35, 3.38) olarak belirlenmiştir. Ayrıca, 1. üreme sezonu motilite oranları ve doğrusal motilite süreleri değerlerinin 2. üreme sezonuna kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

3.7.3. Farklı antioksidan içeren sulandırıcıların dölleme üzerine etkileri

İncelenen hem 1. ve 2. üreme sezonları ortasında, 25, 50 ve 100 mg/L derişimlerde hedef antioksidanlar içeren sulandırıcılar ile sulandırılmış sperm örnekleri ile dölleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Muameleden 6 saat sonra örneklerin yumurtayı dölleme (%), yumurtanın gözlenmesi (%) ve yumurtadan çıkış oranları belirlenmiştir. Antioksidan içeren SSP ile sulandırılan örnekleri karşılaştırmada 3

farklı kontrol grubu oluşturulmuştur. Bunlar; antioksidan ilave edilmemiş SSP ile sulandırılmış örnek (kontrol), hiçbir muamele görmemiş CD dişi alabalık bireyi testiküler spermi (taze sperm-CD) ve N erkek alabalık bireyinden sağım yoluyla alınmış örnek (taze sperm-N) olarak belirlenmiştir. 1. üreme sezonu boyunca sezon ortası dönemi için Çizelge 3.5.'te sunulmuş; bu örnekleme döneminde N erkek alabalık bireylerinden elde edilen ve $> \%90$ motilite oranı, $30,7 \pm 0,6$ sn doğrusal motilite süresine sahip örnek taze sperm-N kontrolü olarak kullanılmıştır. 2. üreme sezonu boyunca sezon ortası dönemi için Çizelge 3.6' da ilgili sonuçlar sunulmuştur. Bireyler, her bir antioksidanın farklı derişimleri arasındaki farklar istatistiksel olarak incelenmiş, tablodaki farklı harfler grup farklılıklarını göstermektedir ($P < 0,05$).

İncelenen 1. üreme sezonu ortasında elde edilen için döllenme, gözlenme ve yumurtadan çıkış oranları antioksidanlara göre karşılaştırıldığında en etkili antioksidanın kuersetin olduğu belirlenmiştir. Döllenme, gözlenme ve yumurtadan çıkış oranları, doz bakımından incelendiğinde en yüksek değerlere resveratrol, rutin, rosmarinik asit ve kurkumin için 50 mg/L ile kuersetin için 25 mg/L ile ve salisilik asit için ise 100 mg/L ile ulaşılmaktadır. Farklı derişimlerde çeşitli antioksidan eklenmiş sperm örneklerinin kontrol ve CD dişi alabalık bireylerinin taze spermlerine kıyasla, daha yüksek döllenme, gözlenme ve yumurtadan çıkış oranlarına sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak, N erkek alabalık bireylerinin taze spermeleri için döllenme, gözlenme ve yumurtadan çıkış oranları en yüksek değere sahiptir.

Çizelge 3.5. İncelenen 1. üreme sezonu sezon ortası dönemi örnekleri döllenme (%), gözlenme (%) ve yumurtada çıkış (%) oranları ($P < 0,05$)

Uygulama	Döllenme (%)	Gözlenme (%)	Yumurtadan Çıkış (%)
RE (25 mg/L)	72,0±2,4 ^a	60,9±3,4 ^a	53,9±3,3 ^{ab}
RE (50 mg/L)	79,5±3,3 ^b	69,7±3,3 ^a	62,2±2,5 ^a
RE (100 mg/L)	72,8±1,4 ^{ab}	59,9±3,3 ^a	52,2±2,5 ^b
RU (25 mg/L)	60,1±4,1 ^{ab}	48,2±4,8 ^a	43,4±3,7 ^a
RU (50 mg/L)	64,3±2,3 ^b	52,8±1,4 ^a	44,2±2,0 ^a
RU (100 mg/L)	53,0±1,6 ^a	42,9±1,5 ^a	32,8±2,0 ^b
RA (25 mg/L)	69,4±3,8 ^a	59,2±5,0 ^{ab}	52,6±4,8 ^{ab}
RA (50 mg/L)	70,7±2,7 ^a	61,8±3,6 ^a	55,3±3,0 ^a
RA (100 mg/L)	60,9±2,0 ^b	50,4±3,9 ^b	43,9±1,8 ^b
KU (25 mg/L)	82,1±2,1 ^a	70,2±2,7 ^a	64,5±3,4 ^a
KU (50 mg/L)	83,7±1,8 ^a	73,0±2,5 ^a	67,8±3,6 ^a
KU (100 mg/L)	67,3±2,7 ^b	54,9±6,0 ^b	48,1±4,6 ^b
KE (25 mg/L)	85,3±2,1 ^a	73,9±2,7 ^a	66,8±1,9 ^a
KE (50 mg/L)	81,9±1,2 ^{ab}	71,0±2,9 ^a	62,3±2,1 ^b
KE (100 mg/L)	76,8±2,3 ^b	64,5±2,5 ^a	59,8±2,8 ^a
SA (25 mg/L)	71,2±2,0 ^a	59,7±3,2 ^a	54,8±4,3 ^a
SA (50 mg/L)	76,5±1,9 ^a	64,0±3,4 ^a	55,8±2,9 ^a
SA (100 mg/L)	77,5±0,9 ^a	67,0±3,1 ^a	61,2±2,2 ^a
Kontrol	58,0±2,9 ^a	44,1±2,7 ^a	34,9±5,3 ^a
Taze Sperm-CD	43,4±2,0 ^b	38,2±2,8 ^a	29,7±2,8 ^a
Taze Sperm-N	97,4±1,5 ^c	84,1±2,6 ^c	74,5±3,0 ^b

Çizelge 3.6.'da sunulan incelenen 2. üreme sezonu için döllenme, gözlenme ve yumurtadan çıkış oranları antioksidanlara göre karşılaştırıldığında en etkili antioksidanın kuersetin olduğu belirlenmiştir. Bu dönemde N erkek alabalık bireylerinden elde edilen ve $> \%90$ motilite oranı, $30,3 \pm 1,2$ sn doğrusal motilite süresine sahip birleştirilmiş örnek taze Sperm-N kontrolü olarak kullanılmıştır. Döllenme, gözlenme ve yumurtadan çıkış oranları, doz bakımından incelendiğinde en yüksek değerlere resveratrol, rutin, rosmarinik asit ve kurkumin için 50 mg/L ile kuersetin için 25 mg/L ile ve salisilik asit için ise 100 mg/L ile ulaşılmaktadır. Farklı derişimlerde çeşitli antioksidan eklenmiş sperm örneklerinin kontrol ve CD dışı alabalık bireylerinin taze spermlerine kıyasla, daha yüksek döllenme, gözlenme ve yumurtadan çıkış oranlarına sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak, N erkek alabalık bireylerinin taze spermleri için döllenme, gözlenme ve yumurtadan çıkış oranları en yüksek değere sahiptir. Üreme sezonları karşılaştırıldığında ise, 1. üreme sezonuna ait döllenme, gözlenme ve yumurtadan çıkış oranları ile 2. üreme sezonuna ait oranlar arasında oldukça küçük farklar görülmektedir.

Çizelge 3.6. İncelenen 2. üreme sezonu sezon ortası dönemi döllenme (%), gözlenme (%) ve yumurtada çıkış (%) oranları ($P < 0,05$)

Uygulama	Döllenme (%)	Gözlenme (%)	Yumurtadan Çıkış (%)
RE (25 mg/L)	70,5±2,0 ^a	58,6±3,1 ^a	52,4±3,2 ^a
RE (50 mg/L)	78,1±2,3 ^b	66,4±1,8 ^b	60,0±3,3 ^a
RE (100 mg/L)	74,1±1,5 ^{ab}	59,5±1,9 ^{ab}	52,7±1,8 ^a
RU (25 mg/L)	59,7±1,4 ^{ab}	50,0±1,8 ^a	44,3±2,1 ^a
RU (50 mg/L)	63,3±0,5 ^a	48,7±1,3 ^a	41,9±1,9 ^a
RU (100 mg/L)	53,7±1,5 ^b	40,5±1,2 ^b	32,9±0,6 ^b
RA (25 mg/L)	68,7±4,0 ^a	58,1±5,2 ^{ab}	51,9±5,9 ^{ab}
RA (50 mg/L)	71,5±1,8 ^a	62,5±1,4 ^a	56,1±1,6 ^a
RA (100 mg/L)	62,4±2,3 ^b	51,8±2,3 ^b	45,4±1,9 ^b
KU (25 mg/L)	77,7±0,7 ^a	65,3±2,8 ^a	60,2±2,2 ^a
KU (50 mg/L)	79,9±2,2 ^a	71,8±3,1 ^a	64,0±4,1 ^a
KU (100 mg/L)	70,6±2,3 ^b	57,5±2,7 ^b	50,7±3,2 ^b
KE (25 mg/L)	85,1±1,7 ^a	73,7±2,2 ^a	66,6±1,3 ^a
KE (50 mg/L)	81,5±1,0 ^a	66,0±0,7 ^b	60,4±1,6 ^{ab}
KE (100 mg/L)	79,3±2,1 ^a	68,9±1,5 ^{ab}	62,3±1,4 ^b
SA (25 mg/L)	70,9±1,1 ^a	59,9±4,4 ^a	54,5±3,6 ^a
SA (50 mg/L)	75,1±1,6 ^{ab}	61,2±0,7 ^{ab}	54,4±0,3 ^a
SA (100 mg/L)	77,2±1,4 ^b	67,8±1,8 ^b	60,9±2,4 ^a
Kontrol	55,4±2,8 ^a	37,7±1,2 ^a	30,1±1,9 ^a
Taze Sperm-CD	40,0±2,6 ^b	35,8±2,1 ^a	28,0±2,6 ^a
Taze Sperm-N	96,9±1,7 ^c	81,7±0,9 ^b	73,1±1,9 ^b

3.8. Uzun Süreli Muhafaza (Kriyoprezervasyon) Çalışmaları

Uzun süreli muhafaza çalışmaları, incelenen 3. üreme sezonu ortasında elde edilen CD dişi alabalık bireylerinden alınan sperm örneklerinin, 6 saat inkübasyonundan sonra hedef antioksidanları (resveratrol, rutin, rosmarinik asit, kurkumin, kuersetin ve salisilik asit), 25, 50 ve 100 mg/L son derişimlerde içeren kriyoprezervasyon sulandırıcısına ilave edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Kriyoprezervasyon çalışmalarında çözüm sonrası motilite oranları (%) ve doğrusal motilite süreleri (sn), DNA hasarlı hücre oranları, döllenme (%), gözlenme (%) ve yumurtadan çıkış (%) oranları belirlenmiştir. Kriyoprezervasyon çalışmalarında 3 farklı kontrol grubu oluşturulmuştur. Bunlar; antioksidan ilave edilmemiş kriyoprezervasyon ortamı ile sulandırılmış örnek (kontrol), hiçbir muamele görmemiş CD dişi alabalık bireyi testiküler spermi (taze sperm-CD) ve N erkek alabalık bireyinden sağım yoluyla alınmış ve antioksidan ilave edilmemiş kriyoprezervasyon sulandırıcısı ile sulandırılmış örnek (taze sperm-N) olarak belirlenmiştir.

3.8.1. Kriyoprezervasyon sonrası motilite karakteristikleri

İncelenen 3. üreme sezonu sezon ortasında gerçekleştirilen kriyoprezervasyon çalışmalarında %73,3±5,8 motilite oranına sahip ve doğrusal motilite süresi saptanmamış CD dişi alabalık birey örneği kullanılmıştır. İnkübasyon sonrası, kriyoprezervasyon öncesi bu örneğin motilite oranı ve doğrusal motilite süresi %76,7±5,8 ve 19,7±0,6 sn olarak kaydedilmiştir. Çalışmada kullanılan, N erkek alabalık birey örneğinin motilite oranı %98,3±2,9 ve doğrusal motilite süresi 26,7±1,2 sn olarak kaydedilmiştir. Kriyoprezervasyon çalışmasında, çözüm sonrası sonrası motilite oranları (%) ve doğrusal motilite süreleri (sn) üzerine etkisi Çizelge 3.7.' de verilmiştir. Antioksidan derişimler arasındaki farklar istatistiksel olarak incelenmiştir, tablodaki farklı harfler grup farklılıklarını göstermektedir ($P < 0,05$).

Çizelge 3.7. Kriyoprezervasyon işleminde antioksidan uygulamalarının çözüm sonrası motilite oranları (%) ve doğrusal motilite süreleri (sn) üzerine etkisi ($P < 0,05$)

Uygulama	Motilite Oranı (%)	Doğrusal Motilite Süresi (sn)
RE (25 mg/L)	56,7±5,8 ^a	13,7±0,6 ^a
RE (50 mg/L)	53,3±5,8 ^a	15,3±0,6 ^a
RE (100 mg/L)	43,3±5,8 ^a	12,3±0,6 ^a
RU (25 mg/L)	43,3±5,8 ^a	9,3±0,6 ^a
RU (50 mg/L)	46,7±5,8 ^a	9,7±0,6 ^a
RU (100 mg/L)	36,7±5,8 ^a	12,3±0,6 ^a
RA (25 mg/L)	46,7±5,8 ^a	14,0 ^a
RA (50 mg/L)	60,0 ^a	16,3±0,6 ^a
RA (100 mg/L)	53,3±5,8 ^a	15,3±0,6 ^a
KU (25 mg/L)	56,7±5,8 ^a	7,7±5,8 ^a
KU (50 mg/L)	43,3±5,8 ^{ab}	12,3±1,2 ^b
KU (100 mg/L)	33,3±5,8 ^b	9,7±0,6 ^{ab}
KE (25 mg/L)	43,3±5,8 ^a	10,7±0,6 ^a
KE (50 mg/L)	46,7±5,8 ^a	10,3±0,6 ^a
KE (100 mg/L)	36,7±5,8 ^a	9,7±0,6 ^a
SA (25 mg/L)	50,0 ^a	14,3±0,6 ^a
SA (50 mg/L)	53,3±5,8 ^a	15,0 ^a
SA (100 mg/L)	53,3±5,8 ^a	14,0±1,0 ^a
Kontrol	36,7±5,8 ^a	9,7±0,6 ^a
Taze Sperm-CD	16,7±5,8 ^b	0,0 ^b
Taze Sperm-N	66,7±5,8 ^c	18,7±0,6 ^c

Çizelge 3.7. incelendiğinde, en yüksek motilite oranı ve doğrusal motilite süresi 50 mg/L rosmarinik asit için elde edilmiştir. Motilite oranları (%) ve doğrusal motilite süreleri (sn), rosmarinik asit ve salisilik asit antioksidanları için paralellik göstermekte, en yüksek değerlere 50 mg/L derişiminde rastlanmaktadır. Motilite oranları, resveratrol ve kurkumin için 25 mg/L derişiminde, rutin ve kuersetin için ise

50 mg/L derişiminde en yüksek değere sahiptir. Doğrusal motilite süreleri, resveratrol ve kurkumin için 25 mg/L derişiminde, kuersetin için 50 mg/L derişiminde, rutin için ise 50 mg/L derişiminde en yüksek değere sahiptir. Farklı derişimlerde çeşitli antioksidan eklenmiş sperm örneklerinin motilite oranlarının ve doğrusal motilite sürelerinin, kontrol ve CD dişi alabalık bireylerinin taze spermilerinin değerlerine göre daha yüksek değerde olduğu fakat N erkek alabalık bireylerinin taze spermilerinin değerlerinden daha düşük olduğu belirlenmiştir.

3.8.2. Kriyoprezervasyon sonrası DNA hasarlarının tespiti

Kriyoprezervasyon çalışmalarında antioksidan uygulamalarının ve kontrol gruplarının çözüm sonrası DNA hasarlı ve hasarsız hücre oranları (%) Çizelge 3.8.'de verilmiştir. Ayrıca DNA hasarlı hücreler, hasar derecelerine göre ayrı ayrı belirtilmiştir. Antioksidan derişimler arasındaki farklar istatistiksel olarak incelenmiştir, tablodaki farklı harfler grup farklılıklarını göstermektedir ($P < 0,05$).

Çizelge 3.8. Kriyoprezervasyon işleminde antioksidan uygulamalarının çözüm sonrasında DNA hasarlı hücre oranları (%) ($P < 0,05$)

Uygulama	DNA Hasarsız Hücre (%)	DNA Hasarlı Hücre (%)	DNA Hasarlı Hücre (%)		
			1. Derece	2. Derece	3. Derece
RE (25 mg/L)	44,2±2,5 ^a	55,8±2,5 ^a	34,2±4,5 ^a	18,8±2,4 ^a	2,8±0,3 ^a
RE (50 mg/L)	48,2±1,5 ^a	51,8±1,5 ^a	31,3±2,1 ^a	18,3±1,6 ^a	2,2±0,3 ^a
RE (100 mg/L)	44,8±2,5 ^a	55,2±2,5 ^a	35,3±0,8 ^a	17,8±1,6 ^a	2,0±0,5 ^a
RU (25 mg/L)	32,2±2,5 ^a	67,8±2,5 ^a	32,5±2,0 ^a	29,3±4,5 ^a	6,0±0,5 ^a
RU (50 mg/L)	34,2±1,5 ^a	65,8±1,5 ^a	35,7±2,4 ^a	25,8±1,0 ^a	4,3±0,8 ^a
RU (100 mg/L)	33,0±2,2 ^a	67,0±2,2 ^a	34,2±1,5 ^a	27,2±1,3 ^a	5,7±0,3 ^a
RA (25 mg/L)	45,5±2,3 ^a	54,5±2,3 ^a	34,2±2,0 ^a	18,7±2,3 ^a	1,7±0,6 ^a
RA (50 mg/L)	47,2±2,1 ^a	52,8±2,1 ^a	35,0±2,6 ^a	17,0±1,8 ^a	0,8±0,8 ^a
RA (100 mg/L)	46,2±2,6 ^a	53,8±2,6 ^a	40,0±5,1 ^a	13,3±2,8 ^a	0,5±0,9 ^a
KU (25 mg/L)	42,8±2,1 ^a	60,5±4,6 ^a	29,5±4,3 ^a	28,0±2,3 ^a	3,0±0,9 ^a
KU (50 mg/L)	41,7±1,6 ^a	58,3±1,6 ^a	22,2±4,3 ^a	32,7±2,4 ^a	3,5±0,5 ^a
KU (100 mg/L)	44,2±2,1 ^a	55,8±2,1 ^a	21,8±1,0 ^a	31,2±1,5 ^a	2,8±0,3 ^a
KE (25 mg/L)	35,5±1,0 ^a	64,5±1,0 ^a	34,8±1,6 ^a	23,2±0,6 ^a	6,5±0,5 ^a
KE (50 mg/L)	37,7±1,3 ^a	62,3±1,3 ^a	34,0±2,3 ^a	23,5±1,7 ^a	4,8±0,6 ^a
KE (100 mg/L)	38,2±2,1 ^a	61,8±2,1 ^a	32,7±3,3 ^a	24,0±5,9 ^a	5,2±0,8 ^a
SA (25 mg/L)	45,5±1,8 ^a	54,5±1,8 ^a	35,5±0,9 ^a	17,5±2,0 ^a	1,5±0,5 ^a
SA (50 mg/L)	46,2±2,1 ^a	53,8±2,1 ^a	36,7±1,5 ^a	15,5±3,0 ^a	1,7±0,6 ^a
SA (100 mg/L)	45,5±2,6 ^a	54,5±2,6 ^a	36,2±5,2 ^a	17,2±3,1 ^a	1,2±0,3 ^a
Kontrol	30,0±4,1 ^a	70,0±4,1 ^a	29,5±2,6 ^a	30,8±6,0 ^a	9,7±1,3 ^a
Taze Sperm-CD	18,5±3,0 ^b	81,5±3,0 ^b	26,0±6,1 ^{ab}	36,8±3,2 ^a	18,7±7,0 ^b
Taze Sperm-N	76,7±4,3 ^c	23,3±4,3 ^c	17,2±2,1 ^b	6,2±2,3 ^b	0,0 ^c

Kriyoprezervasyon sonrasında sperm hücrelerinin DNA hasar durumları incelendiğinde, kontrol ve CD dişi bireylerinin örneklerine kıyasla farklı derişimlerde çeşitli antioksidanlar eklenmiş örneklerin DNA hasarsız hücre oranının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. DNA hasarının önlenmesinde, sırayla resveratrolün, rosmarinik asidin ve salisilik asidin daha etkili olduğu belirlenmiştir. Antioksidan derişimleri açısından incelendiğinde, kurkumin ve kuersetin için 100 mg/L derişimde; diğer antioksidanlar için ise 50 mg/L derişimde DNA hasarsız hücre oranlarının daha yüksek olduğu görülmektedir. DNA hasarlı hücreler, dereceleri bakımından incelendiğinde 3. dereceden DNA hasarlı hücre oranının sırayla rosmarinik asit, salisilik asit ve resveratrol için olduğu belirlenmiştir. Taze spermeler incelendiğinde, CD dişi birey örneklerindeki DNA hasarlı hücre oranının N erkek bireylerdekine göre 3 kat daha yüksek olduğu gözlenmektedir.

3.8.3. Kriyoprezervasyonun dölleme üzerine etkileri

Kriyoprezervasyon çalışmasında, çözüm sonrası her bir örneğe ait dölleme (%), gözlenme (%) ve yumurtadan çıkış (%) oranları Çizelge 3.9.'da verilmiştir. Antioksidan derişimler arasındaki farklar istatistiksel olarak incelenmiştir, tablodaki farklı harfler grup farklılıklarını göstermektedir ($P < 0,05$).

Çizelge 3.9. incelendiğinde, kontrol ve CD dişi bireylerinin örneklerine kıyasla farklı derişimlerde çeşitli antioksidanlar eklenmiş örneklerin dölleme, gözlenme ve yumurtadan çıkış oranlarının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ancak, farklı derişimlerde çeşitli antioksidanlar eklenmiş örneklerin dölleme, gözlenme ve yumurtadan çıkış oranlarının N erkek bireylerin taze spermelerinin oranlarının neredeyse yarı değerinde olduğu belirlenmiştir. Tüm antioksidanlar için dölleme, gözlenme ve yumurtadan çıkış oranlarının 50 mg/L için en yüksek değere sahip olduğu belirlenmiştir. Kriyoprezervasyon sonrasında, sırayla rosmarinik asidin, salisilik asidin ve resveratrolün tüm dölleme özellikleri üzerinde daha etkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, N erkek bireyin taze spermeleri yüksek oranlarda dölleme, gözlenme ve yumurtadan çıkış oranları göstermiştir. CD dişi birey taze spermelerinde çok düşük oranda dölleme belirlenirken, gözlenme ve yumurtadan çıkış belirlenmemiştir.

Çizelge 3.9. Kriyoprezervasyon işleminde antioksidan uygulamalarının çözüm sonrasında döllenme (%), gözlenme (%) ve yumurtadan çıkış (%) oranları üzerine etkileri ($P < 0,05$)

Uygulama	Döllenme (%)	Gözlenme (%)	Yumurtadan Çıkış (%)
RE (25 mg/L)	33,7±1,8 ^{ab}	31,1±2,0 ^a	28,5±1,5 ^a
RE (50 mg/L)	38,0±1,3 ^a	35,5±0,8 ^a	33,2±1,0 ^a
RE (100 mg/L)	31,9±1,2 ^b	30,1±0,8 ^a	28,2±1,2 ^a
RU (25 mg/L)	26,2±2,1 ^a	21,9±2,8 ^a	18,5±2,9 ^a
RU (50 mg/L)	27,2±1,3 ^b	23,8±1,1 ^a	20,5±1,2 ^a
RU (100 mg/L)	24,7±1,1 ^c	21,4±1,5 ^a	18,3±1,0 ^a
RA (25 mg/L)	36,3±2,1 ^a	34,2±1,9 ^a	31,8±1,9 ^a
RA (50 mg/L)	42,0±2,0 ^b	39,4±2,3 ^a	37,0±2,3 ^a
RA (100 mg/L)	37,7±2,4 ^{ab}	35,3±2,7 ^a	33,4±2,8 ^a
KU (25 mg/L)	33,2±1,6 ^a	30,6±2,3 ^a	27,8±2,5 ^a
KU (50 mg/L)	37,2±1,4 ^a	34,9±1,4 ^a	31,4±1,1 ^a
KU (100 mg/L)	33,0±1,4 ^a	30,6±1,4 ^a	28,4±1,4 ^a
KE (25 mg/L)	25,6±0,9 ^a	23,6±0,5 ^a	20,0±0,4 ^a
KE (50 mg/L)	28,9±0,6 ^a	26,4±0,3 ^a	23,6±0,6 ^a
KE (100 mg/L)	24,6±0,9 ^a	22,6±1,0 ^a	20,4±1,1 ^a
SA (25 mg/L)	38,5±1,7 ^a	35,8±1,8 ^a	33,5±1,8 ^a
SA (50 mg/L)	40,9±2,1 ^a	39,0±2,1 ^a	36,0±2,1 ^a
SA (100 mg/L)	40,5±2,1 ^a	37,7±2,1 ^a	34,8±1,8 ^a
Kontrol	24,8±3,3 ^a	19,5±3,7 ^a	13,3±2,3 ^a
Taze Sperm-CD	2,3±1,5 ^b	0,0 ^b	0,0 ^b
Taze Sperm-N	77,6±2,1 ^c	74,1±2,5 ^c	70,7±2,0 ^c

4. TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Cinsiyeti değiştirilmiş (CD) dişi gökkuşuğu alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) testiküler semeninin ve bu semendeki sperm hücrelerinin motilite özelliklerinin incelendiği tez çalışması, 2012-2013 (Aralık, Ocak ve Şubat), 2013-2014 (Aralık, Ocak ve Şubat), ve 2014-2015 (Aralık, Ocak ve Şubat) üreme sezonları boyunca, Fethiye-Muğla'da bulunan ticari bir alabalık üretim işletmesinde gerçekleştirilmiştir. İlk iki üreme sezonunda, seminal plazma biyokimyasal analizleri ve kısa süreli muhafaza çalışmaları gerçekleştirilmiş iken 3. üreme sezonunda sperm hücreleri DNA hasarları ve uzun süreli muhafaza çalışmaları tamamlanmıştır. İlk iki sezonda, toplamda 102 normal (N) erkek bireyin ve 88 CD dişi bireyin semen özellikleri incelenmiştir. İlk sezonda 2-3 yaşında CD bireyler, ikinci sezonda 3-4 yaşındaki CD bireyler, her iki sezonda da 2-3 yaşındaki N erkek bireyler değerlendirilmiştir.

