



**T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI**

**KARADENİZ KALKAN BALIĞI (*Scophthalmus maximus*)
SPERMINİN DONDURULMASINDA ANTİOKSİDAN
KULLANIMI VE DNA HASARI ÜZERİNE ETKİLERİ**

(Doktora Tezi)

Hamza POLAT

**Danışman
Doç. Dr. İlker Zeki KURTOĞLU**

RİZE

2022

KABUL VE ONAY

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Su Ürünleri Anabilim Dalında, Doç. Dr. İlker Zeki KURTOĞLU danışmanlığında, Hamza POLAT tarafından hazırlanan *Karadeniz Kalkan Balığı (Scophthalmus maximus) Sperminin Dondurulmasında Antioksidan Kullanımı ve DNA Hasarı Üzerine Etkileri* adlı bu tez çalışması, 08/12/2022 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda oy birliği / oy çokluğuyla ile başarılı bulunarak jürimiz tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı, Adı Soyadı	İmza
Başkan	: Doç. Dr. İlker Zeki KURTOĞLU	
Üye	: Prof. Dr. Nadir BAŞÇINAR	
Üye	: Prof. Dr. Erol ÇAPKIN	
Üye	: Prof. Dr. Özgün KALKIŞIM	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Fatma DELİHASAN SONAY	

ETİK BEYAN

Su Ürünleri Ana Bilim Dalı Doktora Programından mezun olmak üzere teslim ettiğim “Karadeniz Kalkan Balığı (*Scophthalmus maximus*) Sperminin Dondurulmasında Antioksidan Kullanımı ve DNA Hasarı Üzerine Etkileri” adlı tezim, bilim ve araştırma etiği prensiplerine riayet edilerek tarafımdan yazılmıştır.

Tez çalışmamda, başka kaynaklardan aktarılan bütün bilgi ve alıntılar, Enstitünüz Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak açıkça gösterilmiştir. Kaynağı gösterilenler dışında kalan bütün bilgiler uygun araştırma yöntemi kullanılarak tarafımdan edinilmiş ve esere bu şekilde yansıtılmıştır. Şahsıma ait olmayan hiçbir bilgi, kasıt veya kusurlar, şahsıma aitmiş gibi gösterilmemiştir. İnternet kaynakları dâhil, sahibine/kaynağına atıf yapılmaksızın hiçbir bilgi kullanılmamıştır. Aksinin ortaya çıkması halinde doğacak bütün hukuki, idari, akademik ve etik sorumluluk tarafıma ait olacaktır. Eserin tesliminden sonra herhangi bir zamanda, bilim etiğine aykırılık tespit edilmesi ve/veya eserimle ilgili intihal veya intihal şeklinde anlaşılabilecek bir durumun ortaya çıkması halinde; Üniversiteniz ve eğitim kadronuzun hiçbir şekilde sorumlu tutulmayacağını hür irademle kabul, beyan ve taahhüt ederim. 08/12/2022

Hamza POLAT

ÖN SÖZ

Bu çalışma Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) tarafından finanse edilmiştir. Tez çalışmamın yürütülmesinde bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren danışman hocam Sayın Doç. Dr. İlker Zeki KURTOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Araştırma projesinin yürütülmesinde desteklerini esirgemeyen Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitü Müdürü Dr. Ercan KÜÇÜK, Teknik Koordinatör Dr. Ahmet Faruk YEŞİLSU, Doç. Dr. İlhan AYDIN, Dr. Atife Tuba BEKEN, Muhammet Doğan ÖZDEMİR, Dr. Esen ALP ERBAY, Dr. Murat ERBAY ve Recep PARLAK'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca bu tez çalışması boyunca desteğini ve yardımlarını esirgemeyen aileme şükranlarımı sunarım.

Bu Doktora Tezi Tarım ve Orman Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) tarafından TAGEM/HAYSÜD/B/21/A6/P2/2452 no'lu proje ile desteklenmiştir.

Hamza POLAT

2022 / RİZE

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	I
ETİK BEYAN.....	II
ÖN SÖZ	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÖZET	VI
ABSTRACT.....	VII
KISALTMALAR.....	VIII
TABLolar LİSTESİ.....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ	XI
GİRİŞ	1
1. GENEL BİLGİLER	6
1.1. Kalkan Balığı	6
1.1.1. Sistematikteki Yeri.....	6
1.1.2. Morfolojik Özellikleri.....	7
1.1.3. Dağılımı, Biyoeolojik ve Üreme Özellikleri.....	7
1.1.4. Dünyada Kalkan Balığı Yetiştiriciliği	9
1.1.5. Karadeniz’de Kalkan Balığı Yetiştiriciliği	10
1.1.6. Kalkan Balığı Üretim Tekniği	11
1.2. Balık Sperminin Özellikleri	14
1.3. Balıklarda Sperm Kalitesi	15
1.3.1. Spermatokrit Oranı ve Sperm Yoğunluğu	18
1.3.2. pH ve Ozmolarite	19
1.3.3. Sperm Motilitesi.....	19
1.4. Sperm Muhafazası.....	20
1.4.1. Kısa Süreli Muhafaza.....	20
1.4.2. Uzun Süreli Muhafaza (Kriyoprezervasyon)	21
1.4.2.1. Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Kriyoprezervasyon	22
1.4.2.2. Kriyoprezervasyonda Antioksidan Kullanımı.....	25
1.4.2.3. Çalışmada Kullanılan Antoksidanlar	27
1.4.2.4. Kriyoprezervasyonda DNA Hasarı	28
1.5. Önceki Çalışmalar.....	30