Motilite, semenin dölleme kapasitesinin tayininde önemli bir parametredir. Sperm motilite özelliklerinin tanımlanması, suni dölleme için gerekmektedir (Lahnsteiner vd., 1996a). Bu tanımlama için; döllemenin gerçekleşebileceği olası zaman dilimini gösteren motilite süresi, sperm hücresinin motilitesinin başlama ve engelleme mekanizmaları ve spermin sulandırıcı çözeltilerinde hareket süresinin uzatılması ve dengede tutulması gibi süreçler belirlenmelidir (Lahnsteiner vd., 1997). Böylelikle, sağımdan sonra sperm hücrelerinin istemsizce motil hale geçmesinin önlenmesi, semen muhafazası için motiliteyi durduran veya teşvik eden çözeltilerin geliştirilmesi ve dölleme işlemi için gerekli olan sperm hücrelerine maksimum motilite karakteristiklerini kazandıracak yöntemin belirlenmesi sağlanmaktadır. Özellikle seminal plazma bileşiminin bilinmesi, kısa ve uzun süreli muhafazada kullanılacak sulandırıcı çözeltileri, spermin enerji kaynakları, sperm metabolizması konularında daha fazla ve detaylı bilgilere ulaşılmasını mümkün kılmaktadır. Suni döllemede motilite özellikleri ve semen karakteristiklerinin bilinmesinin son derece önemli olmasına karşın, alabalık üretiminde kullanılmasında birçok avantaj sağlayan CD dişi bireyler ile ilgili bu tür bilgiler son derece kısıtlı ve hatta seminal plazma iyon

bileşimi ve oksidatif yapısı gibi konularda hiçbir bilgiye rastlanmamaktadır. Tez çalışması, temel olarak bu bilgilere ulaşmayı hedeflemektedir. Bu bağlamda, tez çalışmasında CD dışı bireylerin semen özellikleri N erkek bireyler ile karşılaştırmalı olarak incelenerek, kısa ve uzun süreli muhafazalarında antioksidanların pozitif etkilerini, motilite karakteristiklerindeki değişimleri gösterilmiş ve dölleme çalışmaları ile desteklenerek sunulmuştur.

Tez çalışmasında elde edilen sonuçlar bir biri ile bağlantılı üç ana başlık altında değerlendirilebilmektedir;

- ✓ Mevsimsel semen analizleri (sperm hücrelerinin ilk alındıklarındaki motilite özelliklerinin tespiti ve seminal plazma biyokimyasal analizleri)
- ✓ Kısa süreli muhafaza (olgunlaştırma)
- ✓ Uzun süreli muhafaza (kriyoprezervasyon)

Üreme Sezonu Boyunca Semendeki Değişimler ve Seminal Plazma Analizleri

Sperm kalitesi ve bununla ilişkili olarak seminal plazma, üreme sezonu boyunca değişikliğe uğramaktadır (Ciereszko, 2008). Üreme sezonu dışında, anaç balıklardan sperm alınma sıklığı, tutuldukları suyun kalite parametreleri ve sıcaklığı, anaçların beslenmesinde kullanılan yem gibi etkenler, anaç kaynaklı olarak sperm kalitesi ve seminal plazma içeriğini etkilemektedir. Ayrıca, anaçlara anestezi uygulanması, sperm örneğinin alınırken balık vücut sıvıları ile karışması, dölleme ortamının sıcaklığı gibi etkenler seminal plazmanın yapısını değiştirerek sperm kalitesini düşüren ve döllemeyi etkileyen etmenlerdir (Rurangwa vd., 2004). Yetiştiricilik ortamında barındırılan balığın seminal plazma bileşimi ile avcılık yoluyla yakalanan aynı türün seminal plazma kompozisyonu arasında farklar bulunabilmektedir (Butts vd., 2010). Tez çalışmasında, sperm kalitesi ve seminal plazma bileşimindeki farklılıklar, üreme sezonu dönemlerinden ve CD dışı bireylerde genellikle bulunmayan sperm kanallarından kaynaklanmaktadır.

Ilıman iklim balıklarında fotoperiyot ve sıcaklık, üreme gelişimini düzenleyen temel çevresel faktörlerdir. Bu iki faktör, ticari balıkların üretiminin yıl boyu yapılabilmesi için cinsi olgunlaşmayı geliştirmede veya geciktirmede kullanılmaktadır. Fotoperiyot ve sıcaklık uygulamalarını konu alan çalışmalar, üreme mevsiminin semen kalitesi üzerine etkisi çalışmaları ile özdeşleştirilmektedir. Bu uygulamaların sperm derişimi,

motilite yüzdesi ve süresi gibi semen kalitesi üzerine önemli etkileri bir tatlı su levreği türü olan *Perca flavescens*'de gösterilmiştir (Dabrowskii vd., 1996; Ciereszko vd., 1998). Ancak, gökkuşağı alabalığı üretiminde çok yaygın olarak kullanılan fotoperiyot uygulamasının semen kalitesi üzerine etkilerinin incelenerek araştırılması gerekmektedir. Özellikle, doğal üreme sezonu ile arasındaki zamansal farktan dolayı, fotoperiyot uygulamasının semen kalitesi üzerine etkisi farklı olabilmektedir. Örneğin, gökkuşağı alabalığı seminal plazma pH değerlerinin üreme sezonu başı, ortası ve sonu dönemlerindeki değerlere göre daha düşük olduğu saptanmaktadır. Buna karşın, Hibrit çizgili levrek türünde (dişi *Morone chrysops* x erkek *Morone saxatilis*) fotoperiyot uygulaması sonucunda seminal plazma pH değerinde azalma görülmüştür (Tate ve Helfrich, 1998).

Seminal plazma iyon bileşimi, pH ve ozmolarite değerlerinin üreme sezonu boyunca değişimleri, *O. mykiss* (Munkittrick ve Moccia, 1987), *Salmo salar sebago* (Piironen, 1985), *Salmo salar* (Aas vd., 1991), *Salvelinus namaycush* (Johnson vd., 2013), *Zoarcetes americanus* (Wang ve Crim, 1997), *Gadus morhua* (Rouxel vd., 2008; Butts vd., 2010), *Barbus barbus* (Alavi vd., 2008), *Perca fluviatilis* (Alavi vd., 2010), *Cirrhinus mrigala* (Verma vd., 2009), *Rutilus rutilus caspicus* (Golpour vd., 2013), *Cyprinus carpio* ve *Oreochromis mossambicus* (Kruger vd., 1984) gibi farklı türlerde bildirilmiştir. Buna karşın, *Acipenser* türlerinde, sperm yoğunluğu ve motilite özelliklerinde üreme sezonu sonuna doğru önemli derecede azalma olsa da, seminal plazma iyon bileşiminde ve ozmolarite değerlerinde önemli derece farklar bulunmamaktadır (Alav, vd., 2004a; 2004b).

Seminal plazmadaki değişimler, özellikle üreme sezonu sonunda belirgin olmaktadır. Gökkuşağı alabalığında, üreme sezonu sonunda daha düşük protein derişimi ve antiproteinaz aktivitesi gözlenmektedir (Ciereszko vd., 1996;2004). Benzer düşüş, askorbik asit derişiminde de saptanmıştır. Bu düşüşler, üreme sezonu sonunda azalan sperm kalitesine paralellik göstermektedir (Billard, 1986). Gökkuşağı alabalığında, üreme sezonu sonuna doğru Na^+ , K^+ ve Cl^- derişimlerinin azaldığı gözlenmiştir. Üreme sezonunda sperm performansındaki düşüş seminal plazmadaki uygun iyon bileşiminin korunamamasından kaynaklanmaktadır (Munkittrick ve Moccia, 1987). Sezon sonundaki semen kalitesindeki değişiklikler, genellikle semenin vücutta yaşlanması olarak öngörülmektedir (Hajirezaee vd., 2010). N erkek gökkuşağı

alabalık bireylerinde olduğu gibi, CD dişi bireylerde de semen özelliklerinin mevsime bağlı olarak değişebildiği gösterilmiştir. Kış ortasındaki sperm motilitesinin sezon sonuna doğru azaldığı saptanmıştır. (Nynca vd., 2012a).

Gökkuşığı alabalığında, mevsimsel olan spermatogenez üreme sezonu başlamadan 2 ay kadar önce tamamlanmakta, sperm testis boşluklarında tutulmakta ve sperm kanallarına bırakılmaktadır (Loir ve., 1990; Billard, 1986;1992). Sperm hücreleri, üreme sezonu boyunca sperm kanallarında tutulmakta, bu süre 6 ayı bulabilmektedir. Üreme sezonu bitimiyle, kanallarda tutulan bu sperm hücreleri parçalanmaktadır. Sperm hücrelerinin fagositozu, testislerdeki Sertoli hücreleri ve makrofajlar tarafından veya sperm kanallarındaki fagositler ve epitelyal hücreler tarafından gerçekleşir (Billard ve Takashima, 1983; Lahsteiner vd., 1993). Böylelikle, balık bir sonraki üreme dönemine, spermatogeneze hazır hale gelmektedir (Ciereszko vd., 1996). Sperm hücreleri, üreme sezonu süresince, testis ve sperm kanalından gerçekleşecek salgı ve emilimler ile bileşimi düzenlenen seminal plazmanın içinde saklanmaktadır. Seminal plazma içindeki iyonlar, lipitler ve proteinler bütünlük bir etki ile sperm hücrelerini desteklemektedir (Billard ve Takashima, 1983).

CD dişi bireylerin seminal plazma pH değerleri, N erkek bireylerdekinden daha düşüktür. N erkek bireylerde pH değeri sezon başından ortasına önemli derecede artmakta ve sezon sonunda sezon ortasına göre istatistiksel olarak önemli derece fark oluşturmayarak azalmaktadır ($P < 0,05$). CD dişi bireylerin seminal plazma pH değerleri sezon sonuna doğru artış göstermektedir (Şekil 3.2.). Tüm çalışma süresince CD dişi bireylerde saptanan ortalama pH değeri en düşük $7,14 \pm 0,05$, en yüksek $7,40 \pm 0,10$ iken, N erkek bireylerde en düşük $7,66 \pm 0,10$, en yüksek $8,04 \pm 0,10$ olarak saptanmıştır. N erkek bireylere ait pH değerleri, önceki çalışmalarda elde edilen değerler aralığındadır (Çizelge 4.1.). Spermatogenezin tamamlanmasının ardından, testis ve sperm kanalının testise yakın tarafında bulunan sperm hücrelerinin motilite kabiliyetleri kısıtlı olmaktadır (Ciereszko vd., 2008). Salmonid türlerinde, sperm hücrelerinin motilite potansiyelini kazanması testislerden sperm kanallarına geçtikten sonra gerçekleştiği bildirilmiştir. Sperm kanalları içindeki seminal plazma pH değerinin ve bikarbonat (HCO_3^-) derişiminin artması, sperm hücrelerinin olgunlaşması ve motil olmaya hazır hale gelmesinde etkilidir (Morisawa ve Morisawa, 1986; 1988). Morisawa ve Morisawa, (1988) N erkek gökkuşığı alabalığı

testisinden elde ettikleri seminal plazma pH değeri ortalamasını $7,48 \pm 0,06$ olarak, sperm kanalındaki ise $7,99 \pm 0,06$ olarak ölçmüşlerdir. Bu pH artışı, testisten sperm kanalına $7,0-7,2-7,4-7,8$ değerleri ile takip edilebilmektedir (Morisawa vd., 1993). Üreme sisteminde, testis lümenlerinden sperm kanallarına doğru derece derece artan pH değerine paralel olarak HCO_3^- derişimi de artmaktadır. Öyle ki, gökkuşağı alabalığı testis seminal plazmasında $4,9 \pm 0,9$ mM olan toplam inorganik karbon, sperm kanalında $9,2 \pm 1,0$ mM olarak tespit edilmiştir. HCO_3^- derişimi ve pH değeri artışı, spermin motilite potansiyeli kazanması ile pozitif yönde doğrusal ilişki göstermektedir. Hücre dışı ortamda, bunların artışı ile hücre içi cAMP değeri artmaktadır (Morisawa ve., 1993; Krasznai vd., 1999). Japon yılan balığının (*Anguilla japonica*), seminal plazmasında, testiküler seminal plazmadakinden daha yüksek pH değerleri, Na^+ ve Ca^{2+} derişimleri ve daha az K^+ derişimi saptanmıştır. Bu türde testiküler sperm hücrelerinin neredeyse motil olmadığı ve sperm olgunlaşması için pH değerlerindeki ve HCO_3^- derişimlerindeki artışın gerekli olduğu gösterilmiştir (Ohta ve., 1997). Ayrıca, tez çalışmasında N erkek bireylerde üreme sezonu ortası dönemi pH değerindeki artışın benzeri *Gadus morhua* türünde, sezon başında $8,05 \pm 0,20$, sezon ortasında $8,27 \pm 0,03$ olarak gözlemlenmiştir (Butts vd., 2010).

CD dişi bireylerin seminal plazma ozmolarite değerleri üreme sezonu başından sonuna doğru önemli derecede azalma göstermektedir ($P < 0,05$). N erkek bireylerde ise ozmolarite değerleri sezon başından ortasına doğru yükselmekte ve sezon sonunda düşüş göstermektedir. CD dişi bireylerin seminal plazma ortalama ozmolarite değerleri, N erkek bireylere göre daha yüksektir (Şekil 3.3.). 2-3 yaşındaki CD dişi bireylerin seminal plazma ozmolarite değerleri sezon başı ve ortası dönemlerinde sırayla 335 ± 8 ve 322 ± 6 mOsm/kg, aynı üreme sezonunda incelenen N erkek bireylerde sezon başı ve ortası dönemlerinde sırayla 271 ± 13 ve 293 ± 7 mOsm/kg olarak belirlenmiştir. N erkek bireylerin seminal plazma osmolarite değerlerinin sezon ortasında genellikle 300 mOsm/kg civarında olduğu literatürde gösterilmiştir (Çizelge 4.2.). Munkittrick ve Moccia (1987), gökkuşağı alabalığında ozmolarite değerlerini sezon başı, ortası ve sonu dönemleri için sırayla $169,1 \pm 13,5$; $131,1 \pm 11,8$ ve $116,1 \pm 11,1$ mOsm/kg olarak ölçmüşlerdir. Nynca vd., (2012a) CD dişi bireylerin seminal plazma ortalama ozmolarite değerlerinde, tez çalışması bulgularına benzer şekilde üreme sezonu sonunda, sezon başına göre istatistiksel

olarak önemli derecede düşüş tespit etmişlerdir. Farklı türlerde ozmolarite değişimi, üreme sezonu dönemlerinde farklı olmaktadır. Örneğin, *Gadus morhua* türünde, üreme sezonu başından ortasına doğru ozmolarite değerinin arttığı saptanmıştır (Butts vd., 2010).

Çizelge 4.1. Bazı Salmonid türlerinde ve tez çalışmasında incelenen üreme sezonu ortasında seminal plazma ozmolarite ve pH değerleri (ort, ort $\pm$ std, minimum-maksimum)

Balık Türü	Ozmolarite (mOsmol/kg)	pH	Kaynaklar
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	293,0 $\pm$ 7,0	8,04 $\pm$ 0,10	Bu çalışmada (1)
<i>O. mykiss</i>	290,0 $\pm$ 7,0	8,01 $\pm$ 0,09	Bu çalışmada (2)
<i>O. mykiss</i>	235,0 $\pm$ 63,0	-	Ciereszko vd., 2014
<i>O. mykiss</i>	296,6 $\pm$ 3,4	-	Dietrich vd., 2008
<i>O. mykiss</i>	230,6 $\pm$ 98,6	7,95 $\pm$ 0,14	Dziewulska vd., 2008
<i>O. mykiss</i>	172-243	-	Ciereszko vd., 2006
<i>O. mykiss</i>	>235	-	Dietrich vd., 2005
<i>O. mykiss</i>	322,1 $\pm$ 21,8	-	Glogowski vd., 2000
<i>O. mykiss</i>	313,3 $\pm$ 22,3	8,11	Lahnsteiner vd., 1998
<i>O. mykiss</i>	308,0 $\pm$ 12,9	-	Koldras vd., 1996
<i>O. mykiss</i>	-	7,99 $\pm$ 0,06	Morisawa ve Morisawa, 1988
<i>O. mykiss</i>	297,0 $\pm$ 15,0	-	Morisawa, 1985
<i>O. mykiss</i>	297,0	-	Morisawa vd., 1983
<i>O. mykiss</i>	-	8,20	Baynes vd, 1981
<i>O. mykiss</i>	-	8,20-8,30	Nomura, 1964
<i>O. keta</i>	332,0 $\pm$ 5,1	-	Morisawa vd., 1979
<i>O. tshawytscha</i>	265,0 $\pm$ 32,0	8,43 $\pm$ 0,13	Rosengrave vd., 2009
<i>Salmo salar</i>	245,0 $\pm$ 55,0	-	Aas vd., 1991
<i>Salmo salar</i>	232,0 $\pm$ 13,0	-	Hwang ve Idler, 1969
<i>S. trutta caspius</i>	188,2 $\pm$ 8,7	8,00 $\pm$ 0,10	Hajirezaee vd., 2009

Çalışmada, N erkek bireylerin seminal plazmasında Na⁺ derişimlerinde üreme sezonu ortasında artış gözlemlenmiştir (Şekil 3.4.). Na⁺ derişimleri 1. üreme sezonu başında 97,1 $\pm$ 10,2 mM iken ortasında 104,2 $\pm$ 10,2 mM, 2. üreme sezonu başında 87,8 $\pm$ 13,2 mM iken ortasında 101,1 $\pm$ 12,2 mM olarak ölçülmüştür. CD dişi bireylerin seminal plazma Na⁺ derişimleri (ölçülen en düşük ortalama 101,7 $\pm$ 14,9 mM) N erkek bireylerinkinden (ölçülen en düşük ortalama 87,8 $\pm$ 13,2 mM) daha yüksektir. Ayrıca, CD dişi bireylerde üreme sezonu başından sonuna doğru Na⁺ derişimleri göreceli olarak azalmakta ve 2-3 yaşındaki bireylerin Na⁺ derişimleri (sezon ortasında 119,8 $\pm$ 9,9 mM) 3-4 yaşındakilerinkinden fazladır (sezon ortasında 107,2 $\pm$ 7,9 mM). CD dişi bireylerin seminal plazmalarındaki K⁺ derişimleri (ölçülen

en düşük ortalama değer $34,0 \pm 6,3$ mM), N erkek bireylerdekilere (ölçülen en düşük ortalama değer $19,7 \pm 3,3$ mM) her sezon dönemi için daha yüksektir. Şekil 3.5.'e göre CD dişi bireylerin K^+ derişimleri sezon sonuna doğru azalmaktadır (1. üreme sezonu sezon başı $51,4 \pm 7,4$ mM, sezon sonu $43,7 \pm 3,9$ mM, 2. üreme sezonu sezon başı $42,0 \pm 2,1$ mM, sezon sonu $34,0 \pm 6,3$ mM). N erkek bireylerde ise üreme sezonu ortasında artış, sonunda ise düşüş görölmektedir. Ayrıca 2-3 yaşındaki CD dişi bireylerin seminal plazmaları, 3-4 yaşındakilere göre daha yüksek K^+ derişimleri içermektedir (sezon sonu değerleri sırasıyla $43,7 \pm 3,9$ mM ve $34,0 \pm 6,3$ mM). N erkek birey seminal plazmalarındaki Cl^- derişimleri sezon sonuna doğru düşüş göstermektedir. 1. ve 2. üreme sezonu için sırayla sezon başlarında $122,1 \pm 11,5$ ve $88,3 \pm 14,0$ mM, sezon sonlarında $89,9 \pm 18,7$ ve $53,4 \pm 18,4$ mM olarak belirlenmiştir (Şekil 3.6.). N erkek bireylere göre seminal plazmalarında daha yüksek miktarda Cl^- içeren CD dişi bireylerde, sezon ortasında daha yüksek derişimler ölçölse de, özellikle 3-4 yaşındaki bireylerde sezon boyunca Cl^- derişimlerindeki değişimler istatistiksel olarak önemsizdir ($P < 0,05$). Çizelge 4.2.'de verilen önceki çalışmalara ait Na^+ , K^+ ve Cl^- derişimlerinin, tez çalışmasındaki sezon ortası verileri ile uyumluluk gösterdiği izlenmektedir.

Na^+ , K^+ ve Cl^- derişimlerindeki sezon dönemlerindeki değişimler diğer çalışmalarda da saptanmıştır. Munkittrick ve Moccia (1987), Kanada'da yaptıkları çalışmada gökkuşakđı alabalıkında, Na^+ derişimlerini sezon başından sonuna doğru (Şubat, Mart ve Nisan) $67,1 \pm 6,0$, $54,8 \pm 5,2$ ve $43,4 \pm 5,5$ mM olarak ölçmüş, Na^+ derişiminin sezon sonuna doğru azaldığını bildirmişlerdir. Doğu (2011), Aralık-Ocak-Şubat aylarının üreme sezonu başı, ortası ve sonu olduğu çalışmasında, gökkuşakđı alabalık seminal plazmasında Na^+ derişimi ortalamalarını sırasıyla, $71,99 \pm 4,76$; $89,88 \pm 12,63$ ve $101,73 \pm 18,68$ mM olarak tespit etmiştir. Her iki çalışmada da K^+ derişimlerinin sezon sonuna doğru azaldığı gözlenmiştir. Munkittrick ve Moccia (1987), K^+ derişiminin sezon başında $14,7 \pm 1,1$ mM'dan sezon sonuna $8,6 \pm 1,0$ mM değerine; Doğu (2011) ise $31,7 \pm 1,4$ mM'dan $27,8 \pm 2,2$ mM değerine düştüğünü göstermişlerdir. *Gadus morhua* seminal plazma Na^+ derişimi ortalamaları üreme sezonu boyunca çan eğrisi şeklindedir. K^+ derişimi ise sezon başından sonuna doğru, $7,37 \pm 0,80$; $5,92 \pm 0,82$ ve $5,36 \pm 0,87$ mM şeklinde azalmıştır (Butts vd., 2010). Çeşitli balık türlerinin Cl^- derişimlerinde sezon başından sonuna doğru azalma farklı çalışmalarda gösterilmiştir (Munkittrick ve Moccia, 1987; Alavi vd., 2010; Golpour

vd., 2010). Ancak belirtilmelidir ki, üreme sezonu dönemlerindeki iyon derişimleri değişimleri her zaman istatistiksel açıdan anlamlı olmayabilmektedir.

Tez çalışmasında, sezon ortasında saptanan Ca^{2+} ve Mg^{2+} derişimleri literatürde tayin edilen değerler aralığında yer almaktadır (Çizelge 4.2.). Her ne kadar bazı istatistiksel olarak farklar saptansa da, genelde CD dişi ve N erkek bireylerin seminal plazmalarında Ca^{+2} derişimleri birbirlerine yakındır (Şekil 3.7.). Ca^{+2} derişimleri 1. üreme sezonu ortasında CD dişi bireylerde $1,09\pm0,29$ mM, N bireylerde $0,74\pm0,23$ mM olarak ölçölmüşken, ikinci sezon ortasında ise CD dişi bireylerde $0,83\pm0,29$ mM N bireylerde $0,67\pm0,11$ mM olarak ölçölmüştür. N erkek bireylerin seminal plazmasında genel olarak Ca^{+2} derişimleri sezon başına göre sezon ortasında düşüş göstermektedir. CD dişi bireylerde ise Ca^{+2} derişimleri sezon sonuna doğru artmakta veya değişmemektedir. İlk örnekleme sezonunda incelenen 2-3 yaşındaki CD dişi bireylerin seminal plazmalarında (sezon ortası $1,86\pm0,12$ mM), ikinci sezon incelenen 3-4 yaşındaki CD dişi bireylere göre (sezon ortası $1,19\pm0,28$ mM) daha yüksek Mg^{2+} derişimleri bulunmuştur. 2-3 yaşındaki CD dişi balık seminal plazmaları N erkeklerinkine oranla daha fazla Mg^{2+} içermektedirler (Şekil 3.8.). Buna karşın 3-4 yaşındaki CD dişi balık seminal plazmaları Mg^{2+} derişimleri açısından, üreme sezonu dönemlerinde N normal erkeklerinkinden istatistiksel olarak önemli farklar bulunmamaktadır. N erkek bireylerin seminal plazma Ca^{2+} ve Mg^{2+} derişimlerinin sezon ortasında artış gösterdiği farklı balık türlerinde gösterilmiştir (Butts vd., 2010; Doğu, 2011; Golpour vd., 2013). CD dişi ve N erkek bireylerin seminal plazmalarında, tüm iyonlar arasında en az derişim farkı gösteren Ca^{2+} iyonudur. CD dişi bireylerde, sperm hücre yoğunluğuna oranla az miktarda Ca^{2+} bulunmaktadır. Motilite sırasında, Ca^{2+} iyonu ortamdan hücre içine girmekte ve motilite düzenleyicisi olarak tanımlanmaktadır (Cosson vd., 1989; Krasznai vd., 2003; Alavi ve Cosson, 2006). Ayrıca, Ca^{2+} 'nin bağlandığı özel protein yapılar ve Ca^{2+} kanallarının aktivasyonu sperm flagellumunun atım hızını artırarak, sperm hücresine doğrusal hareket kazandırmaktadır. Birçok balık türünde Ca^{2+} iyonunun olmadığı ortamda, motilite başlatılamamaktadır (Alavi vd., 2011; Dietrich vd., 2011; Butts vd.,2013). *Salvelinus fontinalis* türü için sezon sonunda, doğrusal hareketin azaldığı sperm örneklerinin, Ca^{2+} derişimi arttırılmış aktivasyon çözeltisi ile doğrusal hareketinin arttığı gösterilmiştir (Bondarenko vd., 2014). Bu durumda, CD dişi bireylerinin sperm kanallarında uygun pH değerine maruz kalmaması nedeniyle

tam olarak olgunlaşamamasının yanı sıra, Ca^{2+} derişiminin düşük olması nedeniyle de sperm motilite karakteristiklerinde azalma olabilmektedir. Mg^{2+} derişimi için net bir çıkarımda bulunulamamaktadır. Ancak, 3-4 yaşındaki CD dişi bireylere göre sperm motilite kalitesinin daha yüksek olduğu 2-3 yaşındaki CD dişi bireylerin seminal plazmaları N erkeklere göre daha yüksekken, 3-4 yaşındaki CD dişi bireylerin seminal plazma Mg^{2+} derişimleri N erkek bireylerinininkine yakındır (Şekil 3.8.). Bu durum, üreme sistemindeki seminal plazma içeriğindeki Mg^{2+} iyonunun da spermin motil olmaya hazır hale gelmesinde rolü olduğunu gösterebilmektedir. Ancak, Mg^{2+} iyonu ile ilgili destekleyici çalışmalar bulunmamaktadır. Öyle ki Alavi ve Cosson (2006), sperm motilitesini konu alan genel değerlendirme çalışmalarında Mg^{2+} iyonunun balık motilitesi üzerine etkisinin araştırılması gerektiğini bildirmişlerdir.

Çizelge 4.2. Bazı Salmonid türlerinde ve tez çalışmasında incelenen üreme sezonu ortasında seminal plazma Na⁺, K⁺, Cl⁻, Ca²⁺ ve Mg²⁺ değerleri (ort, ort±std)

Balık Türü	Na ⁺ (mmol)	K ⁺ (mmol)	Cl ⁻ (mmol)	Ca ²⁺ (mmol)	Mg ²⁺ (mmol)	Kaynaklar
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	104,2±10,2	25,2±3,5	95,8±15,6	0,74±0,23	0,93±0,25	Bu çalışmada (1)
<i>O. mykiss</i>	101,1±12,2	24,4±3,0	77,2±19,4	0,67±0,11	0,88±0,20	Bu çalışmada (2)
<i>O. mykiss</i>	89,9±12,6	30,6±2,4	-	3,45±0,89	3,72±0,06	Doğu, 2011
<i>O. mykiss</i>	81,2 ± 5,2	18,6 ± 1,3	-	0,40±0,05	-	Sheikhzadeh vd., 2010
<i>O. mykiss</i>	111,0± 29,8	29,8 ± 8,8	95,8 ± 33,6	0,74 ± 0,48	1,13 ± 0,53	Dziewulska vd., 2008
<i>O. mykiss</i>	122,2±14,2	30,4±4,5	-	1,10±0,26	0,85±0,13	Glogowski, vd., 2000
<i>O. mykiss</i>	159,8±30,8	25,7±4,1	-	1,20±0,3	-	Lahnsteiner vd., 1998
<i>O. mykiss</i>	110,0±7,3	43,4±2,1	129±7,3	2,10±0,45	2,50±0,34	Koldras vd., 1996
<i>O. mykiss</i>	-	34,5± 4,5	-	-	-	Gwo vd., 1993
<i>O. mykiss</i>	128,9	32,5	143,0	2,70	1,02	Morisawa ve Morisawa, 1988
<i>O. mykiss</i>	67,1	14,7	-	-	-	Munkittrick ve Moccia, 1987
<i>O. mykiss</i>	127,0	37,3	-	2,60	1,50	Morisawa vd., 1983
<i>O. mykiss</i>	104,0	25,3	135,0	1,40	1,10	Holtz vd., 1979
<i>O. mykiss</i>	133,0	20,0	130,0	-	-	Schlenk ve Kahmann,1938
<i>O. keta</i>	142,0±1,7	66,1±4,9	134,0±1,3	2,20±0,10	1,60±0,10	Morisawa vd., 1979
<i>O. tshawytscha</i>	110,0±26,0	37,3±6,0	109,0±17,0	0,65±0,22	1,15±0,41	Rosengrave vd., 2009
<i>Salmo clarki</i>	107,0	38,6	156,0	0,30	1,50	Cruea, 1969
<i>S. salar</i>	92,8±23,9	27,5±5,3	-	-	-	Aas vd., 1991
<i>S. salar</i>	103,0	22,0	-	1,30	0,90	Hwang ve Idler, 1969
<i>S. trutta caspius</i>	131,7±6,3	36,2±7	133,7±6,0	1,40±0,30	1,00±0,20	Hajirezaee vd., 2009
<i>S. trutta caspius</i>	159,2±8,8	33,7± 2,0	133,0± 6,0	1,70±0,20	1,00 ±0,10	Hatef vd., 2007

Tez çalışmasında, N erkek ve CD dişi bireylerden elde edilen semen örneklerindeki ortalama sperm yoğunlukları üreme sezonu ortasında, sezon başına göre artış göstermektedir. Ayrıca, CD dişi bireylerin N erkek bireylerden 5-6 kat daha fazla sperm hücresi yoğunluğuna sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.1.). N erkek bireylerde saptanan minimum ortalama $4,97 \pm 0,97 \times 10^9/\text{mL}$ iken, CD dişilerinki $22,77 \pm 1,05 \times 10^9/\text{mL}$ 'dir. Bununla birlikte, 2. üreme sezonunda incelenen 3-4 yaşındaki CD dişi bireylerin semen örnekleri, üreme sezonu ortası ve sonu dönemlerinde, bir önceki yıl örneklenen 2-3 yaşındaki CD dişi bireylere göre istatistiksel olarak önemli derecede yüksek ortalama sperm yoğunluğu içermektedir ($P < 0,05$). Üreme sezonu sonu dönemlerinde, 2-3 yaş CD dişi bireylerde sperm yoğunluğu $30,44 \pm 1,75 \times 10^9/\text{mL}$, 3-4 yaşındaki CD dişi bireyler de ise $37,09 \pm 3,30 \times 10^9/\text{mL}$ olarak belirlenmiştir. Tez çalışmasında belirlenen değerler, önceki çalışmalarda (Çizelge 4.3. ve Çizelge 4.4.) tespit edilen değerler aralığındadır. *O. mykiss* türünde saptandığı gibi (Munkittrick ve Moccia, 1987; Koldras vd.,1996), *Barbus barbus*, *Cyprinus carpio* gibi bir çok türde üreme sezonu ortasında semende sperm yoğunluğunda artış gözlenmiştir. Tez çalışmasında da bu artış, hem N erkek hem de CD dişi bireylerde istatistiksel olarak önemli derecede fark ile saptanmıştır ($P < 0,05$). Nynca vd. (2012a), üreme sezonu sonunda N erkek bireylerin sperm yoğunluğunda istatistiksel olarak önemli derece azalma, CD dişi bireylerde ise sperm yoğunluğunda üreme sezonu sonunda istatistiki olarak önemli derecede olmamasına karşın artış gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, tez çalışmasında bulunan sonuçlar ile paralellik göstermektedir.

Hem CD dişi hem de N erkek bireylerin seminal plazmalarındaki ortalama protein derişimleri sezon başından sonuna doğru azalma göstermektedir. Örneğin, CD dişi bireylerin seminal plazmasındaki ortalama protein derişimleri 1. ve 2. üreme sezon başı dönemlerinde sırasıyla $777,3 \pm 191,0$ ve $822,5 \pm 130,7$ mg/dL olarak ölçülmüşken, sezon sonu dönemlerinde sırasıyla $399,0 \pm 161,7$ ve $339,2 \pm 135,3$ mg/dL olarak belirlenmiştir (Şekil 3.9.). CD dişi bireyler, N erkek bireylere göre, her dönemde 10 kat civarında daha fazla protein derişimine sahiptir. Örneğin, 1. üreme sezonu sonunda CD dişi bireylerin seminal plazmasında protein derişimi $399,0 \pm 161,7$ mg/dL iken N erkek bireylerde $38,6 \pm 19,6$ mg/dL değerindedir. Benzer şekilde 2. Üreme sezon sonunda CD dişi bireylerde $339,2 \pm 135,3$ mg/dL iken N erkek bireylerde ortalama $32,2 \pm 15,7$ mg/dL olarak bulunmuştur. 2-3 ve 3-4 yaş CD dişi bireyler

arasında belirgin istatistiksel farklar gözlenmemiştir. N erkek ve CD dişi bireylerin seminal plazmalarında önceki çalışmalarda saptanan protein derişimleri Çizelge 4.3. ve 4.4.'te sunulmuştur. Gökkuşığı alabalığında, seminal plazma protein derişimi (sezon başı 60 mg/dL civarı, sezon sonu 25 mg/dL altı) ve antiproteaz aktivitesi üreme sezonu başından sonuna doğru azalmaktadır (Ciereszko vd., 1996). Gökkuşığı alabalığı protein miktarının sezon başında, sonuna kıyasla daha yüksek olduğu Sanchez-Rodriguez vd. (1978), tarafından da gösterilmiştir. Seminal plazma proteinleri kandan kaynaklanabilmekte veya üreme sistemi kanalarında sentezlenebilmektedir (Loir ve., 1990; Lahnsteiner vd., 1993). Üreme sezonu sonuna doğru bu iki yoldan gelen proteinler hormonal etki ile azaltılmaktadır (Marshall vd., 1993; Ciereszko vd., 1996). Bu biyolojik neden dışında, anaç bireylerin sık sağılmasıyla kandan ve üreme kanallarından gelen proteinin telafi edilme hızında uyumsuzluk olmakta ve seminal plazmada protein derişiminin azalmasına sebep olabilmektedir (Ciereszko vd., 1996). Ayrıca plazma proteinlerinin sperm hücreleri üzerine koruyucu etkisi bulunmaktadır (Billard ve Takashima, 1983). Bu koruyucu etkinin üreme sezonu sonunda ortadan kalktığı düşünülmektedir, ki sperm hücrelerinin vücut içerisinde parçalanması gerçekleşebilmektedir (Ciereszko vd., 1996). Bazı protein ve metabolitlerin (örneğin askorbil fosfat gibi bir C vitamini türevi), sperm kanallarında motilite inhibisyonuna da katkısı bulunmaktadır (Ciereszko vd., 1996; Nynca vd., 2012a). Tez çalışmasında, hem CD dişi hem de N erkek bireylerde üreme sezonu başından sonuna doğru protein derişimlerinde azalma gözlemlenmiştir. Ayrıca CD dişi bireylerinin seminal plazma protein derişimlerinin N erkek bireylerinkine kıyasla üreme sezonu başı, ortası ve sonu dönemleri için sırasıyla 4,4; 4,8, ve 8 kat daha fazla olduğunu saptamışlardır.

Çizelge 4.3. CD dişi gökkuşuğu alabalığında önceki çalışmalarda sunulmuş ve tez çalışmasında incelenen üreme sezonları sezon ortalarında saptanmış bazı seminal plazma parametreleri (ort±std, minimum-maksimum)

Balık Türü	Protein (mg/dL)	Ozmolarite (mOsm/kg)	Sperm Yoğunluğu ($\times 10^9$ /mL semen)	Kaynaklar
<i>O. mykiss</i>	610,8±204,8	322,0±6,0	30,44±1,75	Bu çalışmada (1)
<i>O. mykiss</i>	569,5±139,4	320,0±4,0	37,09±3,30	Bu çalışmada (2)
<i>O. mykiss</i>	-	-	32,66 ±3,37	Ciereszko vd., 2015
<i>O. mykiss</i>	-	-	35,10±6,50	Hliwa vd., 2014
<i>O. mykiss</i>	190-850	299,0-347,0	20,20-49,40	Nynca vd., 2012
<i>O. mykiss</i>	765,0±505,0	308,0±20,0	21,63±2,65	Kowalski vd., 2011
<i>O. mykiss</i>	-	-	22,50±8,33	Geffen ve Evans 2000

Her iki sezonda da analiz edilen N erkek birey seminal plazmalarında glukoz ve trigliserit derişimi değerlerinin ölçüm limitlerinin altında olduğu belirlenmiştir (sırasıyla <5 ve <7 mg/dL). Buna karşın, ölçülen en yüksek metabolit (glukoz, kolesterol, üre ve trigliserit) değerleri, CD dişi balıkların seminal plazmalarında saptanmaktadır. Özellikle sezon sonuna doğru daha yüksek trigliserit değerleri ölçülmüştür (Çizelge 3.1.). Balık spermi tarafından alınan hücre dışı glukozun, bir enerji kaynağı olarak kullanıldığı *O. mykiss* ve birçok balık türünde gösterilmiştir (Lahnsteiner vd., 1997). Balık spermi tarafından kullanılabilir olan glukoz sınırlı miktardadır (Turner ve Korsh, 1963). *O. mykiss* semeninde, solunum sırasında $0,04\pm0,03$ nmol glukoz/dakika $\times 10^{11}$ sperm olan glukoz kullanım oranı, spermin motil olması ile glukolitik oranı $4,82\pm2,45$ nmol glukoz/dakika $\times 10^{11}$ sperm şeklinde artmaktadır (Lahnsteiner vd., 1999). *Morone saxatilis* türünde, semenin kısa süreli saklanması çalışmasında, sulandırma yapılan suni seminal plazmanın aynı hücre yoğunluğu için 8 mg/dL fazla glukoz içermesinin enerji kaynağı teşkil etmediği ve bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Jenkins-Keeran ve Woods, 2002). Tez çalışmasında, <5 mg/dL limitinin altında değerlerin bulunmasına karşın, özellikle CD dişi bireylerin seminal plazmalarında daha yüksek değerlerde bulunmuştur (Çizelge 3.1.). Gökkuşuğu alabalığı seminal plazması yeterli miktarda glukoz içermektedir. Doğu (2011), seminal plazma glukoz derişimini sezon başından sonuna doğru $1,14\pm0,19$ ortasında $1,91\pm0,51$ sonunda $1,53\pm0,59$ mg/dL olarak tespit etmiştir. Ayrıca, Dziewulska vd. (2008), gökkuşuğu alabalığı seminal plazmasında glukoz derişiminin 0-5 mg/dL aralığında olduğunu, Sheikhzadeh vd. (2010), ortalama glukoz değerini $1,05\pm0,13$ mg/dL olarak tespit etmiştir (Çizelge 4.4.).

Trigliseritler, hücre enerji metabolizmasında görev almakta ve sperm hücre zarında bu moleküller için reseptör bölgeleri bulunmaktadır (Argov vd., 2007). Motilite sonrası, ATP moleküllerinin tekrar üretildikleri safhada trigliserit değerlerinde düşüş saptanmıştır (Lahnsteiner vd., 1993). Ancak, seminal plazmada yeteri kadar trigliserit bulunmakta ve bu sebeple sınırlayıcı bir etkisi olduğu düşünülmemektedir (Çizelge 4.4.) Kolesterol ve diğer lipitlerin seminal plazmada bulunması, sperm kalite değerlendirmesi için kullanılabilir. Kolesterol derişimindeki üreme sezonu süresince tespit edilen değışimler, sperm hücre zarı bütünlüğü için kullanılmasından kaynaklı olabilmektedir (Beer-Ljubic vd., 2009). Bu durumda, CD dişi bireylerin semeninde hücre zarı tam olgunlaşmamış hücrelerin çokluğu, bu bireylerin seminal plazmalarında daha çok miktarda kolesterolün bulunmasına neden olabilmektedir. Seminal plazmadaki iyonların dışında organik maddelerin de sperm hücrelerinin depo edilmesinde önemli görevleri bulunmaktadır. Seminal plazmada yoğun olarak bulunan lipoproteinler, *in vivo* depolama süresince hücre zarı lipit bileşiminin bir çeşit bakımını sağlamaktadır (Loir vd., 1990). Seminal plazmadaki üre miktarı, protein miktarı ve metabolizması ile ilgidir (Srivastava vd., 1984). Bu sebeple üre miktarı, protein derişimi daha yüksek olan CD dişi birey seminal plazmalarında daha yüksek değerlerde tespit edilmiştir.

Çizelge 4.4. Bazı Salmonid türlerinde ve tez çalışmasında incelenen üreme sezonu ortasında sperm yoğunluğu ve seminal plazma protein, trigliserit, glukoz ve kolesterol derişimleri değerleri (ort, ort±std, minimum-maksimum)

Balık Türü	Sperm Yoğunluğu (x10 ⁹ /mL semen)	Protein (mg/dL)	Trigliserit (mg/dL)	Glukoz (mg/dL)	Kolesterol (mg/dL)	Kaynaklar
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	11,55±1,42	60,7±20,6	<7-21	<5	<7	Bu çalışmada (1)
<i>O. mykiss</i>	11,14±1,59	66,3±22,7	<7-25	<5	<7	Bu çalışmada (2)
<i>O. mykiss</i>	9,87±2,74	-	-	-	-	Ciereszko vd., 2014
<i>O. mykiss</i>	5,53±1,40	-	22,78±2,42	1,91±0,51	8,71±0,72	Doğu, 2011
<i>O. mykiss</i>	11,52±0,72	83,66±6,12	7,72±0,58	1,05±0,13	-	Sheikhzadeh vd., 2010
<i>O. mykiss</i>	6,85±1,49	-	-	-	-	Dietrich vd., 2008
<i>O. mykiss</i>	10,73±4,44	104,0±57,0	-	0,0-5,0	-	Dziewulska vd., 2008
<i>O. mykiss</i>	8,90	-	-	-	-	Geffen ve Evans, 2000
<i>O. mykiss</i>	10,39±2,13	124,1±30,8	-	-	-	Glogowski, vd., 2000
<i>O. mykiss</i>	-	147,0	-	4,10	-	Lahnsteiner vd., 1998
<i>O. mykiss</i>	11,80±6,19	130,0±20,0	-	-	-	Ciereszko ve Dabrowski, 1993
<i>O. mykiss</i>	6,08±1,84	-	-	-	-	Gwo vd., 1993
<i>O. mykiss</i>	13,60±1,20	-	-	-	-	Campbell vd., 1992
<i>O. mykiss</i>	-	170,0±10,0	-	-	-	Loir vd., 1990
<i>O. mykiss</i>	4,85	-	-	-	-	Munkittrick ve Moccia, 1987
<i>O. mykiss</i>	4,80-25,40	-	-	8,00	-	Piironen ve Hyvarinen, 1983
<i>O. mykiss</i>	-	174,0-189,0	-	-	-	Sanchez-Rodriguez vd., 1978
<i>O. tshawytscha</i>	-	105,0±49,0	-	-	-	Rosengrave vd., 2009
<i>Salmo clarki</i>	-	37,0	-	-	-	Cruea, 1969
<i>S. salar</i>	3,50-17,90	-	-	-	-	Aas vd., 1991
<i>S. salar sebago</i>	-	-	-	17,78	-	Piironen ve Hyvarinen, 1983
<i>S. trutta caspius</i>	3,60±0,50	30,0±10,0	26,57±8,86	2,00±1,10	-	Hajirezaee vd., 2009
<i>S. trutta caspius</i>	0,71-6,46	75,0 ±14,0	-	3,81± 1,04	2,86 ±0,58	Hatef vd., 2007

Çizelge 4.4. (devam)

Balık Türü	Sperm Yoğunluğu (x10 ⁹ /mL semen)	Protein (mg/dL)	Trigiliserit (mg/dL)	Glukoz (mg/dL)	Kolesterol (mg/dL)	Kaynaklar
<i>Salmo trutta fario</i>	12,35±0,34	81,49±5,57	-	-	-	Asadpour vd., 2013
<i>S. trutta lacustris</i>	14,10	-	-	4,65	-	Piironen ve Hyvarinen, 1983
<i>Salvelinus alpinus</i>	-	-	-	50,0–120,0	-	Atse vd., 2002

Metabolizma sonucu oluşan serbest radikalleri ortadan kaldıran ve oksidasyon tepkimelerini inhibe eden antioksidan maddelerin ve enzimlerin yeterli miktarda olmaması, hücrelerde hasara hatta ölüme sebebiyet verebilen oksidatif strese yol açabilmektedir (Sikka vd., 1995; Tramer vd., 1998). Reaktif oksijen türleri, sperm hücresinin normal fizyolojik sürecinin bir ürünüdür. Ancak, üreme sisteminden kaynaklanan lökosit kontaminasyonu veya fazla sitoplazma içeren anormal sperm hücreleri sebebiyle, seminal plazmada aşırı reaktif oksijen türleri bulunabilmektedir (Aitken vd., 1992; Kessopoulou vd., 1992). Spermatogenezin son aşamasında, sperm hücresi içerisindeki sitoplazmanın büyük kısmı atılmaktadır. Böylelikle, olgunlaşmış bir sperm hücresi peroksidasyon kaynaklı hasara karşı direnci olmamaktadır. Ayrıca, bu sperm hücresi neredeyse hiç enzim içermemektedir. Ayrıca, doymamış yağ asitlerince zengin olan sperm hücre zarı, serbest radikallerin etkilerine son derece hassastır (Alvarez vd., 1987; Sikka, 2004). Böylelikle, reaktif oksijen türleri sperm hücre zarında lipid peroksidasyonuna, mitokondrilerin bulunduğu sperm orta kısmında zarara görmesine, aksonem yapısını bozulmasına, motilite özelliklerinin azalmasına, DNA yapısının bozulmasına ve dolayısıyla dölleme kapasitesinin düşmesine sebep olabilmektedir (Sikka vd., 1995; Tramer vd., 1998). Memelilerde semenin antioksidan sistemi üzerine detaylı çalışmalar olmasına karşın (Alvarez ve Storey, 1989), balıklarda bu çalışmalar sınırlıdır ve son yıllarda artış göstermektedir (Lahnsteiner vd., 2010; Dzyuba vd., 2014). Seminal plazmadaki antioksidan miktarı ve enzim aktiviteleri ile antioksidan sisteminin genel değerlendirilmesi, sperm kalitesini açıklamada son derecede önem kazanacağı düşünülmektedir (Dzyuba vd., 2014).

LPO (lipit peroksidasyonu) değerleri N erkek bireylerin seminal plazmalarında, CD dişi bireylerinkine göre daha fazladır. 2-3 yaşındaki CD dişi balıkların seminal plazmalarında sezon ortasında ortalama $22,65 \pm 14,25 \text{ nmol/mg} \times 10^{-3}$, 3-4 yaşındaki CD dişi balıklarınkinden ise $16,95 \pm 5,52 \text{ nmol/mg} \times 10^{-3}$ olarak ölçülmüştür. N erkek bireylerde ise 1. ve 2. üreme sezon ortalarında sırasıyla $112,23 \pm 38,53$ ve $105,65 \pm 29,55 \text{ nmol/mg} \times 10^{-3}$ olarak saptanmıştır. Hem CD dişi hem de N erkek bireylerde sezon sonuna doğru ortalama LPO değerleri yükselmektedir (Şekil 3.10.). CD dişi ve N erkek bireylerin seminal plazmalarındaki KAT (katalaz aktivitesi) değerleri arasında, üreme sezonları arasında istatistiksel farklar olmamasına karşın, N erkek seminal plazmaları, CD dişi bireylerdeki göre daha yüksek KAT değerlerine

sahiptir. Hem CD diři hem de N erkek bireylerin seminal plazmalarındaki ortalama KAT değerleri üreme sezonu sonuna doğru düşüş göstermektedir. KAT değerleri 2-3 yaşındaki CD diři bireylerde sezon başı ve sonu dönemlerinde sırasıyla $0,37\pm0,11$ ve $0,21\pm0,10$ kU/mg protein olarak, 3-4 yaşındaki CD diři bireylerde ise sezon başı ve sonu dönemlerinde sırayla $0,43\pm0,15$ ve $0,26\pm0,14$ kU/mg protein olarak bulunmuştur. Buna karşın N erkek bireylerde 1. üreme sezonu başı ve sonu dönemlerinde $0,47\pm0,15$ ve $0,43\pm0,17$ kU/mg protein olarak, 2. üreme sezonu başı ve sonu dönemlerinde sırayla $0,45\pm0,22$ ve $0,47\pm0,32$ kU/mg protein olarak tayin edilmiştir (şekil 3.11.). TAK (toplam antioksidan kapasitesi) değerleri hem CD diři hem de N Erkek bireylerde sezon başından sonuna doğru düşmektedir. 3-4 yaşındaki CD diři bireylerin seminal plazmasında, N erkek bireylere göre daha fazla toplam antioksidan madde bulunmaktadır. Sezon ortasında CD diři bireylere ait seminal plazma ortalama TAK değeri $0,116\pm0,033$ mM iken aynı dönemde N erkek bireyler için $0,015\pm0,004$ mM olarak bulunmuştur (şekil 3.12.). Antioksidan kapasitesindeki bu değişikliler, FTIR spektrumlarındaki fenolik gruplardaki değişiklikler ile de desteklemektedir (şekil 3.13. ve şekil 3.14.). Słowińska vd., (2013) gökkuşağı alabalıklarında toplam antioksidan kapasitesini $0,009 \pm 0,012$ mM olarak tespit etmişlerdir. Bu kapasite, üreme sisteminde salgılanan sitrik asit, askorbik asit, ürik asit, A veya E vitamininden kaynaklanabilmektedir (Lahnsteiner vd., 2004).