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	37
2.1. Materyal	37
2.1.1. Araştırma Yeri	37
2.1.2. Araştırmada Kullanılan Damızlık Materyali	37
2.1.3. Damızlıkların Muhafazası ve Kullanılan Diğer Malzemeler	38
2.1.4. Sperm Kalite Kriterleri Belirlenmesinde Kullanılan Materyaller..	38
2.1.5. Sperm Kriyoprezervasyon Materyali	39
2.1.6. Yumurta Sağımı ve İnkübasyonu.....	39
2.2. Yöntem.....	40
2.2.1. Damızlık Yönetimi.....	40
2.2.2. Sperm Toplama	40
2.2.3. Sperm Kalitesinin Belirlenmesi	41
2.2.3.1. Sperm Kalite Parametreleri	41
2.2.3.2. Sperm pH'sı ve Hareketlilik Süresi.....	42
2.2.3.3. Spermatokrit Oranı ve Konsantrasyonu	42
2.2.3.4. Sperm Ozmolaritesinin Belirlenmesi	42
2.2.4. Sperm Kriyoprezervasyonu ve Antioksidanlar	42
2.2.5. DNA Hasarının Belirlenmesi	43
2.2.6. Yumurta Eldesi ve Dölleme Çalışmaları	45
2.2.6.1. Hormon Hazırlama ve Uygulama	45
2.2.6.2. Yumuta Sağımı.....	45
2.2.7. Dölleme Kabiliyetinin Belirlenmesi	46
2.2.8. Verilerin Değerlendirilmesi	47
2.3. Bulgular.....	47
2.3.1. Kalkan Balığı Taze Sperminin Spermatolojik Özellikleri	47
2.3.2. Spermin Kriyoprezervasyonu	48
2.3.3. Dölleme ve Çıkış Oranları	53
2.3.4. Antioksidanların DNA Hasarına Etkileri.....	53
3. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	56
3.1. Öneriler	66
KAYNAKÇA.....	68
ETİK KURUL KARARI	86

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Anabilim Dalı : Su Ürünleri Anabilim Dalı
Tez türü : Doktora Tezi
Danışmanı : Doç. Dr. İlker Zeki KURTOĞLU
Hazırlayan : Hamza POLAT
Yıl : 2022
Sayfa sayısı : 86

ÖZET

KARADENİZ KALKAN BALIĞI (*Scophthalmus maximus*) SPERMINİN DONDURULMASINDA ANTİOKSİDAN KULLANIMI VE DNA HASARI ÜZERİNE ETKİLERİ

Karadeniz kalkan balığı (*Scophthalmus maximus*) sperminin dondurularak saklanmasıyla seyrelticiye eklenen farklı antioksidanlar ve bunların farklı dozlarının çözündürme sonrası spermin motilitesi, hız parametreleri, dölleme kapasitesi ve DNA hasarı üzerindeki etkileri araştırıldı. Antioksidan olarak: rozmarinik asit (RA) (25, 50 ve 100 µg/mL), ürik asit (UA) (25, 50 ve 100 µg/mL) ve taurin (TA) (25, 50 ve 100 µg/mL) belirlenen dozlarda geleneksel sulandırıcıya eklenmiştir. Sulandırıcı ile 1:9 oranında seyreltilen sperm örnekleri kriyoprezervasyon yapıldı. Yapılan çalışmada elde edilen sonuçlara göre; spermin çözülme sonrası motilitesi en yüksek 25 µg/mL RA'da (% 77,41±2,90), ardından 50 µg/mL RA'da (% 74,86±3,2), 50 µg/mL UA'da (% 69,56±3,30) ve 100 µg/mL UA'da (% 70,74±2,51) olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar geleneksel sulandırıcıdan önemli ölçüde farklılık göstermiştir (p<0.05). En yüksek dölleme oranı 25 µg/mL RA'da (% 81,67±2,52), çıkış oranı ise 50 µg/mL UA'da (% 70,67±4,67) belirlenmiştir. Ayrıca DNA hasarı oranı en düşük 50 µg/mL UA'da (% 5,07±1,57) gerçekleşmiştir. Bu çalışmada antioksidanların, dondurulup çözündürülen kalkan balığı spermi üzerinde koruyucu etkisi olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, Kriyoprezervasyon, DNA hasarı, Sperm kalitesi, Kalkan

Recep Tayyip Erdogan University Institute of Graduate Studies

Department : Department of Faculty of Fisheries and Aquatic Sciences
Thesis Type : Ph.D Thesis
Supervisor : Assoc. Prof. Dr. İlker Zeki KURTOĞLU
Author : Hamza POLAT
Year : 2022
Pages : 86

ABSTRACT

**EFFECT of ANTIOXIDANTS on CRYOPRESERVED BLACK SEA TURBOT
(*Scophthalmus maximus*) SPERMATOZOA QUALITY and DNA DAMAGE**

The effects of several antioxidants added to cryopreservation extender on turbot (*Scophthalmus maximus*) sperm post-thaw motility, fertilization, sperm characteristics, and DNA damage were investigated. The following antioxidants were used in conjunction with the conventional extenders: rosmarinic acid (RA) (25, 50, and 100 µg/mL); uric acid (UA) (25, 50, and 100 µg/mL); and taurine (TA) (25, 50, and 100 µg/mL). On sperm samples that had been diluted by the extenders at a 1:9 ratio, cryopreservation was carried out. The results demonstrated that the post-thaw motility of sperm was higher in 25 µg/mL RA (77.41±2.90 %), followed by 50 µg/mL RA (74.86±3.2 %), 50 and 100 µg/mL UA (69.56±3.30 % and 70.74±2.51 %, respectively) which significantly differentiated from conventional extender. The highest hatching rate (70.67±4.67 %) was attained at UA 50 µg/mL, while the highest fertilization rate (81.67±2.52 %) was observed in RA 25 µg/mL. At UA 50 µg/mL, the DNA fragmentation rate was lowest (5.07±1.57 %). In conclusion, antioxidants had a protective impact on sperm of turbot that had been frozen and thawed.

Keywords: Antioxidant, Cryopreservation, DNA damage, Sperm quality, Turbot

KISALTMALAR

ATP	:	Adenozin trifosfat
BSA	:	Bovine Serum Albumin
CASA	:	Bilgisayarlı Sperm Analizi (Computer-Assisted Sperm Analysis)
cm	:	Santimetre
DHA	:	Dokosa heksaenoik asit
dk	:	Dakika
DMA	:	Dimetil asetamid
DMSO	:	Dimetil sülfoksit
DNA	:	Deoksiribo nükleik asit
EG	:	Etilen glikol
EPA	:	Eikosa pentaenoik asit
FAO	:	Gıda ve Tarım Örgütü
g	:	Gram
GPx	:	Glutasyon peroksidaz
GR	:	Glutasyon redüktaz
GSH	:	İndirgenmiş glutasyon
H ₂ S	:	Hidrojen sülfür
JICA	:	Japonya Uluslararası İşbirliği Ajansı
KCl	:	Potasyum chloride
kg	:	Kilogram
L	:	Litre
LA	:	Laktik asit
LHRA-a	:	Luteinizan hormonu salgılatma hormonu türevi
LPO	:	Lipid peroksidasyonu
MgCl ₂	:	Magnezyum klorür
mL	:	Mililitre
mm	:	Milimetre
mM	:	Milimolar
n-3	:	Çoklu doymamış yağ asitleri

NaCl	:	Sodyum klorür
NaHCO ₃	:	Sodyum bicarbonat
NaH ₂ PO ₄	:	Sodium hidrojen fosfat
PG	:	Propilen glikol
pH	:	Potansiyel hidrojen
ppm	:	Milyonda bir
PUFA	:	Çoklu doymamış yağ asitleri
PVP	:	Povidon İyot
RA	:	Rozmarinik asit
ROS	:	Reaktif oksijen türleri
SCA	:	Sperm Class Analyser
SCD	:	Sperm kromatin dağılımı (sperm chromatin dispersion)
sn	:	Saniye
SOD	:	Süperoksit dismutaz
spz	:	Spermatozoa
SUMAE	:	Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü
TA	:	Taurin
T.C.	:	Türkiye Cumhuriyeti
UV	:	Ultraviyole (morötesi) ışık
ÜA	:	Ürik asit
VC	:	Vitamin C
VE	:	Vitamin E
μ	:	Mikron
μm	:	Mikrometre
μL	:	Mikrolitre
%	:	Yüzde
°C	:	Santigrat derece