Tez çalışmasında, oksidatif stresin bir göstergesi olan LPO, seminal plazmada üreme sezonu sonuna doğru artarken, TAK miktarı azalmaktadır. CD dişi birey seminal plazmalarında LPO değerlerinin, N bireylerinkine göre daha az olması, testislerde çok miktarda bulunan antioksidan maddeden kaynaklanabilmektedir. Azalan TAK miktarına karşı, KAT değerlerinde sezon sonuna doğru azalma gözlenmektedir. Enzimatik aktivitelerin üreme sezonuna bağlı olarak değişebileceği bilinmektedir. Antitripsin aktivitesi, hem CD dişi hemde N erkek birey seminal plazmalarında sezon sonuna doğru azalırken, laktat dehidrogenaz aktivitesi sezon sonunda artış göstermiştir (Nynca vd., 2012a). Ayrıca, *Acipenser ruthenus* türünde, testis ve wolffian kanallarında LPO, KAT ve süperoksit dismutaz (SOD) değerleri arasında farklar olduğu, üreme sistemi boyunca antioksidan sistem yapısında değişiklikler olduğu gösterilmiştir.

CD dişi bireylerden alınan örneklerde, N erkek bireylere göre daha çok DNA hasarlı sperm hücresi bulunmaktadır. CD dişi bireylerden sezon ortası semen örneklerine ait sperm hücrelerinin $12,7 \pm 2,1$ 'inde DNA hasarı saptanmışken, N erkek bireylere ait sperm hücrelerinin $2,7 \pm 1,9$ 'unda DNA hasarı saptanmıştır (Şekil 3.19.). Ayrıca, N erkek bireylerin sperm hücreleri 1. derecede hasarlı iken, CD dişi bireylere ait örneklerde DNA hasar derecesi daha yüksek olan (2. ve 3. derece hasarlı) sperm hücreleri barındırdığı belirlenmiştir. N erkek bireylerde üreme sezonu ortasında 1. dereceden DNA hasarlı sperm hücresi $2,7 \pm 1,9$ olarak belirlenmiştir. Doğu (2011), N erkek bireylerde DNA hasarlı hücre oranını $3,6 \pm 1,5$ olarak belirlemiştir. Tez çalışmasındaki bulgulara benzer bir şekilde, Pérez-Cerezales vd. (2009), CD dişi bireylerde bu oranı $6,1 \pm 0,3$ olarak daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Yavru gelişimine negatif etkileri olan erkek üreme hücrelerindeki DNA hasarı birçok farklı sebepten kaynaklanabilmektedir (Box vd., 2001; Kopeika vd., 2004). Örneğin, UV ışınlar ile oluşan timin dimerleri, sperm hücrelerinin kendince veya üreme sistemindeki diğer hücrelerce oluşturulan ve azot bazlarının oksidasyonuna sebep olan oksidatif stres, sperm hücrelerinin DNA'sında hasar oluşturabilmektedir (Ciereszko vd., 2005; Aitken ve Baker, 2006). Oksidatif stres, azot bazlarının oksidasyonu dışında DNA sarmalında kırılmalara da sebep olabilmektedir (Slupphaug vd., 2003). Oksidatif stres ile başa çıkarak hücre DNA'sını koruma mekanizması, seminal plazma antioksidanları ve spermatogenez sırasındaki kromatin kondenzasyonu olmak üzere temelde iki mekanizma ile gerçekleşmektedir. Kromatin kondenzasyonu canlı türüne ve hücrenin olgunlaşma derecesine göre değişmektedir (Balhorn, 1982). CD dişi bireylerde, semen direkt olarak testisten alındığı için, spermatogenezin farklı basamaklarında olan ve dolayısıyla farklı derecelerde kromatin kondenzasyonuna sahip sperm hücrelerini içermektedir. Bu iki faktör testiküler sperm hücrelerinin düşük motilite, daha yüksek DNA hasarlı hücreye ve uzun süreli muhafazada DNA hasarına daha hassas olmasına neden olmaktadır (Ogier vd., 1999; Geffen ve Evans, 2000; Pérez-Cerezales vd., 2009).

Sperm kalitesindeki değişimler, birçok teleost balıkta saptanmıştır. Motilite karakteristiklerinde bu sezonsal değişim, sezon başından ortasına veya sonuna doğru yükselme ve sezon sonunda azalma olmak üzere 2 şekilde görülebilir. Örneğin, bir yassı balık türü olan *Hippoglossus hippoglossus* (Atlantik Halibut) türünde motilite özellikleri sezon başından sonuna doğru azalmaktadır (Babiak vd., 2006). Buna

karşın *Barbus barbus*, *Gadus morhua* gibi türlerde sperm motilite özellikleri sezon ortasında artmaktadır (Alavi vd., 2008; Rouxel vd., 2008). Tez çalışmasında, motilite özelliklerinde sezon ortasındaki artış *O. mykiss* türü için de saptanmıştır.

Sperm hücrelerinin, suya salındıkları anda tetiklenen motiliteleri ile hücrelerinin aktivitelerinin göreceli olarak durduğu, enerjik hareketin bittiği ana kadar geçen süre motilite süresi olarak tanımlanmaktadır (Billard, 1986; Cosson, 2004). Sperm hücrelerinin, motilitenin ilk başladığı andan itibaren yüzde motilite değerleri, flagellar atım hızları ve hücre içi ATP değerleri azalmakta ve zamana bağlı olarak enerjik hareket durağanlaşmaktadır (Scott ve Baynes, 1980; Cosson, 2004). Bu durumda, sperm motilitesi, toplam motilite süresi ve doğrusal motilite süresi olarak iki ana parametre ile değerlendirilebilmektedir (Alavi ve Cosson, 2005). Doğrusal motilite ile toplam motilite süresi arasında sperm hücreleri dairesel hareket etmektedirler. Lahnsteiner vd. (1996), doğrusal hareket yapan sperm hücrelerinin dölleme yeteneğinin daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Dairesel hareket eden sperm hücreleri de yumurtayı dölleyebilmekte, ancak dölleme oranı düşük olmaktadır. Ayrıca, doğrusal motilite süresinin tespit edilmesi, daha pratik, daha uygulanabilir ve dölleme kapasitesi ile daha çok ilgili olmaktadır (Billard ve Cosson, 1992). Motilite süresi, doğal ortamda 30 sn den dakikalara kadar sürebilen bir süreçte olup canlı türüne bağlı olarak değişmektedir. Salmonidae türlerinde 30-45 sn olabilen doğrusal motilite süresi, Cyprinid türlerinde 1 dakikanın üzerine, Acipencerid türlerinde 10 dakikanın üzerine çıkabilmektedir (Tanasiichuk ve Vonokov, 1956; Alavi vd., 2004; Alavi ve Cosson, 2005). Tez çalışmasında, N erkek bireylerden alınan sperm örneklerinin yüzde motilite ve özellikle doğrusal motilite süreleri genelde üreme sezonu ortasında artmaktadır. N erkek bireylerde en yüksek doğrusal motilite süreleri, incelenen iki üreme sezonunda da sezon ortalarında $32,3 \pm 0,6$ sn ve $30,3 \pm 1,2$ sn olarak kaydedilmiştir. CD dişi bireylerde ise daha sezon başında alınan örneklerde, göreceli olarak motilite yüzdesi yüksek daha fazla birey saptanmaktadır. 2-3 yaşındaki CD dişi bireylerde motilite oranları, 3-4 yaşındaki bireylere oranla daha yüksektir. 3-4 yaşındaki CD dişi bireylerden alınan sperm örneklerinin kaliteleri, 2-3 yaşındakilere oranla daha düşüktür (Şekil 3.15., 3.16., 3.17. ve 3.18.). Örneklenen 3-4 yaşındaki CD dişi bireylerin %88'inde doğrusal motilite saptanmazken, 2-3 yaşındaki bireylerin %60'ında doğrusal motilite saptanmamıştır. Önceki çalışmalarda, testiküler sperm hücrelerinin motilitesi üzerine farklı değerlendirmeler

bulunmaktadır. *Acipenser ruthenus* türünde, testiküler sperm, aktivasyon çözeltisi ile aktive edilememekte, mutlaka *in vivo* olarak sperm kanallarından geçmesi veya *in vitro* olarak bir olgunlaştırmaya tabi tutulması gerekmektedir (Dzyuba vd., 2014). Buna karşın, *Silurus glanis* türünde testiküler sperm, türün yetiştiriciliğinde kullanılabilecek durumda olabilmektedir (Linhart vd., 2005). N erkek gökkuşağı alabalığı testiküler sperminin kısıtlı motilite özelliklerine sahip olduğu bildirilmiştir (Koldras vd., 1996). CD dişi bireylerin testiküler sperm motilite değerleri için farklı değerlendirmeler bulunmaktadır. Nynca vd. (2012a), aynı üreme sezonunun aynı döneminde gerçekleştirdikleri örneklemede, CD dişi birey testiküler sperm motilitesi %25'ten az olanlar, %25-50 olanlar ve %50'den büyük olanlar olarak ayırmışlardır. Ancak, ayırdıkları tüm gruplarda, N erkek bireylere göre sperm hücrelerindeki doğrusal motilitenin (%20-30 civarında) çok daha düşük olduğunu bulmuşlardır. Ciereszko vd. (2015), CD dişi birey testiküler semenindeki yüzde sperm motilitesini %44 olarak tayin etmişlerdir. Bu farklı sonuçların sebebi farklı değerlendirme metotlarının yanı sıra, incelenen testisin farklı olgunlaşma basamaklarındaki sperm hücrelerini barındırması nedeniyle olabilmektedir. Özellikle bazı bireylerde testis kanallarının kısmi olarak veya az miktarda oluştuğu gözlemlenmiştir. Bu durum gonadın şekli ile de ilişkilendirilmektedir. Gonadın şeklinin ultrasonik görüntüleme ile değerlendirmesi, balığın olgunlaşma durumu ve gonadın şekli ile ilgili bilgi verebilmektedir (Hliwa vd., 2014). CD dişi balıklarda gonadın şekli, tek veya çift gonad bulunması, kanal yapısında kısmi oluşumlar nedeniyle bireysel farklılık göstermektedir (Kuzminski ve Dobosz, 2010). Üreme sistemindeki anatomik yapı farklılıklarının, spermin kalitesi üzerine etkisi olduğu düşünülmektedir.

Kısa ve Uzun Süreli Muhafaza Çalışmaları

Üreme biyolojisi ve biyoteknoloji çalışmalarının pratik olarak sektörel üretimde kullanılmaması, özellikle maliyet artışına sebep olmaktadır. Munkittrick ve Moccia (1987), gökkuşağı alabalığı üretiminde semen özelliklerinin üreme sezonu boyunca bilinmesinin, yetiştirilen anaç adedini düzenlemeye direk etkisi olduğunu belirtmişlerdir. Birçok üretim tesisinde erkek ve dişi anaç oranı birbirine yakın olabilmektedir. Oysa özellikle erkek anaçlar, semen özellikleri bilindiği takdirde, dişilere göre daha az sayıda tutulabilmektedir. İyi kalitede, yani yüksek motilite karakteristiklerine sahip, $1-2 \times 10^5$ sperm hücresi uygun ortam şartlarında ve

kontrollü bir döllemede 1 yumurtayı döllemeye yeterli olabilmektedir (Billard vd., 1974). Bununla birlikte, tüm üreme sezonu boyunca sağlıklı bir erkek bireyden 100 mL'den fazla semen elde edilebilmekte ve bu semen her bir mL'sinde 5×10^5 sperm hücresi içerebilmektedir (Moccia ve Munkittrick, 1987). Bu durumda sağlıklı erkek bir anaç, tüm bir sezon boyunca en az 1×10^7 yumurtayı döllemede kullanılabilmektedir. Her bir dişi anaçtan 3000 yumurta alınabildiği varsayılırsa, bir erkek anaç ile 3000'den fazla dişi bireyden alınan yumurta döllenebilmektedir (Munkittrick ve Moccia, 1987). Her ne kadar bu rakamlar üretimin yapıldığı yerdeki birçok faktörden (su sıcaklığı, anaç ve besleme özellikleri gibi) etkilense de, bu durum oransal olarak genel itibarıyla benzer olabilmektedir. Sonuçta bu şekilde, normalde barındırılardan çok daha az sayıda erkek anaç üretimde kullanılabilmektedir. Böylelikle, daha az sayıda anaç beslenmesinden dolayı oluşacak daha az yem kullanımı dışında, fotoperiyot ve hormon uygulamaları gibi manüplasyonların yetiştiricilik ortamında daha kolay uygulanabilme imkânı sağlanmaktadır.

Gökkuşığı alabalığı erkekleri, fotoperiyot gibi herhangi bir üretim manipülasyonu olmadan, Ekim ayı başı ile Nisan arası semen üretmektedir (Buyukhatipoglu ve Holtz, 1984; Munkittrick ve Moccia, 1987). Alabalık semeninin kısa ve uzun süreli muhafaza edilebilmesi üretimin, istendiği zaman yapılması imkânını sağlamaktadır.

Kısa süreli muhafaza teknikleri semenin, donma sıcaklığı üzerinde uygun sulandırıcı ortamında sperm karakteristiklerini koruyarak saklamayı amaçlamaktadır. Testiküler semen söz konusu olduğunda, kısa süreli muhafaza pratikte olgunlaştırma safhasını da kapsamaktadır. Olgunlaşma, sperm hücrelerinin motilite ve dölleme yeteneğini kazandığı süreç olarak tanımlanmaktadır (Schulz vd., 2010). Testiküler semen, bazı balık türlerinde olgunlaşmış durumdadır. Diğer bir ifade ile sperm hücrelerinin olgunlaşmaları için sperm kanalından geçmeleri gerekmemektedir. Örneğin, karabalıkta (*Clarias gariepinus*) ve turna balığında (*Esox lucius*) testiküler semen örneklerinin, yüksek motiliteye ve dölleme oranına sahip olduğu gösterilmiştir (Lahnsteiner, 2000; Mansour vd., 2004). Gökkuşığı alabalığında bu durumun tersine, testiküler sperm hücrelerinin motilite değerleri düşüktür (Morisawa ve Morisawa 1986). CD dişi gökkuşığı alabalığı bireylerinde direkt olarak testisten alınan semenin motilite değerlerinin düşük olmasının nedeni, spermatogenezin farklı

basamaklarındaki hücreleri ve dolayısıyla farklı derecelerde kromatin kondenzasyonuna sahip sperm hücrelerini içermesidir. Bu sebeple, testiküler spermin uygun SSP ile olgunlaştırmaya bırakılması gerekliliği oluşmaktadır (Geffen ve Evans, 2000; Pérez-Cereales vd., 2009). Olgunlaştırmada sperm hücreleri için önemli olan pH değeri ve bazı faktörler, cinsiyeti değiştirilen bireylerden veya normal balıkların testislerinden alınan sperm hücrelerinin motilite potansiyeli kazanmasına veya motiliteyi iyileştirmesine yarayan suni çözeltilerin oluşturulmasında kullanılmaktadır. Gökkuşığı alabalığında, pH değeri 10,5 olan suni seminal plazmanın, pH değeri 8,0 olana göre olgunlaştırma üzerine daha etkili olduğu görülmüştür (Kobayashi vd., 2004). Gelişimlerinin erken evrelerinde hormon uygulaması ile üretilen CD dişi balıklarda testis gelişmekte ancak, sperm kanalları az gelişmekte ya da hiç gelişmemektedir. Bu testislerde spermatogenez gerçekleşmekte fakat sperm kanallarının olmaması sebebiyle spermatogenezin son safhası olan spermiyogenez sürecindeki olgunlaşma kısmı tamamlanamamaktadır. CD dişi gökkuşığı alabalığı semeni yüksek sperm yoğunluğu ve düşük motilite değerleri ile tanımlanmıştır (Geffen ve Evans, 2000). Bu semenin motilite değerlerinin arttırılması ve daha yüksek dölleme oranlarının elde edilmesi için olgunlaştırma işlemi gerekmektedir. Günümüze dek birkaç Teleost balığında incelenen sperm olgunlaşması, başarılı akuakültür uygulaması için sınırlayıcı bir etkindir (Morisawa ve Morisawa 1986; Miura vd., 1995; Ohta vd., 1997a; Dzyuba vd., 2014). İnsanlarda ve bazı hayvanlarda sperm olgunlaşma süreci iyi tanımlanmıştır (Marengo, 2008). Olgunlaşma sürecinin iyi bilinmesi kriyoprezervasyon uygulanmış spermin *in vitro* döllemede kullanılması ve sperm enjeksiyonu gibi yardımcı üreme tekniklerinin başarıya ulaşmasını sağlamaktadır. Ayrıca testiküler semenin olgunlaştırılması, başarılı kriyoprezervasyon uygulaması için de son derece önemlidir. Kriyoprezervasyon öncesi testiküler semenin olgunlaştırılması gerekmektedir (Robles vd., 2003; Figueroa vd., 2013).

Tez çalışmasında, CD dişi gökkuşığı alabalığı testiküler sperm örneklerinin sulandırılması, motilite oranlarının ve doğrusal motilite sürelerinin arttırılması açısından pozitif yönde fark yaratmaktadır. Yapılan ön çalışmalarda, 1:2 ve 1:3 sulandırma oranlarının diğer sulandırma oranlarına göre ve pH>9 sulandırıcı ortamının diğer pH değerlerine göre daha avantajlı olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.20. ve 3.21.). Sulandırma sonrasındaki 6. saat sonlarında en yüksek motilite oranları ve

doğrusal motilite süreleri kaydedilmiştir. Çalışmadaki tüm sulandırma deneylerinde doğrusal motilite süresi tespit edilmemiş örnekler kullanıldığı için semen örneklerinin sulandırılmasından sonra, dölleme oranı başarısının iyi bir tahmincisi olan doğrusal motilite süresi saptanmıştır. Sulandırma çalışmalarında, antioksidan ilavesinin özellikle doğrusal motilite süresini arttırıcı etkileri saptanmıştır, ancak antioksidan içermeyen kontrol grupları ile sulandırılan örneklerde motilite oranları ve doğrusal motilite süreleri sulandırmanın yapıldığı testiküler semene kıyasla artmaktadır. Antioksidanların kullanıldığı örnekler, kontrol grubuna göre daha uzun süre hem motilite oranlarını hem de doğrusal motilite sürelerini korumuşlardır. Tüm örnekleme dönemleri göz önüne alındığında, kontrol gruplarının 6. veya 12. saat sonunda doğrusal motilitelerini kaybettiklerini, buna karşın antioksidan ilave edilmiş örneklerde kazanılan doğrusal motilitelerin 2., 3. ve hatta 4. gün sonuna kadar devam edebildiği gözlenmiştir. Kontrol gruplarında, en yüksek doğrusal motilite süreleri 10 sn'den kısa iken, antioksidanlı gruplarda bu değer 20 sn.'yi bulabilmektedir. Motilite yüzdeleri de, antioksidanlı örneklerde kontrol grubuna göre daha uzun süre takip edilmiştir.

Tez çalışmasında, kısa süreli muhafaza işleminin ilk 6 saati, testiküler sperm hücreleri için aynı zamanda bir olgunlaştırma sürecidir. Testiküler sperm örneklerinin, antioksidan ilavesiz kontrol gruplarında sperm motilite karakteristikleri bakımında artışlar gözlenmesi antioksidanların dışında da bu süreci teşvik edici ortam parametrelerinin olduğunu göstermektedir. Ancak buna karşın, antioksidan ilave edilmiş örneklerde, sperm motilite karakteristiklerinin daha yüksek olması sebebiyle antioksidanların olgunlaştırma sürecini arttırdığı belirlenmiştir. Alınan sperm örneklerinde, testislerde olgunlaşmanın belirli bir basamağında ve üstünde olan örneklerin motilite karakteristiklerinde, sulandırıcı çözeltisi içinde belirli bir süre bekletildikten sonra gelişim gözlenmektedir. Bazı hücreler ise, büyük olasılıkla testiste olgunlaşma sürecinin ilk basamaklarında olduğu için sulandırma çözeltisinde (suni seminal plazmada) bekletilmeleri motilite kazanımına sebep olmamaktadır. *In vitro* koşullarda, sulandırma çözeltisinde bu olgunlaşma birkaç nedenle olabilmektedir. Bunlarında başında, testislerde düşük pH değerlerinde (7,0-7,5) olan seminal plazma içerisinde tutulan ve doğal şartlarda üreme sistemi kanallarında yükselen pH şartlarına maruz kalan sperm hücreleri (Morisawa ve Morisawa, 1986) CD dişi balıklarda sperm kanallarının olmaması sebebiyle bu pH değişim ortamından

geçmemektedir. Sperm hücrelerinin olgunlaşmasında son derece önemli rol üstlenen sperm kanallarının farklı bölgelerinde pH değişimi ile paralel, farklı motilite karakteristiklerine sahip sperm hücreleri bulunmaktadır (Morisawa ve Morisawa, 1986; Koldras vd., 1996). Hatta bu durum, CD dişi bireylerden alınan testiküler sperm hücrelerinin, bireysel olarak farklı motilite karakteristiklerine sahip olma nedenlerinden biri de olabilmektedir. Çünkü bu bireylerin gonadlarında, tez çalışmasında da gözlemlenen yapısal farklılıklar bulunmaktadır (Kuzminski ve Dobosz, 2010). Tez çalışmasında, incelenen bireylerde testis ve sperm kanallarının farklı şekillerde ve uzunluklarda gelişebildiği gözlenmiştir. Bu yapısal farklılığın, sperm motilite karakteristiklerindeki farklılıklara yansiyabildiği düşünülmektedir. Tez çalışmasında incelenen bireylere ait örneklerde olduğu gibi, farklı çalışmalarda testiküler sperm hücrelerinin motilite karakteristiklerinde çeşitlilik bulunmaktadır. Bu durum, kullanılan cinsiyet değiştirici hormonlardan ve yetiştirme koşullarından kaynaklı balık gelişimi gibi sebeplerden olabileceği ön görülmektedir. Sperm hücre zarındaki iyon kanallarının aktif hale geçebilmesinde, zarın depolarizasyonunda ve cAMP üretiminin teşvik edilmesinde pH değerinin rolü (Morisawa ve Morisawa, 1988; Miura vd., 1992; Ingermann vd., 2001) göz önüne alındığında, testiküler semenin yüksek pH değerlerinde SSP’de tutulmasının sperm hücrelerinin motilite kazanmasında en önemli değişken olduğu düşünülmektedir.

Aerobik bir hücre olan spermin oksijenli ortamda bulunması da motilite kazanımında önemlidir (Stoss ve Holtz, 1983). Salmonid türlerinde, sperm hücresinin solunum oranı pH değerine bağlıdır. pH 7,5-8,0 arasında, sperm hücrelerinin oksijen tüketimi en az %35 oranında artmaktadır (Ingermann vd., 2003). Bu durum, oksidatif metabolizmadaki değişimin sperm motilitesinin kazanımında önemli olabileceğini göstermektedir (Ingermann, 2003). Testiküler sperm hücrelerinin, *in vitro* ortamda belli oranda seyreltildiği için kullanabileceği daha çok oksijen mevcuttur. Uygun pH değerinde bu oksijenin kullanılması, motilite karakteristiklerinin iyileşmesine ve doğrusal motilite kazanılmasına sebep olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca bu seyrelme sonucunda, testiküler seminal plazmada bulunan ve motiliteyi engelleyen bazı maddelerin de etkisi azalabilmektedir (Nynca vd., 2012b). Tez çalışması bulgularına göre, testiküler sperm hücrelerinin kısıtlı hareketinin bir nedeni de Ca^{2+} iyonlarının derişimi olabileceği öngörülmektedir. Son yıllarda çalışmalarda sıkça değinilen Ca^{2+} iyonlarının, sperm motilitesinin başlaması dışında özellikle spermin

yüzme performansını da etkilediği gösterilmiştir (Dietrich vd., 2011; Butts vd., 2013). Tez çalışmasında, CD dişi bireylerden elde edilen testiküler seminal plazma ile N erkek bireylerden elde edilen seminal plazma örnekleri arasında Ca^{2+} iyon derişimleri açısından istatistiksel farklar gözlenmemiş olması (Şekil 3.7.), *in vitro* şartlarda SSP içerisinde Ca^{2+} iyonlarının testiküler sperm hücrelerinin hareketini kısıtlayıcı etkisi olduğunu göstermektedir. Bu durum Mg^{2+} iyonları derişimiyle de ilişkilendirilebilir, ancak önceki çalışmalarda bu iyon ile ilgili bir bilgi bulunmamaktadır.