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Ülkemizde toplam su ürünleri üretimi (ton/yıl)	2
Tablo 2. Kalkan balığının sistematikteki yeri	6
Tablo 3. Kalkan balığı üretim miktarı (ton/yıl).....	9
Tablo 4. Bazı balık türlerinin sperm yoğunlukları	18
Tablo 5. Sperm kriyoprezervasyonu başarıyla yapılan bazı balıklar türleri	24
Tablo 6. Kriyoprezervasyon da kullanılan standart sulandırıcı (KRS)	43
Tablo 7. Çalışmada kullanılan antioksidanlar ve dozları	43
Tablo 8. Karadeniz kalkan balığının spermatolojik özellikleri	47
Tablo 9. CASA ile belirlenen sperm kalite parametreleri.....	47
Tablo 10. Sperm havuzunun spermatolojik parametreleri	48
Tablo 11. Çözdürme sonrası 10. saniyedeki sperm kalite parametreleri	51
Tablo 12. Çözdürme sonrası 60. saniyedeki sperm kalite parametreleri	51
Tablo 13. Uzun süreli depolama sonrası 10. saniyedeki motilite değerleri	52
Tablo 14. Uzun süreli depolama sonrası 60. saniyedeki motilite değerleri	52
Tablo 15. Dondurma/çözdürme sonrası döllenme ve çıkış oranları	53
Tablo 16. Dondurulmuş/çözdürülmüş sperminin DNA hasarı oranları	54

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Karadeniz kalkan balığı.....	7
Şekil 2. Balıklarda olgunlaşma ve gamet oluşumunu belirleyen faktörler.....	16
Şekil 3. Araştırma üniteleri.....	37
Şekil 4. Karadeniz kalkan balığı.....	38
Şekil 5. Sperm kalite parametrelerinin belirlenmesinde kullanılan materyaller.	39
Şekil 6. Kalkan balığından sperm toplama işlemi	40
Şekil 7. Sperm kalite parametre ölçümlerinin gerçekleştirildiği CASA sistemi	41
Şekil 8. Sperm DNA hasar durumu	44
Şekil 9. Yumurta temini için kalkan balığına hormon uygulaması	45
Şekil 10. Kalkan balığından yumurta sağımı.....	46
Şekil 11. Antioksidanlar eklenen Karadeniz kalkan spermi motilite değerleri	50
Şekil 12. CASA’da DNA hasarı analiz örnekleri	55

GİRİŞ

Birleşmiş Milletler Tarım ve Gıda Örgütü (FAO) hesaplamlarına göre yeryüzünde ticareti en fazla yapılan gıda ürünlerinden biriside balık ve diğer su ürünleridir. Su ürünleri üretimi 3,2 milyar insanın ihtiyaç duyduğu hayvansal proteinin % 20'sini karşılamaktadır ve aynı zamanda bu sektörde 800 milyondan fazla insan geçimini de sağlamaktadır. Dünya su ürünleri tüketimi kişi başı yıllık ortalama 20,2 kg a ulaşmıştır. Tüketicinin sağlıklı beslenme duyarlılığının ve ihtiyacının artmasına paralel olarak bu miktarın daha da artması beklenmektedir. Deniz ve iç sulardan avcılık yoluyla bu ihtiyacın karşılanması mümkün olmadığından tüketim artışı ile birlikte dünya genelinde yetiştiricilik yoluyla elde edilen su ürünleri üretimi de hızlı bir artış göstermektedir. Dünyada su ürünleri üretimi; 90,3 milyon tonu avcılıktan ve 87,5 milyon tonu yetiştiricilikten olmak üzere toplamda 177,8 milyon tona (parasal değer olarak 265 milyar ABD \$) ulaşmıştır. Yetiştiricilik üretiminin 33,1 milyon tonu denizde, 54,4 milyon tonu iç sularda gerçekleştirilmektedir (FAO, 2022). Balık avcılığında son yirmi yıldır aynı üretim seviyesi korunmasına karşın, yetiştiricilik üretimi en hızlı gelişen gıda üretim sektörü durumundadır (URL-1).

Türkiye farklı tuzluluk ve sıcaklıklara sahip denizleri ve zengin iç su kaynakları ile su ürünleri yetiştiriciliğinde dikkat çeken ülkeler arasındadır. Türkiye'de su ürünleri üretimi 2021 yılında 799,844 ton olarak gerçekleşmiştir. Bu üretimin 328,158 tonu avcılık, 471,686 tonu ise yetiştiricilik yoluyla elde edilmiştir (Tablo 1). Yetiştiricilik üretimi bir önceki yıla göre % 11,9 oranında artarak 471 bin 686 ton olmuştur (URL-2). Ülkemizde yetiştiricilik üretiminin % 71,1'i (335,644 ton) denizlerde, % 28,9'u (136,042 ton) ise iç sularda yapılmaktadır. İçsulardan yetiştiricilik yoluyla üretilen balıkların % 99,7'lik kısmını alabalık üretimi oluşturmaktadır. Ülkemizde; levrek (155,151ton), çipura (133,476 ton) ve alabalık (167,286 ton) en çok üretimi yapılan türlerdir (URL-2). Yeni türler konusunda yapılan araştırmaların sonucu granyöz, minekop, Karadeniz alabalığı, fangri, minekop, sarıağız, sivriburun karagöz ve trança gibi türlerin üretimi toplamda 10,919 tona ulaşmıştır. Son yıllarda ülkemizde midye üretimine ilgi artmış ve 4,585 ton üretim gerçekleşmiştir. Orkinos balığının ağ kafeslerde büyütülmesine dayalı yetiştiricilik modelinde ise üretim 4,952 ton/yıl'a yükselmiştir (URL-3).

Tablo 1. Ülkemizde toplam su ürünleri üretimi (ton/yıl)

Yıllar	Avcılık		Toplam	Yetiştiricilik		Toplam	Toplam
	Deniz	İçsu		Deniz	İçsu		
2015	397.731	34.176	431.907	138.879	101.455	240.334	672.241
2016	301.464	33.856	335.320	151.794	101.601	253.395	588.715
2017	322.173	32.145	354.318	172.492	104.010	276.502	630.820
2018	283.955	30.139	314.094	209.370	105.167	314.537	628.631
2019	431.572	31.596	463.168	256.930	116.426	373.356	836.524
2020	331.281	33.119	364.400	293.175	128.236	421.411	785.811
2021	295.018	33.140	328.158	335.644	136.042	471.686	799.844

Ülkemizde su ürünleri yetiştiricilik sektöründe üretimi yapılan ve yetiştiricilik için potansiyel türler; gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), aynalı sazan (*Cyprinus carpio*), Nil tilapia (*Oreochromis niloticus*), karabalık (*Clarias lazera*), yayın (*Silurus glanis*), dere alabalığı (*Salmo trutta fario*), kaynak alabalığı (*Salvelinus fontinalis*), büyük benekli dağ alabalığı (*Salmo trutta macrostigma*), mersin balığı (*Acipenser sturio*), kerevit (*Astacus leptodactylus*), sinagrit (*Dentex dentex*), granyöz (*Argyrosomus regius*), minekop (*Umbrina cirrosa*), mırmır (*Lithognathus mormyrus*), sivriburun karagöz (*Diplodus puntazzo*), lahoz (*Epinephelus aeneus*), sarıkuyruk (*Seriola dumerili*), fangri mercan (*Pagrus pagrus*), kırma mercan (*Pagellus erythrinus*), antenli mercan (*Pagrus caeruleostictus*), kırmızı bantlı mercan (*Pagrus auriga*), mavi yüzgeçli orkinos (*Thunnus thynnus*), Egeli (*Royal dentex*), trança (*Dentex gibbosus*), eşkina (*Sciaena umbra*), sargoz (*Diplodus sargus*), akivades (*Tapes decussatus*), kara midye (*Mytilus galloprovincialis*), has kefal (*Mugil cephalus*), Karadeniz alası (*Salmo labrax*), kalkan (*Scophthalmus maximus*), çipura (*Sparus aurata*), levrek (*Dicentrarchus labrax*) ‘dir (URL-4). 2020 yılından beri tüm dünyayı etkisi altına alan Covid-19 pandemisi küresel ölçekte su ürünleri üretimini ve ticaretini olumsuz etkilemiş ve su ürünleri üretiminde düşüş yaşanmıştır. Ancak ülkemizde 2020 yılında su ürünleri yetiştiriciliği bir önceki yıla göre % 12 oranında artmıştır. Bu durum Türkiye’nin güçlü ve gelişime açık bir su ürünleri sektörünün olmasının yanında üretilen ürünlere küresel çapta bir ilgi olduğunu da göstermektedir.

Su ürünleri yetiştiriciliğinde istenen miktarda ve kalitede ürün elde edilmesi; yetiştiriciliği yapılan türün tüm üretim döngüsünün kontrol edilebilmesi, damızlık bireylerin iyi bir genetik yapıya sahip olması, hastalık kontrolü ve bulaşının önlenmesi, öngörülen büyüme performansı için fizyolojik, çevresel, beslenme koşullarının

bilinmesi, üretimin yapıldığı ortama kaliteli ve yeterli su temin edilmesi ile yenilikçi yönetim tekniklerinin uygulanmasına bağlıdır. Bu faktörlerin geliştirilmesi ve uygulanması sayesinde su ürünleri yetiştiriciliği son yıllarda oldukça iyi bir gelişme kaydetmiştir. Biyoteknolojik yöntemlerin akuakültür alanında da etkili bir şekilde kullanılır hale gelmesi sektörün gelişmesine önemli etkileri olmuştur (Şahin, 2003). Su ürünleri yetiştiriciliğinde uygulanan biyoteknolojik yöntemler daha fazla ve arzu edilen özellikte bireyler ile birlikte kaliteli ürün elde etmeye katkı sağlamıştır.