Tez çalışmasında kullanılan antioksidanların, testiküler sperm hücrelerinin olgunlaşmasını desteklemesinin ötesinde, kısa süreli muhafazaya olumlu yönde etkidiği gözlenmiştir. Antioksidan ilave edilmiş grupların motilite yüzdeleri ve doğrusal motilite süreleri, kontrol gruplarındakilerinden daha uzun süre muhafaza edilebilmektedir (Şekil 3.22. ve 3.39.). Farklı balık türlerine ait yumurtaların ve sperm hücrelerinin uygun iyonik bileşenli sulandırma çözeltilerinde kısa süreli muhafazası yaygın bir yöntemdir ve son yıllarda ilgili çalışmalar artmaktadır (Lahnsteiner ve Weismann, 1999; Jenkins-Keeran ve Woods, 2002; Rodríguez-Muñoz ve Ojanguren, 2002; Bozkurt ve Secer, 2005; Shaliutina vd., 2013; Kowalski vd., 2014; Öğretmen vd., 2014a; Trigo vd., 2015; Ubilla vd., 2015). Ayrıca bu çözeltilere antioksidan eklenmesinin pozitif etkileri gözlenmiştir (Lahnsteiner ve Mansour, 2010; Ubilla ve Valdebenito, 2011). Ancak, CD dişi birey semeninin kısa süreli muhafazası ile ilgili veri sadece tez çalışmasında bulunmaktadır. N erkek bireylere ait semenin buz üzerinde 2 saat bekletilmesinden sonra, taze semene kıyasla motilite karakteristiklerinde ve dölleme kabiliyetinde düşme olduğu açık bir şekilde gösterilmiştir. Bunun iki temel nedeni, gerekli enerjinin azalması ve hücre zarının ROS ataklarına karşı koyamaması olarak gösterilmektedir (Lahnsteiner vd., 1997). Teleost balıklarda semenin kısa süreli muhafazasında, antioksidan maddelerden ürik asidin 3 gün, metiyoninin 5 gün süre ile sperm motilite karakteristiklerinin ve hücre zarı bütünlüğünün korunmasında ve lipid peroksidasyonunun azaltılmasında etkili olduğu gözlenmektedir (Lahnsteiner ve Mansour, 2010). Tez çalışmasında kullanılan özellikle kuersetinin ve kurkuminin bu şekilde etkili olduğu düşünülmektedir.

CD dişi gökkuşağı alabalığında, semen mevsimsel değişimden etkilenmektedir. Kışın alınan semen ilkbahara göre daha iyi motilite özelliklerine sahiptir. Özellikle kriyoprezervasyon çalışması için örneklemenin, alabalık için doğal üreme sezonu olan kış ortasında yapılması önerilmektedir (Robles vd., 2003; Nynca vd., 2012a). Tez çalışmasında üreme sezonu boyunca sperm motilite karakteristiklerinde gözlenen değişiklikler, sulandırılan örneklerin saklama sürelerini etkilemektedir. Genel olarak antioksidanların 25 ve 50 mg/L derişimleri, 100 mg/L derişimine göre daha etkilidir. Antioksidanlar, motilite karakteristiklerine olan pozitif etkileri bakımından; kuersetin > kurkumin > rosmarinik asit > resveratrol > rutin > salisilik asit olarak sıralanabilmektedir. Ayrıca, 2-3 yaşındaki CD dişi bireylere ait sperm örnekler 3-4 yaşındakilere göre daha uzun süre muhafaza edilebilmektedir.

Kısa süreli muhafaza dölleme çalışmalarında, antioksidan ilavelerinin etkileri daha net bir şekilde gözlenmektedir. Hiçbir sulandırma yapılmamış CD dişi birey testiküler sperm hücreleri ile % 40 civarında dölleme oranları gerçekleşirken, antioksidan ilave edilmiş sulandırıcılar ile muamele edilen sperm örneklerinin tümünde bu oranın daha yüksek olduğu belirlenmiştir (> %50). Kuersetin ve kurkumin gibi daha etkili olan antioksidanların 25 ve 50 mg/L derişimlerinde dölleme oranları %80'in üzerine ulaşmıştır (Çizelge 3.5. ve 3.6.). Özellikle üretimde en önemli oran olan yumurtadan çıkış oranı, CD dişi bireyleri kontrol gruplarında % 30 civarında iken, özellikle daha etkili olan antioksidanların ilavesi ile yumurtadan çıkış oranları %60'ın üzerine çıkmaktadır.

CD dişi bireyleri testiküler sperm örneklerini, belli bir süre inkübe edilerek olgunlaştırmadan kriyoprezervasyon işlemine tabi tutulursa, düşük motilite oranı (~%20) gözlenmekte ve doğrusal motilite süresi tespit edilememektedir. Buna karşın, olgunlaştırılan testiküler sperm hücreleri hem antioksidan eklenmiş gruplarda hem de kontrol grubunda doğrusal motilite gözlenmektedir (Çizelge 3.7.). 50 ve 100 mg/L rosmarinik asit, 25 ve 100 mg/L resveratrol, 25 mg/L kurkumin ve salisilik asit tüm çalışılan derişimlerinin kriyoprezervasyon ortamına ilavesi ile çözüm sonrası motilite oran ortalamaları % 50-60 arasında olmaktadır. Bununla birlikte, kuersetin haricinde, antioksidan uygulamalarında derişimler arasında, motilite oranları ve doğrusal motilite süreleri bakımından istatistiksel fark bulunmamaktadır ($P < 0,05$).

Antioksidanların kriyoprezervasyon ortamında bulunması, DNA hasarı oluşumunu kontrol gruplarına kıyasla azaltmaktadır. Özellikle 2. ve 3. derece DNA hasarları, antioksidan kullanılan örneklerde daha azdır ($P < 0,05$). CD dışı testiküler sperm hücrelerinde çözünme sonrası % 80'den fazla DNA hasarlı hücre tespit edilmekteyken bu oran inkübe edilerek olgunlaştırılan ve kriyoprezervasyon uygulanan kontrol grubunda % 70 civarına, antioksidan eklenen örneklerde ise % 50 civarına düşmektedir (Çizelge 3.8.). Ayrıca, inkübe edilmemiş testiküler sperm hücreleri kriyoprezervasyon uygulaması sonrası çok düşük dölleme yeteneğine sahiptir (~%3) ve döllenen bu yumurtalardan yavru oluşmamaktadır. Antioksidan ilavelerinin motilite karakteristiklerine olan pozitif etkileri, dölleme, gözlenme ve yumurtadan çıkış oranlarına da yansımaktadır (Çizelge 3.9.). Kriyoprezervasyon çalışmalarında kullanılan antioksidanların, motilite karakteristiklerine ve dölleme oranlarına olan pozitif etkileri bakımından; rosmarinik asit > salisilik asit > resveratrol > kurkumin > kuersetin > rutin olarak sıralanabilmektedir.

Kriyoprezervasyon işleminin herhangi bir basamağında, sperm hücrelerinde oluşabilecek zararlar sebebiyle çözünme sonrası düşük sperm motilite karakteristikleri gözlenebilmektedir (Medeiros vd., 2002). Soğuk şok, ani sıcaklık ve pH değişimi, hücre içi buz kristali oluşumu, ozmolarite etkisi ve kriyoprezervasyon ortamındaki maddelerin toksik etkileri gibi sebepler nedeniyle sperm hücreleri zarar görebilmektedir (Chao ve Liao, 2001). Bu zararların önlenmesi için, şekerler (örneğin glukoz) ve proteinler (örneğin albumin) kriyoprezervasyon ortamına eklenmektedir (Chao ve Liao, 2001; Orfão vd., 2011; Lim ve Le, 2013). Ayrıca, BHT (bütilendirilmiş hidroksitoluen), metiyonin ve glutatyon türevleri gibi antioksidan maddeler bu amaçla katkı maddesi olarak kullanılmıştır (Lahnsteiner vd., 2011; Öğretmen ve İnanan, 2014). Antioksidanların, çözünme sonrası sperm motilite karakteristiklerinin korunmasını sağlayan iki temel mekanizma önerilmektedir. Birincil olarak, antioksidanlar sperm zarına nüfuz ederek zarın esnekliğini ve akışkanlığını artırarak spermi soğuk şoktan koruyabilmektedir (Hammerstedt vd., 1976). İkincil olarak, antioksidanlar lipit peroksil radikallerini sperm hücrelerine zarar vermeyen hidroperoksidlere dönüştürerek zarar verici etkilerini azaltabilmektedir (Aitken ve Clarkson, 1988). Kriyoprezervasyonun, memeli sperm hücrelerinde lipit peroksidasyonuna sebep olduğu ve bu durumun sperm motilite karakteristiklerini negatif yönde etkilediği gösterilmiştir (Alvarez ve Storey, 1992;

Chatterjee ve Gagnon, 2001). Benzer bir şekilde, semende lipit peroksidasyonun artışı balık sperm motilite kalitesini azaltmaktadır (Martínez-Páramo vd., 2012; Shaliutina vd., 2013).

Tez çalışmasında kullanılan antioksidanların, kısa ve uzun süreli muhafazada farklı etki göstermesinin temel nedeni, bu iki muhafaza şeklinin farklı şekillerde sperm hücrelerini etkilemesidir. Pérez-Cerezales vd. (2009), kısa süreli muhafazada sperm hücrelerindeki DNA hasarının daha ziyade oksidatif stres kaynaklı iken uzun süreli muhafazada bu hasarın donma basamağından kaynaklı olduğunu öne sürmüşlerdir. Bu durum göz önüne alındığında, tez çalışmasında kısa süreli muhafazada kuersetinin ve kurkuminin oksidatif stresi kullanılan diğer antioksidanlara göre daha çok engellediği düşünülmektedir. Uzun süreli muhafazada ise diğer antioksidanlara göre daha etkin olan rosmarinik ve salisilik asidin sperm hücrelerini soğuk şoktan daha iyi koruyarak sperm motilite karakteristiklerini koruduğu düşünülmektedir.

Genel Değerlendirme ve Öneriler

Tez çalışması sonuçlarına göre:

- ✓ Üreme sezonu sonuna doğru, CD dişi bireylerde sperm hücre yoğunluğu artmakta iken bu değerler N erkek bireylerde sezon boyunca çan eğrisi şeklindedir. N erkek bireylerde sperm motilite değerleri sezon ortasında artar, sonunda ise düşer. CD dişi bireylerde, özellikle yüzde motilite oranı sezon başından sonuna doğru azalma gösterir.
- ✓ Hem CD dişi hem de N erkek bireylerin seminal plazma pH, Ca^{2+} , Mg^{2+} ve LPO değerleri sezon sonuna doğru artmaktadır. Cl^- , protein, KAT ve TAK değerleri sezon sonuna doğru azalmaktadır. Ozmolarite ve K^+ değerleri, üreme sezonu süresince N erkek bireylerde artar iken CD dişi bireylerin seminal plazmalarında azalmaktadır. Na^+ derişimleri, üreme sezonu dönemlerinde N erkek bireyleri için çan eğrisi şeklinde değişim gösterirken, CD dişi bireylerde sezon sonuna doğru azalır.
- ✓ CD dişi bireylerden elde edilen testiküler semen, N erkek semene kıyasla daha yoğun sperm hücrelerine, daha düşük pH değerine, daha yüksek ozmolarite ve protein değerlerine, daha yüksek TAK değerine sahip olması ile nitelendirilebilmektedir.
- ✓ CD dişi testiküler seminal plazması daha yüksek Na^+ , K^+ ve Cl^- derişimlerine sahip iken, Ca^{2+} derişimleri açısından N erkek seminal plazması ile farklılık göstermemektedir ($P < 0,05$).

✓ 2-3 yaşındaki CD dişi bireylerin Mg^{2+} derişimleri, N erkeklerden daha yüksek iken 3-4 yaşındakilerde istatistiksel olarak farklı değildir. Ayrıca, N erkek seminal plazması daha yüksek ortalama LPO ve KAT değerlerine sahiptir.

✓ 2-3 yaşındaki CD dişi bireyler, 3-4 yaşındakilerinkine göre daha kaliteli sperm hücrelerine sahiptir. Bu sebeple, üretimde 2-3 yaşındaki bireylerin kullanımı daha verimli olabileceği düşünülmektedir.

✓ Hem kısa hem de uzun süreli muhafazada antioksidan maddelerin kullanılmasının, sperm motilite karakteristikleri ve dölleme oranları üzerine pozitif etkileri saptamıştır. Kısa süreli muhafazada kuersetin ve kurkumin, uzun süreli muhafazada rosmarinik asit ve salisilik asit motilite karakteristiklerinin korunmasında daha etkili bulunmuştur.

Gelecekteki benzer çalışmalar için öneriler:

✓ Gökkuşuğı alabalığı yetiştiriciliğinde tek cinsiyetli dişi popülasyon elde edilmesi, üretim kaynaklarının ekonomik kullanılarak et veriminin artmasını sağlamaktadır. Yetiştiricilikte, bu tip bir avantajı sağlayan diğer bir biyoteknolojik manipölasyon triploit bireyler elde etmektir. Kültürde veya doğal ortamda, her türlü cinsiyet kombinasyonları arasında en çok gelişme gösteren bireyler dişi triploitlerdir (Deng vd., 2001). Tamamı dişi popülasyon elde edilmesi ve sonrasında döllelenmiş yumurtaya uygulanan sıcaklık veya basınç şoku ile triploit birey elde etmeyi, bütünleşik olarak kapsayan bir üretim sistemi modeli gelecekteki çalışmalarda incelenmelidir.

✓ Ayrıca gelecek çalışmalarda, CD dişi balık testiküler sperm hücrelerinin elektron mikroskobu ile incelenerek morfolojik yapıları incelenmelidir.

✓ Farklı hormonlar ile cinsiyet dönüşümü sağlanmış dişi bireylerin sperm kaliteleri karşılaştırılmalı ve gonad şekilleri ile sperm kaliteleri arasındaki ilişki araştırılmalıdır.

✓ Özellikle kısa süreli muhafaza ve olgunlaştırma çalışmalarda, Ca^{2+} ve Mg^{2+} iyonları daha ayrıntılı incelenmelidir.

CD dişi anaçların üretimde kullanılmasının avantajları ve dezavantajları Çizelge 4.5.'te sunulmuştur. En önemli avantaj, tamamı dişi yavru elde edilmesidir. Buna karşın, cinsiyet dönüşümü için gerekli hormon uygulamasını gerçekleştirebilecek,

anaç balıklardan alınan semeni SSP ile sulandırabilecek ve motilite özelliklerini tespit edebilecek tecrübeli personele ihtiyaç duyulmaktadır.

Çizelge 4.5. CD dişi anaçların üretimde kullanılmasının avantajları ve dezavantajları

Avantajlar	Dezavantajlar
Tamamı dişi yavru elde edilmesi	Anaç balığın kesilmesi ile semenin elde edilebilmesi
Dolaylı hormon uygulaması	Semenin kullanılması için SSP ile sulandırılması
Anaç planlamasının zorunlu hale getirmesi	Tecrübeli personele ihtiyaç duyulması

Bu tez çalışması ile CD dişi alabalıklarda üreme sezonu boyunca sperm kalitesinin belirlenmesi, testiküler sperm hücrelerinin olgunlaştırılması ve sperm kalitesinin artırılması sağlanmıştır. Ülkemizde henüz birkaç işletmede bulunan CD dişi alabalık anaçlarının bu çalışma ile daha verimli kullanılması sağlanmış ve sperm alımı için kesilen CD dişi anaçların sayısı da önemli oranda azaltılmıştır. Kuluçkahanelerde dişi ve erkek damızlıklar arasında, üreme döneminde görülen senkronizasyon bozukluğu nedeni ile üreticilerin ekonomik kayba uğraması önlenmiş olacaktır. Çalışma sayesinde motilite karakteristikleri korunmuş sperm örneklerinin, kısa ve uzun süreli muhafaza edilerek taşınması, başka işletmelerde kullanılması ve manipülasyonu kolaylaştırılmıştır. Ayrıca bu sonuçlara göre, N erkek anaçların işletmelerde çok fazla sayıda stoklanmasına gerek kalmayacak ve böylece büyük ekonomik kazanç sağlanacaktır.

Sonuç olarak, cinsiyet dönüşümü ile ilgili birçok çalışmanın olduğu, ancak cinsiyeti dönüştürülmüş olan bireylerden alınan seminal plazma özelliklerinin, sperm hücrelerinin motilite özellikleri ve bu spermelerin kullanımları konusunda kısıtlı olan bilgi tez çalışması ile geliştirilmiştir. Özellikle, CD dişi bireylerin farklı derişimlerde antioksidan eklenmiş suni seminal plazma ile sulandırılarak, pratikte en önemli olan parametre olan yumurtadan çıkış oranlarını ve dolayısıyla üretimdeki verimi arttıracığı ortaya konmuştur. Çalışma sonuçlarının, bu konu üzerine gelecekte yapılacak çalışmalara temel bir kaynak oluşturacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Aas, G.H., Refstie, T. ve Gjerde, B. (1991) Evaluation of milt quality of Atlantic salmon, *Aquaculture*, 95(1-2): 125-132.
- Aebi, H.E. (1983) Catalase, 273-286, *Methods of enzymatic analysis*, 3. Baskı, Deerfield Beach, Florida: Verlag Chemic, 606s.
- Agarwal, A., Gupta, S. ve Sharma, R.K. (2005) Role of oxidative stress in female reproduction, *Reprod Biol Endocrinol*, 3: 28-49.
- Aitken R.J. ve Baker, M.A. (2004) Oxidative stress and male reproductive biology, *Reprod Fertil Dev*, 16: 581-588.
- Aitken, R.J. ve Baker, M.A. (2006) Oxidative stress, sperm survival and fertility control, *Mol Cell Endocrinol*, 250: 66-69.
- Aitken, R.J., Clarkson, J.S. (1988) Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of spermatozoa preparation techniques, *J Androl*, 9: 367-376.
- Aitken, R.J., Clarkson, J.S. ve Fishel S. (1989) Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function, *Biol Reprod*, 41:183-197.
- Aitken, R.J., Harkiss, D. ve Buckingham, D.W. (1993) Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human sperm, *Mol Reprod Dev*, 35: 302-315.
- Alavi, S.M.H. ve Cosson, J. (2005) Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review, *Cell Biol Int*, 29: 101-110.
- Alavi, S.M.H. ve Cosson, J. (2006) Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: a review, *Cell Biol Int*, 30: 1-14.
- Alavi, S.M.H., Cosson, J., Karami, M., Abdoulhay, H. ve Mojazi Amiri, B. (2004a) Chemical composition and osmolality of seminal fluid of *Acipenser persicus*;

their physiological relationship with sperm motility, *Aqua Res*, 35: 1238-1243.

Alavi, S.M.H., Cosson, J., Karami, M., Mojazi Amiri, B., Akhoundzadeh, M.A. (2004b) Spermatozoa motility in the Persian sturgeon, *Acipenser persicus*: Effects of pH, dilution rate, ions and osmolality, *Reproduction*, 128: 819-828.

Alavi, S.M.H., Gela, D., Rodina, M. ve Linhart, O. (2011) Roles of osmolality, calcium-potassium antagonist and calcium in activation and flagellar beating pattern of sturgeon sperm, *Comp Biochem Physiol A*, 160: 166-174.

Alavi, S.M.H., Linhart, O., Coward, K. ve Rodina, M. (2007) Fish spermatology: implications for aquaculture management, 397-460, Alavi, S.M.H, Casson, J.J., Coward, C., Rafiee, G. (editörler) *Fish spermatology*, Alpha Science International Ltd., Oxford, UK, 300s.

Alavi, S.M.H., Psenicka, M., Rodina, M., Policar, T. ve Linhart O. (2008) Changes of sperm morphology, volume, density and motility and seminal plasma composition in *Barbus barbus* (Teleostei: Cyprinidae) during the reproductive season, *Aquat Living Resour*, 21: 75–80.

Alavi, S.M.H., Rodina, M., Hatef, A., Stejskal, V., Policar, T., Hamackova, J. ve Linhart, O. (2010) Sperm motility and monthly variations of semen characteristics in *Perca fluviatilis* (Teleostei: Percidae), *Czech J Anim Sci*, 55: 174–182.

Alvarez, J.G. ve Storey, B.T. (1989) Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation, *Gamete Res*, 23: 77-90.

Alvarez, J.G., Storey, B.T. (1992) Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sub-lethal cryodamage to human sperm during cryopreservation, *J Androl*, 13: 232–241.

Alvarez, J.G., Touchstone, J.C., Blasco, L. ve Storey, B.T. (1987) Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa: superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity, *J Androl*, 8: 338-348.

Anonim, *The state of world fisheries and aquaculture*, Food And Agriculture Organization Of The United Nations (FAO), Roma, İtalya, 2014, 223s.

- Anonim, *Su ürünleri istatistikleri*, Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK), Ankara, Türkiye, 2013, 61s.
- Aramli, M.S., Kalbassi, M.R. ve Nazari, R.M. (2014) Monthly fluctuations during the breeding season of sperm density, volume, motility, and composition of seminal and coelomic fluid in broodfish of Persian sturgeon, *Acipenser persicus* Borodin, 1897, *J Appl Ichthyol*, 30: 261–266.
- Argov, N., Sklan, D., Zeron, Y. ve Roth, Z. (2007) Association between seasonal changes in fatty-acid composition, expression of VLDL receptor and bovine sperm quality, *Theriogenology*, 67: 878–885.
- Arslan, T., Güven, E. ve Baltacı, M.A. (2010) Hormonal cinsiyet dönüşüm metodu kullanarak monoseks gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) üretimi, *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16(B): 361-368.
- Asadpour, R., Tayefi-Nasrabadi, H. ve Sheikhzadeh, N. (2013) Sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) seminal plasma proteins and their correlation with semen characteristics, *Acta Sci Vet*, 41: 1108-1114.
- Atar, H.H., Bekcan, S. ve Doğankaya, L. (2009) Effects of different hormones on sex reversal of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) and production of all-female populations, *Biotechnol Biotech Eq*, 23(4): 1509-1514.
- Aydin S., Yılmaz Y., Odabas O., Sekeroglu R., Tarakcioglu M. Ve Atilla M.K. (1997) A further study of seminal plasma: lactate dehydrogenase and lactate dehydrogenase-X activities and diluted semen absorbance, *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 35(4), 261-264.
- Babiak, I., Ottesen, O., Rudolfsen, G., Johnsen, S. (2006) Quantitative characteristics of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., semen throughout the reproductive season, *Theriogenology*, 65: 1587–604.
- Balhorn, R. (1982) A model for the structure of chromatin in mammalian sperm, *J Cell Biol*, 93: 298-305.
- Bansal, A.K. ve Bilaspuri, G.S. (2007) Effect of ferrous ascorbate on in vitro capacitation and acrosome reaction in cattle bull spermatozoa, *Anim Sci Rep*, 1: 69-77.

- Batellier, F., Vidament M., Duchamp G., Arnaud G., Yvon, Jm., Fauquant J. Ve Magistrini M. (2001) Advances in cooled sperm Technologies, *Anim Reprod Sci*, 68(3-4): 181-190.
- Baynes, S.M., Scott, A.P. ve Dawson, A.P. (1981) Rainbow trout, *Salmo gairdneri*, spermatozoa: effects of cations and pH on motility, *J Fish Biol*, 19: 259-267.
- Beardmore, J.A., Mair, G.C. and Lewis, R.I. (2001) Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: Applications, problems, and prospects, *Aquaculture*, 197: 283–301.
- Beer-Ljubic, B., Aladrovic, J., Marenjak, T.S., Laskaj, R., Majic-Balic, I. ve Milinkovic-Tur, S. (2009) Cholesterol concentration in seminal plasma as a predictive tool for quality semen evaluation, *Theriogenology*, 72: 1132–1140.
- Benau, D. ve Turner, C. (1980) Initiation, prolongation and reactivation of the motility of salmonid spermatozoa, *Gamete Res*, 3: 247-257.
- Billard, R. (1981) Short-term preservation of sperm under oxygen atmosphere in rainbow trout (*Salmo gairdneri*), *Aquaculture*, 23: 287-293.
- Billard, R. (1983) Ultrastructure of trout spermatozoa: changes after dilution and deep-freezing, *Cell Tissue Res*, 228: 205–218.
- Billard, R. (1983a) Effects of celomic and seminal fluids and various saline diluents on the fertilizing ability of spermatozoa in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, *J Reprod Fertil*, 68: 77-84.
- Billard, R. (1986) Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species, *Reprod Nutr Dev*, 26(4): 877-920.
- Billard, R. ve Cosson M.P. (1992) Some problems related to the assesment of sperm motility in freshwater fishes, *J Exp Zool*, 261: 122-131.
- Billard, R. ve Cosson, M.P. (1988) Sperm motility in Rainbow trout, *Parasalmo gairdneri*; effects of pH and temperature, 161-167, Breton, B., Zohar, Y., (editörler), *Reproduction in fish basic and applied aspects in endocrinology and genetics*, INRA, Paris, 236s.