Kaliteli ve üstün özellikli spermin uzun süreli muhafazasına imkan sağlanarak ihtiyaç duyulduğu takdirde kullanıma hazır olması her zaman tercih edilen durum olmuştur. Önemli bir biyoteknolojik uygulama olan sperm kriyoprezervasyonu sayesinde birçok canlının spermi farklı amaçlarla dondurulup muhafaza edilebilmektedir. Kriyoprezervasyon, soyları tükenme tehdidi altında olan türlerin, gametlerini bir gen bankasında muhafaza ederek koruma altına almanın da en iyi yöntemlerinden biridir. Ayrıca genetik manipulasyon ve damızlık seleksiyon çalışmalarını kolaylaştırdığından, yapay üretimi geliştirmek için etkin bir yöntem olarak da tercih edilmektedir (Viveiros vd., 2010). Kültür ortamında yapılan su ürünleri üretiminde senkronizasyonu sağlamak, spermanın verimli kullanımını arttırmak ve genetik varyasyonu korumak için balık sperminin kriyoprezervasyonu son dönemlerde yaygın ve başarılı bir şekilde uygulanmaktadır (Lahnsteiner, 2000a; Cabrita vd., 2010; Kutluyer, 2014).

Sperm kriyoprezervasyonu deniz ve özellikle tatlı su balıklarında uygulanmaktadır. Balıklarda dondurma ve çözündürme sonrası sperm kalitesini artırmaya yönelik çalışmalarda olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Baynes ve Scott, 1987; Chen vd., 2004; Ciereszko vd., 2014). Sperm kriyoprezervasyonu tercih edilen bir uygulama olmasına rağmen, rutin olarak kullanılan prosedürler sperm fonksiyonlarında ciddi zararlara neden olmaktadır. Bu zararlar; soğuk şok, ozmotik stres, hücre içi buz kristali oluşumu, seyrelticiler, kriyoprotektanlar, dengeleme süresi, donma hızı ve çözülme sıcaklıkları, oksidatif stres ve bunların kombinasyonları gibi (Amidi vd., 2016) faktörlerden kaynaklanmaktadır. Bu faktörlerin membran lipid bileşimi, akrozom durumu ve sperm hareketliliği-canlılığında olumsuzluğa; sperm DNA hasarında ise artışa neden olduğu bilinmektedir (Cabrita vd., 2011). Sperm dondurma çözündürme sonrası oluşan hasarın ana nedenleri arasında aşırı reaktif oksijen

türlerinin (ROS) üretimi, antioksidan savunma sistemlerinde değişiklik ve bu koşulların bileşenleri de bulunmaktadır (Felix vd., 2021). Spermin antioksidan kapasitesi lipid peroksidasyonunu önlemede yetersizdir. Bu nedenle kriyoprezervasyonda sulandırıcıya antioksidan ilave edilmesine ihtiyaç vardır. Birçok araştırmacı da, ROS'un spermatozoa üzerindeki olumsuz etkilerini azaltmak için dondurma işleminde antioksidanların kullanımını önermiştir (Kirilova vd., 2015).

Kalkan balığı, Türkiye'deki ekonomik değeri en yüksek olan yassı balık türüdür. Tarım ve Orman Bakanlığı, Türkiye pazarında yüksek talep gören bu türün, azalan doğal stoklarının balıklandırma ile desteklenmesi ve yetiştiricilik sektörüne kazandırılması amaçlarıyla Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne (TAGEM) bağlı Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü'nü (SUMAE) yetiştiricilik çalışmasına yönlendirmiştir. SUMAE'de 1998 yılından beri bu türün üretimi başarılı bir şekilde yapılmaktadır. Kalkan balığının yetiştiricilik tekniklerinin geliştirilmesi ile ilgili yapılan araştırmalarda önemli mesafeler kat edilmiş ve dünyada bu türü üretebilen birkaç ülkeden biri haline gelmiştir. Ülkemizde henüz özel işletmelerde kalkan üretimi başlamamış olsa da yetiştiricilik için en önemli potansiyel türdür.

Kalkan balığının üretim tekniklerinin geliştirilmesi için sperminin dondurularak saklanması oldukça önemlidir. Son yıllarda, çeşitli koşullar ve depolama sürelerinde kalkan balığı spermi kriyoprezervasyonunun sperm hareketliliği, dölleme ve yumurtadan çıkma oranı üzerindeki etkisini değerlendirmek için bir dizi araştırma yapılmıştır (Dreanno vd., 1997; Chereguini vd., 2003; Chen vd., 2004). Kriyoprezerve edilmiş kalkan spermi kullanılarak larva ve yavru kalkan balığının büyüme ve hayatta kalma oranları incelenmiştir (Chereguini vd., 2001). Dreanno vd., (1997) dondurularak saklanan kalkan balığı sperminin dölleme oranının düşük olduğunu bildirmişlerdir. Chereguini vd., (2003) yapmış oldukları çalışmada ise taze ve kriyoprezerve kalkan balığı sperminin aynı dölleme ve yumurtadan çıkma oranlarına sahip olduğu sonucunu bulmuşlardır. Aydın vd., (2021a), kalkan balığı sperminin kriyoprezervasyonunda kriyojenik dondurma prosedürlerinin geliştirilmesi üzerine bir çalışma yürütmüştür. Literatürde kalkan balıklarında sperm dondurma/çözdürme sonrasında sperm kalitesini artırmaya yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu konuyla ilgili kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bu tez çalışmasında Karadeniz kalkan balığının sperminin dondurulmasında kullanılan seyrelticiye ilave edilen farklı dozlardaki antioksidanların çözündürme sonrası sperm kalitesi, dölleme oranı, prelarva çıkış oranı, depolama süresinin motilite üzerine etkileri ve DNA hasarı düzeyi incelenerek kalkan sperm kriyoprezervasyon tekniğinin geliştirilmesi hedeflenmiştir.



1. GENEL BİLGİLER

1.1. Kalkan Balığı

1.1.1. Sistematikteki Yeri

Kalkan balığı on dört aile ve 716 türü içine alan yassı balıklar takımının bir üyesidir. Sistematikteki yeri ile ilgili çeşitli çalışmalar olmasına rağmen isimlendirme konusunda tam bir birliktelik sağlanamamıştır. Son 50 yılda kalkan, literatürde ya *Scophthalmus maximus* (Linnaeus, 1758) ya da *Psetta maxima* (Linnaeus, 1758) olarak anılmaktadır (Tablo 2). Günümüzde bu tür için hala iki jenerik adın kullanıldığı kafa karıştırıcı bir durum vardır (Bailly ve Chanet, 2010).

Tablo 2. Kalkan balığının sistematikteki yeri

Sınıf	:	Kemikli balıklar (<i>Osteichthyes</i>)
Alt sınıf	:	Işın yüzgeçliler (<i>Acanthoptergii</i>)
Bölüm	:	Hakiki kemikli balıklar (<i>Teleostei</i>)
Takım	:	YassıBalıklar (<i>Pleuronectiformes</i>)
Aile	:	Kalkan Balıkları(<i>Scophthalmidae</i>)
Cins	:	<i>Scophthalmus</i> (<i>Psetta</i>)
Tür	:	<i>Scophthalmus maximus</i>
	:	<i>Psetta maxima</i> (Linnaeus,1758)
	:	<i>Psetta maxima maeotica</i>

Karadeniz kalkan balığının Atlantik kalkanından morfolojik olarak vücudunun alt ve üst kısımlarında farklı yoğunluk ve dağılım gösteren kemiksi dikenlerden/çıkıntılardan (tüberküller) dolayı farklılık gösterdiği ancak taksonomik olarak benzer oldukları bildirilmiştir (Suziki vd., 2004). Karadeniz kalkanı, Amoaka vd., (2001) ve Suziki vd., (2004) tarafından *P. maxima* olarak isimlendirilmiştir. Bununla birlikte Karadeniz kalkanının *S. maximus* ile aynı tür içinde değerlendirilmesinin doğru olacağı yaklaşımı benimsenmiştir (Chanet, 2003). Karadeniz’de bu iki alt türün birbirinden ayrılması kolay değildir. Çeşitli kaynaklarda kullanılan *Psetta* ve *Scophthalmus* cins isimlerinin birbirinin sinonimi olarak değerlendirmesinin uygun olacağı bildirilmiştir (Suziki vd., 2004). Karadeniz kalkanının tür ismi tam olarak kesinlik kazanmadığı için, Karadeniz’e kıyısı olan ülkeler ve ülkemizde bu balıkla ilgili yapılan çalışmalarda farklı tür isimleri kullanılması söz konusudur.

1.1.2. Morfolojik Özellikleri

Karadeniz için karakteristik olan kalkan balığı üstten yassı, dairesel bir görünüme sahiptir. Gözler metamorfoz sonrasında vücudun sol tarafında konumlanmıştır. Kalkan balığının vücut rengi griden siyahımsı kahverengine doğru değişiklik göstermekte olup, derisi kalın ve kaygandır. Balığın alt tarafı beyazdır ve bazen kahverengi-siyah lekeler farklı yerlere konumlanmıştır. Kalkan balıklarının çoğunda vücudun çeşitli yerlerine yerleşmiş irili ufaklı koyu kahverengi veya siyahımsı noktalar, halka şeklinde lekeler veya haleler mevcuttur (Şekil 1). Kalkan, bulunduğu ortama göre renk değişimi göstererek kolaylıkla uyum sağlayabilmektedir. Yetişkin bireylerin vücut üzerinde sayıları farklılık gösteren kemiksi dikenler mevcuttur. Yan hat çizgisi çok belirgin olup, gözlerin hizasından başlayarak pektoral yüzgecin bitimine kadar kavisli, sonrasında ise düz bir şekilde devam ederek kuyruk yüzgeci başlangıcında sona erer. Ağız hafif dorsal konumlu olup, çeneler çok sayıda sıra oluşturan dişler ile örtülüdür. Burun delikleri gözlerin önünde yer alır (Zengin, 2000; Samsun, 2004).