- Billard, R. ve Takashima, F. (1983) Resorption of spermatozoa in the sperm duct during post-spawning season, *Bull Jap Soc Sci Fish*, 43: 387-392.
- Billard, R., (1992) Reproduction in rainbow trout: sex differentiation, dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes, *Aquaculture*, 100: 263-298.
- Billard, R., Bieniarz, K., Popek, W., Epler, P. ve Saad, A. (1989) Observation on a possible pheromonal stimulation of milt production in carp, *Cyprinus carpio*, *Aquaculture*, 77: 387-392.
- Billard, R., Cosson, J., Crim, L.W. ve Suquet, M. (1995) Sperm physiology and quality, 25-52, Bromage, N.R., Roberts, R.J. (editörler), *Brood Stock Management and Egg and Larval Quality*, Blackwell Science, Oxford, 436s.
- Billard, R., Cosson, J., Perchee, G. ve Linhart, O. (1995b) Biology of sperm and artificial reproduction in carp, *Aquaculture*, 129: 95-112.
- Billard, R., Gatty, J., Hollebeg, M., Marcel, J. ve Saad, A. (1986) Biology of gametes, eggs and embryos, 151-164, Billard, R., Marcel, J. (editörler), *Aquaculture of Cyprinids*, INRA, Paris, 502s.
- Blackmore, P.F. ve Lattanzio, F.A. (1991) Cell surface of a novel nongenomic progesterone receptor on the head of human sperm, *Biochem Biophys Res Commun*, 181: 331-336.
- Blackmore, P.F., Beebe, S.J., Danforth, D.R. ve Alexander, N. (1990) Progesterone and 17-beta-hydroxyprogesterone: novel stimulators of calcium influx in human sperm, *J Biol Chem*, 266: 18655-18659.
- Blaxter, J.H.S. (1953) Sperm storage and cross fertilization of spring and autumn spawning herring, *Nature*, 172: 1189-1190.
- Boissonneault, G. (2002) Chromatin remodeling during spermiogenesis: a possible role for the transition proteins in DNA strand break repair, *FEBS Lett*, 514: 111-114.
- Boitano, S. ve Omoto C.K. (1991) Membrane hyperpolarisation activates trout sperm without an increase in intracellular pH, *J Cell Sci*, 98: 343-349.

- Boitano, S. ve Omoto, C.K. (1992) Trout sperm swimming patterns and role of intracellular Ca^{2+} , *Cell Motil Cytoskeleton*, 21: 74-82.
- Bondarenko, O., Dzyuba, B., Cosson, J., Rodina, M. ve Linhart, O. (2014) Calcium ion supplementation increases brook trout *Salvelinus fontinalis* spermatozoa activation at the end of the spawning season, *J Fish Biol*, 85(3): 933-937.
- Borges, A., Siqueira, S.R., Jurinitz, D.F., Zanini, R., Amaral, F., Grillo, M.L., Oberst, E.R. ve Wassermann, G.F. (2005) Biochemical composition of seminal plasma and annual variations in semen characteristics of jundia *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pimelodidae), *Fish Physiol Biochem*, 31, 45-53.
- Box, H.C., Dawidzik J.B. ve Budzinski, E.E. (2001) Free radical-induced double lesions in DNA, *Free Radic Biol Med*, 31: 856-868.
- Bozkurt, Y. ve Secer, S. (2005) Effect of short-term preservation of mirror carp (*Cyprinus carpio*) semen on motility, fertilization, and hatching rates, *Isr J Aqualt/Bamidgeh*, 57(3): 207-212.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*, 72: 248-254.
- Brooks, D.E. (1990) Biochemistry of the male accessory glands, 569-690, Lamming, G.E. (editör), *Marshall's Physiology of Reproduction*, 4. Baskı, Churchill Livingstone, London, 988s.
- Buege, J.A. ve Aust, S.T. (1978) Microsomal lipid peroxidation, *Methods Enzymol*, 52: 302-310.
- Butts, I.A.E., Alavi, S.M.H., Mokdad, A. ve Pitcher, T.E. (2013) Physiological functions of osmolality and calcium ions on the initiation of sperm motility and swimming performance in redeye dace, *Clinostomus elongatus*, *Comp Biochem Physiol A*, 166: 147-157.
- Butts, I.A.E., Litvak, M.K. ve Trippel E.A. (2010) Seasonal variations in seminal plasma and sperm characteristics of wild-caught and cultivated Atlantic cod, *Gadus morhua*, *Theriogenology*, 73: 873-885.

- Buyukhatipoglu, S. ve Holtz, W. (1984) Sperm output in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) Effect of age, timing, and frequency of stripping and presence of females, *Aquaculture*, 37, 63-71.
- Cabrita, E., Ma, S., Diogo, P., Martínez-Páramo, S., Sarasquete, C. ve Dinis, M.T. (2011) The influence of certain aminoacids and vitamins on post-thawfish sperm motility, viability and DNA fragmentation, *Anim Reprod Sci*, 125: 189-195.
- Cabrita, E., Robles, V., Rebordinos, L., Sarasquete, C. Ve Herráez, M.P. (2005) Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm, *Cryobiology*, 50: 144-153.
- Cabrita, E., Roblesand, V. ve Herráez, P. (2009) Sperm Quality Assessment, 93-148, Cabrita, E., Robles, V., Herráez, P. (editörler), *Methods in Reproductive Aquaculture Marine and Freshwater Species*, Taylor & Francis Group, CRC Press, Boca Raton, United States of America, 549s.
- Campbell, P.M., Potfinger, T.G. ve Sumpter, J.P. (1992) Stress reduces the quality of gametes produced by rainbow trout, *Biol Reprod*, 47: 1140-1150.
- Castilho, E.F.D., Guimarães, J.D., Martins, L.F., Pinhoi., R.O., Guimarães, S.E.F. ve Espeschit, C.J.B. (2009) Use of propolis and ascorbic acid on goat semen cryopreservation, *R Bras Zootec*, 38: 2335–2345.
- Cecchini, S. ve Caputo, A.R. (2010) Seminal plasma of brown trout, *Salmo trutta fario* (L.) contains a factor able to retain iron at acid pH, typical feature of lactoferrin, *Fish Shellfish Immun*, 28: 927-930.
- Chao, N. ve Liao, I.C. (2001) Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos, *Aquaculture*, 197: 161–189.
- Chao, N.H., Chao, W.C., Liu, K.C. ve Liao, I.C. (1987) The properties of tilapiasperm and its cryopreservation, *J Fish Biol*, 30: 107-118.
- Chatterjee, S. ve Gagnon, C. (2001) Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing, *Mol Reprod Dev*, 59: 451-458.

- Christen, R., Gatti, J.L. ve Billard, R. (1987) Trout sperm motility: the transient movement of trout sperm is related to changes in the concentration of the ATP following the activation of the flagellar movement, *Eur J Biochem*, 166: 667-671.
- Chung, E., Yang, Y., Kang, H., Choi, K., Jun, J. ve Lee, K. (2010) Ultrastructure of germ cells and the functions of leydig cells and sertoli cells associated with spermatogenesis in *Pampus argenteus* (Teleostei: Perciformes: Stromateidae), *Zool Stud*, 49(1): 39-50.
- Ciereszko, A., Liu, L. and Dabrowski, K. (1996) Effects of season and dietary ascorbic acid on some biochemical characteristics of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen, *Fish Physiol Biochem*, 15: 1-10.
- Ciereszko, A. (2008) Chemical composition of seminal plasma and its physiological relationship with sperm motility, fertilizing capacity and cryopreservation success in fish, 215-240, Aavi, S.M.H, Cosson, J., Coward, K., Rafiee, R. (editörler), *Fish Spermatology*, Alpha Science International Ltd, Oxford, UK, 300s.
- Ciereszko, A. ve Dabrowski, K. (1995) Sperm quality and ascorbic acid concentration in rainbow trout semen are affected by dietary vitamin C: an across-season study, *Biol Reprod*, 52: 982-988.
- Ciereszko, A., Dietrich, G.J., Nynca, J., Dobosz, S. ve Zalewski, T. (2014) Cryopreservation of rainbow trout semen using a glucose-methanol extender, *Aquaculture*, 420-421: 275-281.
- Ciereszko, A., Dabrowski, K., Lin, F. ve Liu, L. (1999) Protective role of ascorbic acid against damage to male germ cells in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Can J Fish Aquat Sci*, 56: 178-183.
- Ciereszko, A., Dietrich, G.J., Nynca, J., Dobosz, S. ve Krom, J. (2015) Maturation of spermatozoa from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sex-reversed females using artificial seminal plasma or glucose-methanol extender, *Theriogenology*, 83(7): 1213-1218.
- Ciereszko, A., Glogowski, J. ve Dabrowski K. (2000) Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of fresh water fishes, 20-48, Tiersch, T.R., Mazik, P.M. (editörler), *Cryopreservation in aquatic species*, Louisiana: World Aquaculture Society, Baton Rouge, 439s.

- Ciereszko, A., Glogowski, J., Strzezek, J. ve Demianowicz, W. (1992) Low stability of aspartate-aminotransferase activity in boar semen, *Theriogenology*, 37(6): 1269-1280.
- Ciereszko, A., Liu L. ve Dabrowski, K. (1996) Effects of season and dietary ascorbic acid on some biochemical characteristics of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen, *Fish Physiol Biochem*, 15: 1-10.
- Ciereszko, A., Piros, B., Dabrowski, K., Kucharczyk, D., Łuczynski, M.J. ve Dobosz S. (1998) Serine proteinase inhibitors of seminal plasma of teleost fish: distribution of activity, electrophoretic profiles and relation to proteinase inhibitors of blood, *J Fish Biol*, 53: 1292-1305.
- Ciereszko, A., Wlasow, T., Dobosz, S., Goryczko, K. ve Glogowski, J. (2004) Blood cells in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* milt: relation to milt collection method and sampling period, *Theriogenology*, 62: 1353-1364.
- Ciereszko, A., Wolfe, T.D. ve Dabrowski, K. (2005) Analysis of DNA damage in sea lamprey (*Petromyzon marinus*) spermatozoa by UV, hydrogen peroxide, and the toxicant bisazir, *Aquat Toxicol*, 73: 128-138.
- Ciereszko, R.E., Dabrowski, K., Ciereszko, A. ve Ottobre, J.S. (1998) Plasma concentrations of steroid hormones in male yellow perch, *Perca flavescens*: The effect of age and photothermal manipulation, *Env Biol Fish*, 51: 97-105.
- Clausen J. (1969) Lactate dehydrogenase isoenzymes of sperm cells and testes, *Biochem J*, 111(2): 207-18.
- Cloud, J. ve Patton, S. (2009) Basic principles of fish spermatozoa cryopreservation, 242-244, Cabrita, E., Robles, V., Herraiez, P. (editörler), *Methods in Reproductive Aquaculture*, CRC Press, Boca Raton, USA, 572s.
- Colthup, N.B. (1950) Spectra-structure correlations in the infra-red region, *J Opt Soc Am*, 40: 397-400.
- Conesa, C.M., Ortega, V.V.M., Gascoä, J.Y.N., Banos, M.A., Jordana, M.C., Benavente-Garcia, O. ve Castillo, J.N. (2005) Treatment of metastatic melanoma B16F10 by the flavonoids tangeretin, rutin, and diosmin, *J Agric Food Chem*, 53: 6791-6797.

- 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. (2004) The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa, *Aquacult Int*, 12: 69-85.
- Cosson, J. (2010) Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence, *J Fish Biol*, 76: 240-279.
- Cosson, J. ve Linhart, O. (1996) Paddlefish, *Polyodon spathula*, spermatozoa: effects of potassium and pH on motility, *Folia Zool*, 45: 361-370.
- Cosson, J., Groison, A., Suquet, M., Fauvel, C., Dreanno, C. ve Billard, R. (2008) Marine fish spermatozoa: racing ephemeral swimmers, *Reproduction*, 136: 277-294.
- Cosson, J., Dreanno, C., Billard, R., Suquet, M. ve Cibert, C. (1999) Regulation of axonemal wave parameters of fish spermatozoa by ionic factors, 161-186, Cosson, J., Dreanno, C., Billard, R., Suquet, M., Cibert, C., Gagnon, C. (editörler), *The Male Gamete: from Basic Knowledge to Clinical Applications*, 1. Baskı, Cache River Press, UK, 516s.
- Cosson, M.P., André, F., Billard, R. ve Cosson, J. (1995) cAMP/ATP relationship in the activation of trout sperm motility: their interaction in membrane-deprived models and in live spermatozoa, *Cell Motil Cytoskel*, 31: 159-176.
- Cosson, M.P., Billard, R. ve Letellier, L. (1989) Rise of internal Ca^{2+} accompanies the initiation of trout sperm motility, *Cell Motil Cytoskel*, 14: 42-434.
- Cruea, D.D. (1969) Some chemical and physical characteristics of fish sperm. *Trans Am Fish Soc*, 98: 785-788.
- Çeviker M. ve Tuncer P.B. (2005) The effects on the reproductive functions and physico-chemical structure of seminal plasma in domestic animals, *Lalahan Hay Arast Enst Derg*, 45(2): 63-72.
- Dabrowski, K., Ciereszko, R.E., Ciereszko, A., Toth, G.P., Christ, S.A, ElSaidy, D. ve Ottobre, J.S. (1996) Reproductive physiology of yellow perch (*Perca flavescens*): Environmental and endocrinological cues, *J Appl Ichthyol*, 12: 139-148.

- Delerisa, G. ve Petibois, C. (2003) Applications of FTIR spectrometry to plasma contents analysis and monitoring, *Vibrat Spect*, 32: 129–136.
- Demska-Zakes, K., Hliwa, P., Matyjewicz, P. ve Zakes, Z. (1999) The effect of 17 α -methyltestosterone and 11 β -hydroxyandrostenedione on the development of reproductive system in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum), *Arch Pol Fish*, 7: 227-235.
- Deng, G.Y., Chen, L., Wang, X., Oshiro, T. ve Takashima, F. (2001) Sex reversal and gonadal development of triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Acta Zool Sinica*, 47(1): 71-78.
- Devlin, R.H. ve Nagahama, Y. (2002) Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences, *Aquaculture*, 208(3): 191-364.
- Dietrich, D.J., Kowalski, R., Wojtczak, M., Dobosz, S., Goryczko, K. ve Ciereszko, A. (2005) Motility parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa in relation to sequential collection of milt, time of post-mortem storage and anesthesia, *Fish Physiol Biochem*, 31: 1-9.
- Dietrich, G.J., Wojtczak, M., Slowinska, M., Dobosz, S., Kuzminski, H. ve Ciereszko, A. (2008) Effects of ovarian fluid on motility characteristics of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) spermatozoa, *J Appl Ichthyol*, 24: 503–507.
- Dietrich, M.A., Nynca, J., Westfalewicz, B., Karol, H. Ve Ciereszko, A. (2011) Identification of calcium-binding proteins in fish seminal plasma, *Fish Physiol Biochem*, 37: 447-452.
- Dietrich, M.A., Arnold, G.J., Fröhlich, T., Otte, K.A., Dietrich, G.J. ve Ciereszko, A. (2015) Proteomic analysis of extracellular medium of cryopreserved carp (*Cyprinus carpio* L.) semen, *Comp Biochem Phys D*, 15: 49–57.
- Doğu, Z. (2011) *Farkli oranlarda çörek otu (Nigella Sativa L.) özütü ilave edilmiş pelet yem ile beslenen gökkuşağı alabalıklarında (Oncorhynchus mykiss, W., 1792) üreme mevsimi boyunca bazı spermatolojik parametrelerin, spermatozoadaki DNA hasarının ve seminal plazma kompozisyonundaki değişimlerin belirlenmesi*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, 2011, 111s.

- Dreanno, C., Cosson, J., Suquet, M., Dorange, G., Fauvel, C., Cibert, C. ve Billard, R. (1999) Effects of osmolality, morphology and intracellular nucleotid content during the movement of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa, *J Reprod Fertil*, 116: 113-125.
- Dunham, R.A. (2004) *Aquaculture and Fisheries Biotechnology: Genetic Approaches*, CABI Publishing, Wallingford, UK, 384s.
- Dunham, R.A., (2012) Genetics, 138-163, Lucas, J.S., Southgate, P.C. (editörler), *Aquaculture Farming Aquatic Animals and Plants*, John Wiley & Sons Ltd., Wiley-Blackwell, UK, 648s.
- Dziewulska, K., Rzemieniecki, A. ve Domagała, J. (2008) Basic physico-chemical parameters of milt from sea trout (*Salmo trutta m. trutta*), brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *J Appl Ichthyol*, 24: 497–502.
- Dzyuba, B., Cosson, J., Boryshpolets, S., Bondarenko, O., Dzyuba, V., Prokopchuk, G., Gazo, I., Rodina, M. ve Linhart, O. (2014) In vitro sperm maturation in sterlet, *Acipenser ruthenus*, *Reprod Biol*, 14: 160-163.
- Dzyuba, V., Dzyuba, B., Cosson, J., Boryshpolets, S., Yamaner, G., Kholodniy, V. ve Rodina, M. (2014) The antioxidant system of sterlet seminal fluid in testes and Wolffian ducts, *Fish Physiol Biochem*, 40(6): 1731-1739.
- England, G.C.W. ve Allen, W.E. (1991) The lack of effect of parvovirus vaccination on the seminal characteristics of dogs, *Vet Res*, 128: 611-612.
- Eschmeyer, W.N. (1998) *Catalog of fishes*, Special Publication, California Academy of Sciences, San Francisco, 2905s.
- Evenson, D.P. ve Wixon, R. (2006) Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility, *Theriogenology*, 65: 979–991.
- Feist, G., Choo-Guan, Y., Fitzpatrick, M.S. ve Schreck, C.B. (1995) The production of functional sex-reversed male rainbow trout with 17 α -methyltestosterone and 11 β -hydroxyandrostenedione, *Aquaculture*, 131: 145-152.
- Figueroa, E., Risopatrón, J., Sánchez, R., Isachenko, E., Merino, O., Isachenko, V. ve Valdebenito, I. (2013) Spermatozoa vitrification of sex-reversed rainbow

trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effect of seminal plasma on physiological parameters, *Aquaculture*, 372–375: 119–126.

Foote, R.H., Brockett, C.C. ve Kaproth, M.T. (2002) Motility and fertility of bullsperm in whole milk extender containing antioxidants, *Anim Reprod Sci*, 71, 13-23.

Frisch, A. (2004) Sex-change and gonadal steroids in sequentially-hermaphroditic teleost fish, *Rev Fish Biol Fisher*, 14: 481-499.

Froese, R. ve Pauly, D. (2000) *FishBase 2000: concepts, design and data sources*, ICLARM, Los Baños, 344s.

Gatti, J.L., Billard, R. ve Christen, R. (1990) Ionic regulation of the plasma membrane potential of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, sperm: role in the initiation of the motility, *J Cell Physio*, 143: 546-564.

Gazo, I., Linhartova, P., Shaliutina, A. ve Hulak, M. (2013) Influence of environmentally relevant concentrations of vinclozolin on quality, DNA integrity, and antioxidant responses of sterlet *Acipenser ruthenus* spermatozoa, *Chem Biol Interact*, 203: 377–385.

Geffen, A.J. ve Evans, J.P. (2000) Sperm traits and fertilization success of male and sex-reversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquaculture*, 182: 61-72.

Gerailoo, S. ve Ghasemnezhad, M. (2011). Effect of salicylic acid on antioxidant enzyme activity and petal senescence in 'yellow island' cut rose flowers, *J Fruit and Ornam Plant Res*, 19(1): 183-193.

Gjerde B. (1984) Variation in semen production of farmed Atlantic salmon and rainbow trout, *Aquaculture*, 40: 109-114.

Glogowski J. ve Strzeżzek J. (1981) Molecular forms of alkalinephosphatase of ram seminal plasma-some properties and changes in pathological process of reproductive organs, *Anim Reprod Sci*, 3(4): 307-323, (1981).

Glogowski, J., Kwasnik, M., Piros, B., Dabrowski, K., Goryczko, K., Dobosz, S., Kuzminski, H. ve Ciereszko, A. (2000) Characterization of rainbow trout

milt collected with a catheter: semen parameters and cryopreservation success, *Aqua Res*, 31: 289-296.

Golpour, A., Akhoundian, M., Khara, H., Rahbar, M. ve Dadras H. (2013) Changes of sperm quality parameters in Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) during spawning migration, *Czech J Anim Sci*, 58(3): 117–124.

Goth, L. (1991) A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range, *Clin Chim Acta*, 196: 143–152.

Grier, H.J., Linton, J.R., Leatherland, J.F. ve de Flaming, V.L. (1980) Structural evidence for two different testis types in teleost fishes, *Am J Anat*, 159: 331-345.

Gülçin, I. (2010) Antioxidant properties of resveratrol: a structure–activity insight, *Innov Food Sci Emerg Technol*, 11: 210-218.

Güner, Y. ve Kizak, V. (2001) Commercial methods for control of sexual maturation in rainbow trout (*O.mykiss* W., 1792) culture, *XI. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu*, 4-6 Eylül, Hatay-Türkiye.

Gwo, J., Lin, X., Gwo, H., Wu, H. ve Lin P. (1996) The ultrastructure of formosan landlocked salmon, *Oncorhynchus masou formosanus*, spermatozoon (Teleostei, Salmoniformes, Salmonidae), *J submicrosc cytol pathol*, 28(1): 33-40.

Gwo, J.C., Jamieson, B.G.M. ve Leung, L.K.P. (2009) Live Preservation of Fish Gametes, 395-484, Jamieson, B.G.M. (editör), *Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes*, 1. Baskı, CRC Press, Boca Raton, United States of America, 552s.

Gwo, J.C., Kurokura, H. ve Hirano, R. (1993) Cryopreservation of spermatozoa from rainbow trout, common carp and marine puffer, *Nippon Suisan Gakk*, 59: 777-782.

Hajirezaee, S., Amiri, B.M., Mirvaghefi, A.R. (2010) Changes in sperm production, sperm motility, and composition of seminal fluid in caspian brown trout, *Salmo trutta caspius*, over the course of a spawning season, *J Appl Aquaculture*, 22(2): 157-170.

- Hajirezaee, S., Amiri, B.M., Mirvaghefi, A.R. (2009) *Effects of stripping frequency on semen quality of endangered caspian brown trout, Salmo trutta caspius*, *Am J Anim Vet Sci*, 4 (3): 65-71 .
- Halliwell, B. ve Chirico, S. (1993) Lipit peroxidation: its mechanism, measurement and significance, *Am J Clin Nutr*, 57(Suppl.): 715-725.
- Hamad, M.N. (2012) Isolation of rutin from ruta graveolens (*Rutaceae*) cultivated in Iraq by precipitation and fractional solubilization, *Pharmacie Globale IJCP*, 03(04): 1-3.
- Hammerstedt, R.H., Amann, R.P., Rucinsky, T., Ii, P.D.M., Lepock, J., Snipes, W. ve Keith, A.D. (1976) Use of spin labels and electron spin resonancespectroscopy to characterize membranes of bovine sperm: effect ofbutylated hydroxytoluene and cold shock, *Biol Reprod*, 14: 381-397.
- Harvey, B. (1998) *An overview of action before extinction, An International Conference on Conservation of Fish Genetic Diversity*, 16-18 Şubat, Vancouver, British Columbia, Canada.
- Hassin, S., de Monbrison, D., Hanin, Y., Elizur, A., Zohar, Y. ve Popper, D.M. (1997) Domestication of the white grouper, *Epinephelus aeneus*. 1. growth and reproduction, *Aquaculture*, 156: 305-316.
- Hliwa, P., Bah, M., Kuzminski, H., Dobosz, S. ve Ciereszko, A. (2014) Ultrasound evaluation of the gonadal structure in sex-reversed rainbow trout females, *Aquacult Int*, 22: 89-96.
- Holt, W.V. ve Lloyd. R.E. (2010) Sperm storage in the vertebrate female reproductive tract: How does it work so well?, *Theriogenology*, 73: 713-722.
- Holtz, W., Büyükhatipoglu, S., Stoss, J., Oldigs, B. ve Langholz, H.J. (1979) Preservation of trout spermatozoa for varying periods, 141-142, Pillay, T.V.R., Dill, W.A. (editörler), *Advances in Aquaculture*, Fishing New Books Ltd., Farnham, Surrey, England, 653s.
- Honeyfield, D.C. ve Krise, W.F. (2000) Measurement of milt quality and factors affecting viability, 49-58, Tiersch, T.R., Mazik, P.M. (editörler) *Cryopreservation in aquatic species*, World Aquaculture Society, Baton Rouge-Louisiana, 439s.

- Horvath, A., Miskolczi, E. ve Urbanyi, B. (2003). Cryopreservation of common carp sperm, *Aquat Living Resour*, 16: 457–460.
- Hu, J.H., Tian, W.Q., Zhao, X.L., Zan, L.S., Wang, H., Li, Q.W. ve Xin, Y.P. (2010) The cryoprotective effects of ascorbic acid supplementation on bovine semen quality, *Anim Reprod Sci*, 121: 72–77.
- Hwang, P.C. ve Idler, D.R. (1969) A study of major cations, osmotic pressure, and pH in seminal components of Atlantic salmon, *J Fish Res Board Can*, 26: 413-419.
- Ingermann, R.L., Bencic, D.C. ve Cloud, J.G. (2001) Low seminal plasma buffering capacity corresponds to high pH sensitivity of sperm motility in salmonids, *Fish Physiol Biochem*, 24: 299-307.
- Ingermann, R.L. (2007) Energy Metabolism and Respiration in Fish Spermatozoa, 241-266, Alavi, S.M.H., Casson, J.J., Coward, C., Rafiee, G. (editörler), *Fish spermatology*, Alpha Science International Ltd., Oxford, UK, 300s.
- Iuga, C., J. Idaboy, R.A. ve Russo, N. (2012) Antioxidant activity of trans-resveratrol toward hydroxyl and hydroperoxyl radicals: a quantum chemical and computational kinetics study, *J Org Chem*, 77: 3868–3877.
- Jalabert, B., Billard, R., Chevassus, B., Escaffre, A., ve Carpentier, M. (1975) Preliminary experiments on sex control in trout: production of sterile fishes and simultaneous self-fertilizable hermaphrodites, *Ann biol anim biochim biophys*, 15(1): 19-28.
- Jenkins-Keeran, K. ve Woods, C. (2002) An evaluation of extenders for the short-term storage of striped bass milt, *N Am J Aquacult*, 64: 248-256.
- Jensen, J.O.T. ve Alderdice, D.F. (1984) Effect of temperature on short-term storage of eggs and sperm of chum salmon (*Oncorhynchus keta*), *Aquaculture*, 37: 251-265.
- Johnson, K., Butts, I.A.E., Wilson, C.C. ve Pitcher, T.E. (2013) Sperm quality of hatchery-reared lake trout throughout the spawning season, *N Am J Aquacult*, 75(1): 102-108.

- Julien, B. ve Labbé C. (2010) Egg and sperm quality in fish, *Gen Comp Endocr*, 165: 535-548.
- Jullian, C., Moyano, L., Yañez, C. ve Olea-Azar, C. (2007) Complexation of quercetin with three kinds of cyclodextrins: an antioxidant study, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 67(1): 230-234.
- Kessopoulou, E., Tomlinson, M.J., Barratt, C.L., Bolton, A.E. ve Cooke, I.D. (1992) Origin of reactive oxygen species in human semen: spermatozoa or leucocytes?, *J Reprod Fertil*, 94: 63-70.
- Khalili, M., Hasanloo, T., Tabar, S.K.K. ve Sepehrifar, R. (2010) Effect of salicylic acid on antioxidant activity in milk thistle hairy root cultures, *J Med Plants*, 9(35): 51-60.
- Kho, K.H., Tanimoto, S., Inaba, K., Oka, Y. ve Morisawa, M. (2001) Transmembrane cell signalling for the initiation of trout sperm motility: roles of ion channels and membrane hyperpolarization for cyclic AMP synthesis, *Zool Sci*, 18: 919-928.
- Khosravi, F., Valojerdi, M.R., Amanlou, M., Karimian, L. ve Abolhassani, F. (2014) Relationship of seminal reactive nitrogen and oxygen species and total antioxidant capacity with sperm DNA fragmentation in infertile couples with normal and abnormal sperm parameters, *Andrologia*, 46: 17-23.
- Kirk, R.E. (1968) *Experimental design procedures for the behavioral sciences*, Belmont, Brooks-Cole, 577s.
- Kobayashia, T., Fushiki S. ve Ueno, K. (2004) Improvement of sperm motility of sex-reversed male rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by incubation in high-pH artificial seminal plasma, *Environ Biol Fish*, 69: 419-425.
- Koldras, M., Bieniarz, K. ve Kime, E. (1990) Sperm production and steroidogenesis in testes of the common carp, *Cyprinus carpio* L., at different stages of maturation, *J Fish Biol*, 37: 635-645.
- Koldras, M., Loir, M., Maisse, G. ve Le Gac, F. (1996) Study of the composition of seminal fluid and of sperm motility along the genital tract, during a spawning season in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquat Living Resour*, 9: 337-345.

- Kopeika, J., Kopeika, E., Zhang, T., Rawson, D.M. ve Holt, W.V. (2004) Effect of DNA repair inhibitor (3-aminobenzamide) on genetic stability of loach (*Misgurnus fossilis*) embryos derived from cryopreserved sperm, *Theriogenology*, 61: 1661–1673.
- Kowalski, R., Sarosiek, K.B., Demianowicz, W., Judek, J., Goryczko, K., Dobosz, S., Kuźmiński, H., Demska-Zakęś, K., Babiak, I. ve Glogowski, J. (2011) Quantitative characteristics of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, neo-males (XX genotype) and super-males (YY genotype) sperm, *World Acad Sci Eng Technol*, 53: 1162-1169.
- Kowalski, R.K., Cejko, B.I., Irnazarow, I., Szczepkowski, M., Dobosz, S. ve Glogowski, J. (2014) Short-term storage of diluted fish sperm in air versus oxygen, *Turk J Fish Aquat Sci*, 14: 831-834.
- Krasznai, Z., Marian, T., Balkay, L., Gasper, R.J. ve Tron, L. (1995) Potassium channels regulate hypo-osmotic shock-induced motility of Common Carp, *Cyprinus carpio*, sperm, *Aquaculture*, 129: 123-128.
- Krasznai, Z., Marian, T., Izumi, H., Damjanovich, S., Balkay, L., Tron, L. ve Morisawa, M. (2000) Membrane hyperpolarization removes inactivation of Ca^{2+} channels leading to Ca^{2+} influx and initiation of sperm motility in the common carp, *Biophysics*, 97: 2052-2067.
- Krasznai, Z., Morisawa, M., Morisawa, S., Krasznai, Z.T., Tron, L. ve Marian, T. (2003) Role of ion channels and membrane potential in the initiation of carp sperm motility, *Aquat Living Resour*, 16: 445-449.
- Kruger, J.C., Smith, G.L., Vuren J.H.J.V. ve Ferreira, J.T. (1984) Some chemical and physical characteristics of the semen of *Cyprinus carpio* and *Oreochromis mossambicus*, *J Fish Biol*, 24:263–72.
- Kuo, C.M., Ting, Y.Y. ve Yeh, S.L. (1988) Induced sex reversal and spawning of blue-spotted grouper, *Epinephelus fario*, *Aquaculture*, 74: 113-126.
- Kusa, M. (1950) Physiological analysis of fertilization in the egg of the salmon, *Onchorynchus keta*. I. Why are the eggs not fertilized in isotonic Ringer solution, *Annot Zool Jpn*, 24: 22-28.

- Kuzminski, H. ve Dobosz, S. (2010) Effect of sex reversal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) using 17 α -methyltestosterone and 11 β -hydroxyandrostenedione, *Arch Pol Fish*, 18: 45-49.
- Labbe, C., Martoriati, A., Devaux, A. ve Maisse, G. (2001) Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout, *Mol Reprod Dev*, 60: 397-404.
- Lahnsteiner, E., Weismann, T. ve Patzrre R. (1997) Aging processes of rainbow trout semen during storage, *Prog Fish Cult*, 59: 272-279.
- Lahnsteiner, F. (2000) Semen cryopreservation in the Salmonidae and in the Northern pike, *Aqua Res*, 31: 245-258.
- Lahnsteiner, F. ve Weismann, T. (1999) Changes in gggs of brown trout, rainbow trout, and grayling during short-term storage, *N Am J of Aquacult*, 61(3): 213-219.
- Lahnsteiner, F. (2003) Morphology, fine structure, biochemistry, and function of the spermatic ducts in marine fish, *Tissue Cell*, 35: 363-373.
- Lahnsteiner, F. (2003) The spermatozoa and eggs of the cardinal fish, *J Fish Biol*, 62: 115-128.
- Lahnsteiner, F. (2009) The role of free amino acids in semen of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and carp *Cyprinus carpio*, *J Fish Biol*, 75: 816-833.
- Lahnsteiner, F. ve Caberlotto, S. (2012) Motility of gilthead seabream *Sparus aurata* spermatozoa and its relation to temperature, energy metabolism and oxidative stress, *Aquaculture*, 370-371: 76-83.
- Lahnsteiner, F. ve Mansour, N. (2004) Sperm fine structure of the pikeperch, *Sander lucioperca* (Percidae, Teleostei), *J Submicrosc Cytol Pathol*, 36(3-4): 309-312.
- Lahnsteiner, F. ve Patzner, R.A. (2009) Male reproductive system: spermatic duct and accessory organs of the testis, 143-186, Jamieson, B.G.M. (editör), *Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes): Sperm Competition Hormones*, 1. Baskı, CRC Press. Boca Raton, United States of America, 552s.

- Lahnsteiner, F. ve Patzner, R.A. (1991) A new method for electron-microscopical fixation of spermatozoa of freshwater teleosts, *Aquaculture*, 97(2-3), 301-304.
- Lahnsteiner, F. ve Patzner, R.A. (2007) Sperm Morphology and Ultrastructure in Fish, 1-62, Alavi, S.M.H., Casson, J.J., Coward, C., Rafiee, G. (editörler), *Fish spermatology*, Alpha Science International Ltd., Oxford, UK, 300s.
- Lahnsteiner, F., Berger, B. ve Weismann, T. (1999) Sperm metabolism of the teleost fishes *Chalcalburnis chalcoides* and *Oncorhynchus mykiss* and its relation to motility and viability, *J Exp Zool*, 284: 454-465.
- Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T. ve Patzner, R.A. (1996) Physiological and biochemical determination of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, semen quality for cryopreservation, *J Appl Aquacult C*, 6: 47-73.
- Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T. ve Patzner, R.A. (1996) Motility of spermatozoa of *Alburnus alburnus* (Cyprinidae) and its relationship to seminal plasma composition and sperm metabolism, *Fish Physiol Biochem*, 15: 167-179.
- Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T. ve Patzner, R.A. (1998) Determination of semen quality of the rainbow trout by sperm motility, seminal plasma parameters and spermatozoal metabolism, *Aquaculture*, 163: 163-181.
- Lahnsteiner, F., Berger, R., Weismann, T. ve Patzner, R. (1997) Sperm motility and seminal fluid composition in the burbot, *Lota lota*, *J Appl Ichthyol*, 13: 113-119.
- Lahnsteiner, F. ve Mansour, N. (2010) A comparative study on antioxidant systems in semen of species of the Percidae, Salmonidae, Cyprinidae, and Lotidae for improving semen storage techniques, *Aquaculture*, 307: 130-140.
- Lahnsteiner, F., Mansour, N. ve Berger, B. (2004) Seminal plasma proteins prolong the viability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa, *Theriogenology*, 62: 801-808.
- Lahnsteiner, F., Mansour, N. ve Kunz, F. (2011) The effect of antioxidants on the quality of cryopreserved semen in two salmonid fish, the brook trout

(*Salvelinus fontinalis*) and the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Theriogenology*, 76(5-15): 882-890.

Lahnsteiner, F., Mansour, N. ve Plaetzer, K. (2010) Antioxidant systems of brown trout (*Salmo trutta f. fario*) semen, *Anim Reprod Sci*, 119(3): 314-321.

Lahnsteiner, F., Patzner R. A. ve Weismann, T. (1994a). Testicular main ducts and spermatic ducts in some cyprinid fishes I. Morphology, fine structure and histochemistry, *J Fish Biol*, 44(6): 937-951.

Lahnsteiner, F., Patzner R. A. ve Weismann, T. (1994b), The testicular main ducts and the spermatic ducts in some cyprinid fishes—II. Composition of the seminal fluid, *J Fish Biol*, 44(3): 459-467.

Lahnsteiner, F., Patzner, R.A. ve Weismann, T. (1993) Energy resources of spermatozoa of the rainbow trout, *O. Mykiss* Pisces Teleostei, *Reprod Nutr Develop*, 33, 349-360.

Lahnsteiner, F., Patzner, R.A. ve Weismann, T. (1993) The spermatic ducts of salmonid fishes (Salmonidae, Teleostei). Morphology, histochemistry and composition of the secretion, *J Fish Biol*, 42: 79-93.

Li, P., Hulak, M. ve Linhart, O. (2009) Sperm proteins in teleostean and chondrosteian (sturgeon) fishes, *Fish Physiol Biochem*, 35: 567-581.

Li, P., Li, Z.H., Dzyuba, B., Hulak, M., Rodina, M. ve Linhart, O. (2010) Evaluating the impacts of osmotic and oxidative stress on common carp (*Cyprinus carpio*, L.) sperm caused by cryopreservation techniques, *Biol Reprod*, 83: 852-858.

Lim, H.K. ve Le, M.H. (2013) Evaluation of extenders and cryoprotectants on motility and morphology of longtooth grouper (*Epinephelus bruneus*) sperm, *Theriogenology*, 79: 867-871.

Linhart, O., Rodina, M., Flajshans, M., Gela, D. ve Kocour, M. (2005) Cryopreservation of European catfish *Silurus glanis* sperm: Sperm motility, viability, and hatching success of embryos, *Cryobiology*, 51: 250-261.

Linhart, O., Slechta, V. ve Slavik, T. (1991) Fish sperm composition and biochemistry, *Bull Inst Zool Acad Sin Monogr*, 16: 285-311.

- Linhardt, O., Walford, J., Sivaloganathan, B. ve Lam, T.J. (1999) Effects of osmolarity and ions on the motility of stripped and testicular sperm of freshwater- and sea-water-acclimated tilapia, *Oreochromis mossambicus*, *J Fish Biol*, 55: 1344-1358.
- Liu, L., Dabrowski K. ve Ciereszko. A. (1995) Protective effect of seminal plasma proteins on the degradation of ascorbic acid, *Mol Cell Biochem*, 148: 59-66.
- Loir, M., Labbé, C., Maisse, G., Pinson, A., Boulard, G., Mourot, B. ve Chambeyron, F. (1990) Proteins of seminal fluid and spermatozoa in the trout (*Oncorhynchus mykiss*): partial characterization and variations, *Fish Physiol Biochem*, 8: 485-495.
- Lubzens, E., Daube, N., Pekarsky, I., Magnus, Y., Cohen, A., Yusefovich, F. ve Feigin, P. (1997) Carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa cryobanks-strategies in research and application, *Aquaculture*, 155: 13-30.
- Mann, H.B. ve Whitney, D.R. (1947) On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other, *Ann Math Stat*, 18(1): 50-60.
- Mansour, N., Lahnsteiner, F. ve Berger, B. (2004) Characterization of the testicular semen of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822), and its short-term storage, *Aqua Res*, 35: 232-244.
- Marengo, S.R. (2008) Maturing the sperm: unique mechanisms for modifying integral proteins in the sperm plasma membrane, *Anim Reprod Sci*, 105: 52-63.
- Marshall, W.S., Bryson, S.E. ve Idler D.R. (1993) Gonadotropin action on brook trout sperm duct epithelium: ion transport stimulation mediated by cAMP and calcium, *Gen Comp Endocrinol*, 90:232-242.
- Martínez-Páramo, S., Diogo, P., Dinis, M.T., Herráez, M.P., Sarasquete, C. Ve Cabrita, E. (2012) Incorporation of ascorbic acid and α -tocopherol to the extender media to enhance antioxidant system of cryopreserved sea bass sperm, *Theriogenology*, 77: 1129-1136.
- Martínez-Páramo, S., Pastor, M., Martínez-Rodríguez, F., Herraiez, G. ve Cabrita, E. (2009) *Antioxidant status in fresh and cryopreserved sperm from gilthead sea*

breem (Sparus aurata), *Second International Workshop on Biology of Fish Gametes*, 9-11 Eylül, Valencia, Spain, 76-77.

Mattei, X. (1991) Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes, *Can J Zool*, 69(12): 3038-3055,

Mattei, X., Siau Y., Thiaw O.T. ve Thiam D. (1993) Peculiarities in the organization of testis of Ophidian sp. (*Pisces Teleostei*), Evidence for two types of spermatogenesis in teleost fish, *J Fish Biol*, 43(6): 931–937.

Maxwell, W.M.C. ve Johnson, L.A. (1999) Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma, *Theriogenology*, 52: 1352-1362.

McLay, D.W. ve Hugh, J. (2003) Clarke remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals, *Reproduction*, 125: 625–633.

McIven, M.A., Gallant, R.K. ve Richardson, G.F. (1993) Fresh storage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen using a non-aqueous medium, *Aquaculture*, 109: 1971-1982.

Medeiros, C.M.O., Forell, F., Oliveira, A.T.D. ve Rodrigues, J.L. (2002) Currentstatus of sperm cryopreservation: why isn't it better?, *Theriogenology*, 57: 327-344.

Mercado, E., Hernandez, M., Sanz, E., Rodriguez, A., Gomez, E., Vazquez, J.M., Martinez, E.A. ve Roca, J. (2009) Evaluation of L-glutamine for cryo-preservation of boar spermatozoa, *Anim Reprod Sci*, 115: 149–157.

Merino, O., Risopatrón, J., Sánchez, R., Isachenko, E., Figueroa, E., Valdebenito, I. ve Isachenko, V. (2011) Fish (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa cryoprotectant-free vitrification: stability of mitochondrion as criterion of effectiveness, *Anim Reprod Sci*, 124: 125–131

Metwally, M.A.A. ve Fouad, I.M. (2009) Effects of L-ascorbic acid on sperm viability in male grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*), *Global Vet*, 3(2), 132-136.

- Miura, T., Kasugai, T., Nagahama, Y. ve Yamauchi, K. (1995) Acquisition of potential for sperm motility in vitro in Japanese eel *Anguilla japonica*, *Fish Sci*, 61: 533-534.
- Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H. ve Nagahama, Y. (1992) The role of hormones in the acquisition of sperm motility in salmonid fish, *J Exp Zool*, 261, 359-363.
- Moccia, R.D. ve Munkittrick, K.R. (1987) Relationship between the fertilization of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) eggs and the motility of spermatozoa, *Theriogenology*, 27(4): 679-688.
- Modasiya, M. K. ve Patel, V.M. (2012) Studies on solubility of curcumin, *Int J Pharm Life Sci*, 3(3): 1490-1497.
- Morand, C., Crespy, V., Manach, C., Besson, C., Demigné, C. ve Rémésy, C. (1998) Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 275: R212-R219.
- Morisawa, S., Ishida, K., Okuno, M. and Morisawa, M. (1993) Roles of pH and cyclic adenosine monophosphate in the acquisition of potential for sperm motility during migration from the sea to the river in chum salmon, *Mol Reprod Develop*, 34: 420-426.
- Morisawa, M. (1985) Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleosts, *Zool Sci*, 2: 605-615.
- Morisawa, M. (1987) The process of initiation of sperm motility at spawning and ejaculation, 137-157, Mohri, H. (editör) *New Horizons in Sperm Cell Research*, Routledge, London, 516s.
- Morisawa, M., Hirano, T. ve Suzuki, K. (1979) Changes in blood and seminal plasma composition of the mature salmon (*Oncorhynchus keta*) during adaptation to freshwater, *Comp Biochem Physiol*, 64: 325-329.
- Morisawa, M., Suzuki, K. ve Morisawa, S. (1983) Effects of potassium and osmolality on spermatozoon motility of salmonid fishes, *J Exp Biol*, 107: 105-113.

- Morisawa, M., Suzuki, K., Shimizu, H., Morisawa, S. ve Yasuda, K. (1983) Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes, *J Exp Biol*, 107: 95-103.
- Morisawa, M., ve Suzuki, K. (1980) Osmolality and potassium ions: their roles in initiation of sperm motility in teleosts, *Science*, 210: 1145-1147.
- Morisawa, S. and Morisawa, M. (1986) Acquisition of potential for sperm motility in rainbow trout and chum salmon, *J Exp Biol*, 126: 89-96.
- Morisawa, S. ve Morisawa, M. (1988) Induction of potential for sperm motility by bicarbonate and pH in rainbow trout and chum salmon, *J Exp Biol*, 136: 13-22.
- Moyle, P.B. ve Cech, J.J. (2004) *Fishes, an introduction to ichthyology*, Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, USA, 726s.
- Munkittrick, K.R., ve Moccia, R.D. (1987) Seasonal changes in the quality of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) semen: effect of a delay in stripping on spermatocrit, motility, volume and seminal plasma constituents, *Aquaculture*, 64: 147-156.
- Nagahama, Y., Hirose, K., Young, G., Adachi, S., Suzuki, K. ve Tamaok, B. (1983). Relative in vitro effectiveness of 17 α ,20B-dihydroxy-4-pregnen-3-one and other pregnene derivatives on germinal vesicle breakdown in oocytes of ayu (*Plecoglossus altivelis*), amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*), rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and goldfish (*Carassius auratus*), *Gen Compo Endocrinol*, 51: 15-23.
- Ninhaus-Silveira, A., Foresti, F., Tabata, Y.A., Rigolino, M.G. ve Veríssimo-Silveira, R. (2006) Cryopreservation of semen from functional sex-reversed genotypic females of the rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, *Braz Arc Biol Technol*, 49(1): 73-77.
- Nomura, M. (1964) Studies on reproduction of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, with special reference to egg taking- IV. The activation of spermatozoa in different diluents and preservation of semen, *Bull Jpa Soc Sci Fish*, 30, 723-733.
- Nynca, J., Kuzminski, H., Dietricha, G.J., Hliwac, P., Doboszb, S., Liszewska, E., Karola, H. and Ciereszko, A. (2012a) Changes in sperm parameters of sex-

reversed female rainbow trout during spawning season in relation to sperm parameters of normal males, *Theriogenology*, 77(7): 1381-1389.

Nynca, J., Kuzminskib, H., Dietricha, G.J., Hliwac, P., Doboszb, S., Liszewskaa, E., Karola, H. ve Ciereszkoa, A. (2012b) Biochemical and physiological characteristics of semen of sexreversed female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum), *Theriogenology*, 77: 174-183.

O’neill, M.E. ve Mathews, K. (2000) A weighted least squares approach to levene’s test of homogeneity of variance, *Aust NZ J Stat*, 42(1): 81–100.

Ogier, B.B., Labbe, C. ve Maisse, G. (1999) Membrane integrity, mitochondrial activity, ATP content, and motility of the European catfish (*Silurus glanis*) testicular spermatozoa after freezing with different cryoprotectants, *Cryobiology*, 39: 177-184.

Ohta, H., Ikeda, K. ve Izawa, T. (1997a) Increases in concentrations of potassium and bicarbonate ions promote acquisition of motility in vitro by Japanese eel spermatozoa, *J Exp Zool*, 277: 171-180.

Okorie, O.E., Bae, J.Y., Kim, K.W., Son, M.H., Kim, J.W. ve Bai1, S.C. (2013) Optimum feeding rates in juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, at the optimum rearing temperature, *Aquacult Nutr*, 19(3): 267–277.

Olito, C. ve Brock, I. (1991) Sex reversal of rainbowtrout: Creating an all-female population, *Prog Fish-Culturist*, 53: 41-44.

Orfão, L.H., Nascimento, A.F., Corrêa, F.M., Cosson, J. ve Viveiros, A.T.M. (2011) Extender composition, osmolality and cryoprotectant effects on themotility of sperm in the Brazilian endangered species *Brycon opalinus*(*Characiformes*), *Aquaculture*, 311: 241-247.

Öğretmen, F., Gölbaşı, S. ve İnanan, B.E. (2014a) Inhibitory effect of K⁺ and Ca²⁺ concentrations, pH and osmolality of activation solution on motility of Shabut (*Barbus grypus* Heckel 1843) spermatozoa, *Turk J Vet Anim Sci*, 38: 245-252.

Öğretmen, F., İnanan, B.E. ve Öztürk, M. (2014b) Protective effects of propolis on cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm, *Cryobiology*, 68: 107-112.

- Özden, O., Güner, Y., Kizak, V. (2003) Tatlısu balık kültüründe uygulanan bazı biyoteknolojik yöntemler, *EgeJFAS*, 20(3-4): 563-574.
- Özden, O. ve Güllü, K. (1996) Kültür balıklarında hormon kullanılarak cinsiyet değiştirme çalışmaları, *EgeJFAS*, 13 (1-2): 199-209.
- Pandian, T.J. ve Sheela, S.G. (1995) Hormonal induction of sex reversal in fish, *Aquaculture*, 138: 1-22.
- Paniwnyk, L., Beaufoy, E., Lorimer, J.P. ve Mason, T.J. (2001) The extraction of rutin from flower buds of *Sophora japonica*, *Ultrason Sonochem*, 8(3): 299-301.
- Pérez-Cerezales, S., Martinez-Paramo, S. ve Cabrita E. (2009) Evaluation of oxidative DNA damage promoted by storage in sperm from sex-reversed rainbow trout, *Theriogenology*, 71(4): 605-613.
- Pérez-Cerezales, S., Martinez-Paramo, S., Cabrita, E., Martinez-Pastor, F., Paz, P. ve Herraiz, M.P. (2009) Evaluation of oxidative DNA damage promoted by storage in sperm from sex-reversed rainbow trout, *Theriogenology*, 71: 605-613.
- Piferrer, F. (2001) Endocrine sex control strategies for feminization of teleost fish, *Aquaculture*, 197: 229-281.
- Piferrer, F. ve Lim, L.C. (1997) Application of sex reversal technology in ornamental fish culture, *Aquarium Sci Conserv*, 1: 113–118.
- Piironen, J. (1985) Variation in the properties of milt from the Finnish landlocked salmon (*Salmo salar m. Sebago Girard*) during a spawning season, *Aquaculture*, 48: 337-350.
- Piironen, J. ve Hyvarinen, H. (1983) Composition of the milt of some teleost fishes, *J Fish Biol*, 22: 351-361.
- Piros, B., Glogowski, J., Kolman, R., Rzemieniecki, A., Domagala, J., Horváth, A., Urbanyi, B. ve Ciereszko, A. (2002) Biochemical characterization of Siberian sturgeon *Acipenser baeri* and sterlet *Acipenser ruthenus* milt plasma and spermatozoa, *Fish Physiol Biochem*, 26(3): 289-295.

- Purdom, C.E. (1993) *Genetics and Fish Breeding*, Chapman & Hall, London, 277s.
- Purser, J., ve Forteach, N. (2012) Salmonids, 334-335, Lucas, J.S., Southgate, P.C. (editörler), *Aquaculture Farming Aquatic Animals and Plants*, 2. Baskı, John Wiley & Sons Ltd., Wiley-Blackwell, UK, 648s.
- Rana, K. (1995) Preservation of gametes, 53-76, Bromage, N.R., Roberts, R.J. (editörler), *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*, Wiley-Blackwell, UK, 436s.
- Rideout, R.M., Litvak, M.K. ve Trippel, E.A. (2003) The development of a sperm cryopreservation protocol for winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum): evaluation of cryoprotectants and diluents, *Aquac Res*, 34: 653-659.
- Rigonato, J., Mantovani, M.S. ve Jordão, B.Q. (2005) Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for the detection of genotoxicity, *Genet Mol Biol*, 28(3), 464-468.
- Robles, V., Cabrita, E., Cunado, S. ve Herraéz, M.P. (2003) Sperm cryopreservation of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): parameters that affect its ability for freezing, *Aquaculture*, 224: 203-212.
- Robles, V., Cabrita E. ve Herráez, P. (2009) Sperm cryopreservation of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), 391-395, Cabrita, E., Robles, V., Herráez, P. (editörler), *Methods in reproductive aquaculture marine and freshwater species*, CRC Press, Boca Raton, United States of America, 568s.
- Rodríguez-Muñoz, R. ve Ojanguren, A. F. (2002) Effect of short-term preservation of sea lamprey gametes on fertilisation rate and embryo survival, *J Appl Ichthyol*, 18(2): 127-128.
- Rosengrave, P., Taylor, H., Montgomerie, R., Metcalf, V., McBride, K. ve Gemmell, N.J. (2009) Chemical composition of seminal and ovarian fluids of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and their effects on sperm motility traits, *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 152(1): 123-129.
- Rouxel, C., Suquet, M., Cosson, J., Severe, A., Quemener, L. ve Fauvel, C. (2008) Changes in atlantic cod (*Gadus morhua* L.) sperm quality during the spawning season, *Aquacult Res*, 39:434-440.

- Rurangwa, E., Kime, D.E., Ollevier, F. ve Nash, J.P. (2004) The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish, *Aquaculture*, 234, 1-28.
- Saijaa, A., Tomaino, A., Trombetta, D., Pellegrino, M.L., Tita, B., Messina, C., Bonina, F.P., Rocco, C., Nicolosi, G. ve Castelli, F. (2003) In vitro' antioxidant and photoprotective properties and interaction with model membranes of three new quercetin esters, *Eur J Pharm Biopharm*, 56: 167-174.
- Sakkas, D., Urner, E., Bianchi, P.G., Bizzaro, D., Wagner, I., Jaquenoud, N., Manicardi, G. ve Campana, A. (1996) Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection, *Hum Reprod*, 11: 837-843.
- Saleh, R.A., Agarwal, A., Kandirali, E., Sharma, R.K., Thomas, A.J., Nada, E.A., Evenson, D.P. ve Alvarez, J.G. (2002) Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa, *Fertil Steril*, 78: 1215-1224.
- Sanchez-Rodriguez, S., Escaffre, A.M., Marlot, S. ve Reinaud, P. (1978) The spermiation period in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Plasma gonadotropin and androgen levels, sperm production and biochemical changes in the seminal fluid, *Ann Biol Anim Biochim Biophys*, 18: 943-948.
- Sasado, T., Morinaga, C., Niwa, K., Shinomiya, A., Yasuoka, A., Suwa, H., Hirose, Y., Yoda, H., Henrich, T., Deguchi, T., Iwanami, N., Watanabe, T., Kunitatsu, S., Osakada, M., Okamoto, Y., Kota, Y., Yamanaka, T., Tanaka, M., Kondoh, H. ve Furutani-Seiki, M. (2004) Mutations affecting early distribution of primordial germ cells in Medaka (*Oryzias latipes*) embryo, *Mech Dev*, 121(7-8): 817-828.
- Satia, B.P, Donaldson, L.R, Smith, L.S. ve Nightingale, J.N. (1974) Composition of ovarian fluid and eggs of the University of Washington strain of rainbow trout (*Salmo gairdneri*), *J Fish Res Board Can*, 31(11): 1796-1799.
- Scheerer, P.D. ve Thorgaard, G.H. (1989) Improved fertilization by cryopreserved rainbow trout semen with theophylline, *Prog Fish Cult*, 51:179-182
- Schlenk, W. ve Kahman, H. (1983) The chemical composition of seminal fluids and their physiological importance study with trout sperm, *Biochem Zool*, 295, 283-301.

- Scott, A.P. ve Baynes, S.M. (1980) A review of the biology, handling, and storage of salmonid spermatozoa, *J Fish Biol*, 17: 707-739.
- Shaliutina, A. (2013) *Fish sperm motility parameters and total proteins profiles in seminal plasma during in vivo and in vitro storage*, Ph.D. Thesis, Tez, University of South Bohemia, České Budějovice, 98s.
- Shaliutina, A., Hulak, M., Gazo, I., Linhartova, P. ve Linhart, O. (2013) Effect of short-term storage on quality parameters, DNA integrity, and oxidative stress in Russian (*Acipenser gueldenstaedtii*) and Siberian (*Acipenser baerii*) sturgeon sperm, *Anim Reprod Sci*, 139: 127-135.
- Sharma, R.K. ve Agarwal, A. (1996) Role of reactive oxygen species in male infertility, *Urology*, 48: 835-850.
- Sheikhzadeh, N., Reza, A., Allah, J.J.R. ve Hossein, T. (2010) Effect of Ergosan on semen quality of male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) broodstock, *Anim Reprod Sci*, 122: 183–188.
- Sheperd, J. ve Bromage, N. (1990) *Intensive Fish Farming*, BSP Professional Books, Oxford, 404s.
- Sikka, S.C. (1996) Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function, *Front Biosci*, 1: 78-86,
- Sikka, S.C. (2004) Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology, *J Androl*, 25: 5-18.
- Sikka, S.C., Rajasekaran, M. ve Hellstrom, W.J. (1995) Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility, *J Androl*, 16: 464-468.
- Silva, E.C.B., Cajueiro, J.F.P., Silva, S.V., Soares, P.C. ve Guerra, M.M.P. (2012) Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm, *Theriogenology*, 77(8): 1722-1726.
- Simić, A., Manojlović, D., Šegan, D. ve Todorović, M. (2007) Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics, *Molecules*, 12: 2327-2340.

- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. ve Schneider, E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp Cell Res*, 175(1): 184-191.
- Słowińska, M., Nynca, J., Cejko, B.I., Dietrich, M.A., Horváth, Á., Urbányi, B., Kotrik, L. ve Ciereszko, A. (2013) Total antioxidant capacity of fish seminal plasma, *Aquaculture*, 400–401: 101–104.
- Slupphaug, G., Kavli, B. ve Krokan, H.E. (2003) The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage, *Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen*, 531: 231-251.
- Spinaci, M., Ambrogi, M.D., Volpe, S., Galeati, G., Tamanini, C. ve Seren, E. (2005) Effect of staining and sorting on boar sperm membrane integrity, mitochondrial activity and in vitro blastocyst development, *Theriogenology*, 64:191-201.
- Springate, J.R.C., Bromage, N.R., Elliott, J.A.K. ve Hudson, D.L. (1984) The timing of ovulation and stripping and their effects on the rates of fertilization and survival to eying, hatch and swim-up in the rainbow trout *Salmo gairdneri* R., *Aquaculture*, 43: 313–322.
- Srivastava, A., Chopra, S.K. ve Dasgupta, P.R. (1984) Biochemical analysis of human seminal plasma. II. Protein, non-protein nitrogen, urea, uric acid and creatine, *Andrologia*, 16(3): 265-268.
- Stankovic, I. (2003) Curcumin-Chemical and Technical Assessment, *61st joint FAO/WHO expert committee on food additives*, 10-19 Haziran, Rome, Italy, 1-8.
- Stivala, L.A., Savio, M., Carafoli, F., Perucca, P., Bianchi, L., Maga, G., Forti, L., Pagnoni, U.M., Albini, A., Prosperi, E., Vannini, V. (2001) Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol, *J Biol Chem*, 276(25), 22586–22594.
- Stoss, J. (1983) Fish gamete preservation and spermatozoan physiology, 305-350, Hoar, W.S., Randall, D.J., Donaldson, E.M. (editörler), *Fish physiology*, Academic Press, New York, 502s.
- Stoss, J. ve Holtz, W. (1983) Successful storage of chilled rainbow trout (*Salmo gairdneri*) spermatozoa for up to 34 days, *Aquaculture*, 31: 269-274.

- Stoss, J. ve Refstie, T. (1983) Short-term storage and cryopreservation of milt from Atlantic salmon and sea trout, *Aquaculture*, 30(1-4): 229-236.
- Stoss, J., Buyukhatipoglu, S. ve Holtz, W. (1977) Der einfluss bestimmter electrolyte auf die bewegungsauslosung bei spermatozoen der regenbogenforelle (*Salmo gairdneri*), *Zuchthygiene*, 12: 178-184.
- Subasinghe, R., Soto, D. ve Jia, J. (2009) Global aquaculture and its role in sustainable development, *Rev Aquaculture*, 1(1): 2-9.
- Suquet, M., Omnes, M.H., Normant, Y. ve Fauvel, C. (1992) Assesment of sperm concentration and motility in turbot (*Scophthalmus maximus*), *Aquaculture*, 101: 177-185.
- Suquet, M.R., Billard, R., Cosson, J., Dorange, G., Chauvaud, L., Mugnier, C. ve Fauvel, C. (1994) Sperm features in turbot *Scophthalmus maximus*: A comparison with other freshwater and marine fish species, *Aquat Living Resour*, 7: 283-294.
- Tabakoğlu, Ş.S. (2005) *Hipofiz uygulanmış ve uygulanmamış farklı boy gruplarına ait aynalı sazan (Cyprinus carpio)'ların sperm kalitelerinin incelenmesi*, Master tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 41s.
- Takai, H. ve Morisawa, M. (1995) Changes in intracellular KC concentration caused by external osmolarity change regulate sperm motility of marine and freshwater teleosts, *J Cell Sci*, 108: 1175-1181.
- Tanasiichuk, V.S. ve Vonokov, I.K. (1956) The effect of different water salinities on spermatozoa and eggs of roach and bream of the Northern Caspian, *Trudy VNIRO*, 32: 284-292.
- Tanimoto, S., Kudo, Y., Nakazawa, T. ve Morisawa, M. (1994) Implication that potassium flux and increase in intracellular calcium are necessary for the initiation of sperm motility in salmonid fishes, *Mol Reprod Dev*, 39: 409-414.
- Tanimoto, S., Morisawa, M. (1988) Roles for potassium and calcium channels in the initiation of sperm motility in rainbow trout, *Dev Growth Differ*, 30(2): 117-128.

- Tate, A.E. ve Helfrich, L.A. (1998) Off-season spawning of sun shine bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) exposed to 6 or 9 month phase-shifted photothermal cycles, *Aquaculture*, 167: 67-83.
- Tekin, N., Seçer, S., Akçay, E., Bozkurt, Y. ve Kayam, S. (2003) Gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* W., 1792) yaştın spermatolojik özellikler üzerine etkisi, *Türk Vet ve Hay Der*, 27: 37-44.
- Terner, C. (1986) Evaluation of salmonid sperm motility for cryopreservation, *Prog Fish Cult*, 48: 230-232.
- Terner, C. ve Korsh G. (1963) The oxidative metabolism of pyruvate, acetate, and glucose in isolated fish spermatozoa, *J Cell Comp Physiol*, 62: 243-249.
- Therond, P., Auger, J., Legrand, A. ve Jouannet, P. (1996) α -tocopherol in human spermatozoa and seminal plasma: relationships with motility, antioxidant enzymes and leukocytes, *Mol Hum Reprod*, 2(10): 739-744.
- Timmermans, L.P.M. (1996) Origin and differentiation of primordial germ cells in vertebrates, especially fishes, *Neth J Zool*, 46: 147-162.
- Toth, G.P., Ciereszko, A., Christ, S.A. ve Dabrowski, K. (1997) Objective analysis of sperm motility in the Lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*: activation and inhibition conditions, *Aquaculture*, 154: 337-348.
- Tóth, J., Mrlianová, M., Tekelova, D. ve Korenova, M. (2003) Rosmarinic acid-an important phenolic active compound of lemon balm (*Melissa officinalis* L.), *Acta Facult Pharm Univ Comenianae*, 50: 139-146.
- Tramer, F., Rocco, F., Micali, F., Sandri, G. ve Panfili, E. (1998) Antioxidant systems in rat epididymal spermatozoa, *Biol Reprod*, 59: 753-758.
- Trigo, P., Merino, O., Figueroa, E., Valdebenito, I., Sánchez, R. ve Risopatrón, J. (2015) Effect of short-term semen storage in salmon (*Oncorhynchus mykiss*) on sperm functional parameters evaluated by flow cytometry, *Andrologia*, 47(4): 407-411.
- Tuset, V.M., Dietrich, G.J., Wojtczak, M., Słowinska, M., de Monserrat J. ve Ciereszko, A. (2008) Relationships between morphology, motility and

fertilization capacity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Appl Ichthyol*, 24: 393-397.

Ubilla, A., Fornari, D., Figueroa, E., Effer, B. ve Valdebenito, I. (2015) Short-term cold storage of the semen of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) incorporating DMSO in the sperm diluent. Effects on motility and fertilizing capacity, *Aquacult Res*, 46: 37-44.

Ubilla, A. ve Valdebenito, I. (2011) Use of antioxidants on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) sperm diluent: effects on motility and fertilizing capability, *Lat Am J Aquat Res*, 39(2): 338-343.

Vandeputte, M., Peignon, E., Vallod, D., Haffray, P., Komen, J. ve Chevassus, B. (2002) Comparison of growth performances of three French strains of common carp (*Cyprinus carpio*) using hemi-isogenic scaly carp as internal control, *Aquaculture*, 205(1): 19-36.

Verma, D.K., Routray, P., Nanda, P.K. ve Sarangi, N. (2009) Seasonal variation in semen characteristics and biochemical composition of seminal plasma of Mrigal, *Cirrhinus mrigala* (Ham.), *Asian Fish Sci*, 22: 429-443.

Vizziano, D., Fostier, A., Loir, M. ve Le Gac, F. (2008) Testis development, its hormonal regulation and spermiation induction in teleost fish, 103-139, Alavi, S.M.H, Casson, J.J., Coward, C., Rafiee, G. (editörler) *Fish spermatology*, Alpha Science International Ltd., Oxford, UK, 300s.

Wang, A.W., Zhang, H., Ikemoto, I., Anderson, D.J. ve Loughlin, K.R. (1997) Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation, *J Urol*, 49: 921-925.

Wang, Z. ve Crim, L.W. (1997) Seasonal changes in the biochemistry of seminal plasma and sperm motility in the ocean pout, *Macrozoarces americanus*, *Fish Physiol Biochem*, 16: 77-83.

Watson, P.F. (2000) The causes of reduced fertility with cryopreserved semen, *Anim Reprod Sci*, 60-61: 481-492.

Wojtczak, M., Całka, J., Glogowski, J. ve Ciereszko, A. (2007) Isolation and characterization of alpha-1-proteinase inhibitor from common carp (*Cyprinus carpio*) seminal plasma, *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 148: 264-276.

- Wojtczak, M., Dietrich, G.J., Slowinska, M., Dobosz, S., Kuzminski, H. ve Ciereszko, A. (2007) Ovarian fluid pH enhances motility parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa, *Aquaculture*, 270, 259-264.
- Wright, J.S. (2002) Predicting the antioxidant activity of curcumin and curcuminoids, *J Mol Struct (Theochem)*, 591: 207-217.
- Yaron, Z. (1995) Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp, *Aquaculture*, 129: 49-73.
- Zheng, Y., Haworth, I.S., Zuo, Z., Chow, M.S.S., Chow, A.H.L. (2005) Physicochemical and structural characterization of quercetin-b-cyclodextrin complexes, *J of Pharm Sci*, 94: 1079-1089.
- Zhou, B., Liu, W., Siu, W.H., O'Toole, D. ve Lam, P.K. (2006) Exposure of spermatozoa to duroquinone may impair reproduction of the common carp (*Cyprinus carpio*) through oxidative stress, *Aquat Toxicol*, 77(2): 136-142.
- Zhu, L., Luo, X. ve Jin, Z. (2008) Effect of resveratrol on serum and liver lipid profile and antioxidant activity in hyperlipitemia rats, *Asian-Aust J Anim Sci*, 21(6): 890-895.
- Zhukinskiy, V.N., Alekseenko, V.R. (1983) Semen quality in common carp, *Cyprinus carpio*, and white amur, *Ctenopharyngodon idella* (Cyprinidae), in different periods of the spawning season and as influenced by extraction methods, *J of Ichthyol*, 23: 124-133.
- Zilli, L., Schiavone, R., Zonno, V., Storelli, C. ve Vilella, S. (2003) Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation, *Cryobiology*, 47: 227-235.
- Zu, G., Zhang, R., Yang, L., Ma, C., Zu, Y., Wang, W. ve Zhao, C. (2012) Ultrasound-assisted extraction of carnosic acid and rosmarinic acid using ionic liquid solution from *Rosmarinus officinalis*, *Int J Mol Sci*, 13: 11027-11043.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad Soyad : Burak Evren İNANAN
Doğum Yeri ve Tarihi : İzmir-Türkiye, 14/09/1980
Telefon : 0 536 254 52 73
E-posta : burakinanan@mu.edu.tr
Kişisel Web Sayfası : <http://akademik.mu.edu.tr/burakinanan>
Yabancı Dil Puanı : 91,250 (ÜDS, İngilizce, Ekim 2009)

Eğitim

Alınan Derece	Aldığı Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi / Fen Edebiyat Fakültesi / Biyoloji Bölümü	2003
Yüksek Lisans	Dokuz Eylül Üniversitesi / Fen Bilimleri Deniz Bilimleri ve Teknolojisi / Canlı Deniz Kaynakları Bölümü	2007

SCI ve SSCI Kapsamındaki Dergilerdeki Yayınlar

- 1-) Öğretmen, F., **İnanan, B.E.**, Kutluyer, F., Kayim, M. (2015) Effect of semen extender supplementation with cysteine on post-thaw sperm quality, DNA damage, and fertilizing ability in the common carp (*Cyprinus carpio*), *Theriogenology*, 83: 1548-1552.
- 2-) Genç, T.O., Yılmaz, F., **İnanan, B.E.**, Yorulmaz, B., Ütük, G. (2015) Application of multi-metal bioaccumulation index and bioavailability of heavy metals in *Unio sp.* (Unionidae) collected from tersakan river, Muğla, South-west Turkey, *Fresenius Environmental Bulletin*, 24(1a): 208-215.
- 3-) Yabanlı, M., Katalay, S., Yozukmaz, A., **İnanan, B.E.** (2015) Comparative study of heavy metals and selenium accumulation in the digestive gland and gills of *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) caught in Izmir bay (Turkey), *Turk J Biochem*, 40(2): 140-148.
- 4-) Öğretmen, F. ve **İnanan, B.E.** (2014) Effect of butylated hydroxytoluene (BHT) on the cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 151: 269-274.

- 5-) Öğretmen, F. ve **İnanan, B.E.** (2014) Evaluation of Cryoprotective Effect Of Turkish Pine Honey On Common Carp (*Cyprinus Carpio*) Spermatozoa, *CryoLetters* 35(5): 427-437.
- 6-) Öğretmen, F., Gölbaşı, S. ve **İnanan, B.E.** (2014) Inhibitory effect of K⁺ and Ca²⁺ concentrations, pH and osmolality of activation solution on motility of Shabut (*Barbus grypus* Heckel 1843) spermatozoa, *Turk J Vet Anim Sci*, 38: 245-252.
- 7-) Öğretmen, F., Gölbaşı, S., **İnanan, B.E.**, Kizak, V., Kayim, M. (2014) Use of Clove Oil and Eugenol to Anesthetize Fingerling Shabut *Barbus grypus*, *N Am J Aquacult*, 76(1): 9-13.
- 8-) Öğretmen, F., **İnanan, B.E.** ve Ozturk, M. (2014) Protective effects of propolis on cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm, *Cryobiology*, 68: 107-112.
- 9-) Bizzel, K.C., Suzal, A., Demirdağ, A., **İnanan B.E.**, Esen, E. (2011) Particulate organic matter contribution of Gediz River to the Aegean Sea, *Turk J Fish Aquat Sci*, 11(4): 547-559.

Ulusal Hakemli Dergilerdeki Yayınlar

- 1-) Genç, T.O., **İnanan, B.E.**, Yabanlı, M., Yılmaz, F. (2015) Japon balığı (*Carassius auratus* Linnaeus, 1758) dokularında bor akümülyasyonu, *Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 3(6): 498-503.

Uluslararası Sempozyumlarda Sunulan Seçilmiş Bildiriler

- 1-) Öğretmen, F., Gölbaşı, S., **İnanan, B. E.**, Yıldırım N., Controlled Reproduction of Wild Shabut (*Barbus grypus*, Heckel; 1843), 25-27 Eylül 2014, *Balıkçılık ve Sucul Bilimler Sempozyumu*.
- 2-) Öğretmen, F., **İnanan, B.E.**, Yıldırım, N., Öztürk, M., Muğla Çam Balının Sazan Balığı (*Cyprinus carpio*) Spermasının Dondurulmasında Kullanılması, 5-9 Kasım 2014, 4. Uluslararası Muğla Arıcılık ve Çam Balı Kongresi eşzamanlı olarak 20. Apisilavia Kongresi.
- 3-) Öğretmen, F., Szabó, T., **İnanan, B.E.**, Gökçek, K., Yayın Balığı (*Silurus glanis* L.) Üretiminde Testiküler Spermanın Muhafazası, 20-22 Mayıs 2015, II. Balıklandırma ve Rezervuar Yönetimi Sempozyumu.

Ulusal Sempozyumlarda Sunulan Seçilmiş Bildiriler

- 1-) **İnanan, B.E.**, Yılmaz, F. ve Öğretmen, F., Farklı Sulandırma Oranlarının ve pH Seviyelerinin Cinsiyeti Değiştirilmiş Dişi Gökkuşuğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Testiküler Sperm Motilite Parametreleri Üzerine Etkileri, 26 Mayıs 2015, *Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Bilimleri Araştırma Sempozyumu*.

2-) Öğretmen, F., **İnanan, B.E.** ve Gökçek, K., Yayın balığı spermi olgunlaştırılması, 03-05 Nisan 2014, *Gamet Biyolojisi Çalıştayı*.

3-) Öğretmen, F., **İnanan, B.E.** ve Kumral, F., Avrupa deniz levreği (*Dicentrarchus labrax* Linnaeus, 1758) sperminin kısa süreli muhafazası için farklı oranlardaki farklı sulandırıcıların değerlendirilmesi, pH ve tuzluluğun sperm aktivasyonuna etkisi, 3-6 Eylül 2013, 17. *Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu*.

Seçilmiş Bilimsel Faaliyetler

-“Bilimsel Ziyaret”, 1-11 Kasım 2013, Su Koruma ve Balıkçılık Fakültesi (FFPW), Güney Bohemia Üniversitesi, Ceske Budejovice, Çek Cumhuriyeti.

-“Bilimsel Ziyaret”, 05-15 Haziran 2014, Szent István Üniversitesi, Akuakültür Bölümü, Gödöllő, Macaristan.

-“Bilimsel Ziyaret”, 18-28 Nisan 2014 Deniz Bilimleri Fakültesi, Cadiz Üniversitesi, İspanya.

-“Sazan balığı sperminde motilite süresince lipid peroksidasyonu” isimli projeye katılım, 28 Haziran-27 Temmuz 2014, Su Koruma ve Balıkçılık Fakültesi (FFPW), Güney Bohemia Üniversitesi, Ceske Budejovice, Çek Cumhuriyeti.

-“Erasmus Programı Personel Eğitim Alma Hareketliliği”, 23 Mayıs - 31 Mayıs 2015, Su Koruma ve Balıkçılık Fakültesi (FFPW), Güney Bohemia Üniversitesi, Ceske Budejovice, Çek Cumhuriyeti.