Şekil 1. Karadeniz kalkan balığı, *S. maximus*

1.1.3. Dağılımı, Biyoeekolojik ve Üreme Özellikleri

Kalkan balığı tüm Karadeniz’de, Akdeniz’in Kuzey Afrika kıyılarında, Avrupa’nın Atlantik kıyıları, tuzluluğun ‰ 5 olduğu Baltık denizi ve Adriyatik denizine kadar geniş bir alanda dağılım göstermektedir. Kalkan balığı tipik bir dip

balığı olup güçlü bir karnivordur. Kumlu ve çamurlu olan zeminleri daha çok tercih etmektedir fakat taşlık veya çakıllı zeminlerde de rastlanabilmektedir. Kalkan balığının küçük bireyleri yumuşakçalar ve kabuklularla; daha büyükleri ise diğer balıklarla beslenirler. Mezgit, kaya balıkları, barbun, çaça ve hamsi gibi birçok demersal ve pelajik balık türleri ana besin kaynağını oluşturmaktadır. Kalkan balığının beslenme faaliyeti üreme döneminde düşmesiyle birlikte özellikle sonbaharda artarak yıl boyu devam etmektedir. Büyük kalkanlar, mevsime ve genel kondisyon durumlarına bağlı olarak, Karadeniz’de bütün kıta sahanlığından, dip yaşamın sınırı olan H₂S tabakasına kadar yayılım gösterirler. Kalkan balığı bölgesel göçlerde yapmaktadır. Göçleri popülasyon büyüklükleri, üreme ve beslenme davranışları ile yakından ilişkilidir (Amoaka vd., 2001; Zengin vd., 2007).

Kalkan balıkları üremek için ilkbaharda kıyı şeridinde doğru göç yaparlar. Bu zamanda bireyler genel olarak 30-40 m ve daha sığ sularda daha fazla bulunmaktadır. Kalkan, üreme faaliyetlerin sona ermesiyle tekrar derin sulara doğru hareket ederler. Kalkan balıklarının yumurtlaması su sıcaklığına bağlı olarak Nisan-Haziran ayları arasında gerçekleşmekte ve Mayıs ayında yoğunlaşmaktadır. Üreme sonrasında Temmuz ve Ağustos aylarında 50 m’den daha derinlere doğru tekrar göç ederler (Genç vd., 1998). Yapılan çalışmalarda kalkan balığının ilk eşeysel olgunluğa 2 yaşında ulaşabildiği, ancak eşeysel olgunluğun daha çok 3 ve 5 yaşlarında meydana geldiği belirlenmiştir. Genç vd., (1998)’ne göre ise Türkiye kıyılarında dişi balıklar 4 yaşında Mart-Haziran aylarında üremeye başlamaktadırlar.

Kalkan balığının erkek bireylerinden sperm temini miktar olarak farklılık oluşturmakla birlikte altı ay (Şubat-Temmuz) sürebilmektedir (Aydın vd., 2021b). Dişilerin gonad gelişimi mevsimsel şartlara bağlı olmakla birlikte Mart ayı sonunda başlamaktadır. Kuluçkahane ortamında yumurta alımı bir aydan fazla sürebilmektedir (Aydın ve Şahin, 2011). Kalkan balıkları üreme döneminde çok defada yumurta bırakan bir türdür. Ovaryumlarda üreme mevsiminde farklı çaplarda yumurtaya rastlanabilmektedir. Yumurtlama sıklığı doğada su sıcaklığı ve gün uzunluğunun etkisine göre 10 hafta sürebilmektedir (Mc Evoy, 1992). Atlantik ergin bireyleri 3,4-4,2 milyon yumurta verirken (Jones, 1974) Karadeniz’de yumurta verimi 3-13 milyon arasında değişmektedir (Samsun, 2004). Kuluçkahane kökenli kalkan balığının yumurta çapları 1,02 ile 1,15 arasında değişim göstermektedir (Polat, 2011).

1.1.4. Dünyada Kalkan Balığı Yetiştiriciliği

Kalkan balığı hızlı büyüme oranı, yüksek yem dönüşüm verimliliği, istenilen hayatta kalma performansı, hastalıklara karşı direnç, su kalitesi varyasyonlarına yüksek tolerans ve agresif olmayan davranışlar gibi yoğun ticari su ürünleri üretimini kolaylaştıran yeteneklere sahiptir (Lei ve Liu 2010).

Kalkan balığı yetiştiriciliği çalışmaları 1970'lerde İngiltere'de ve ardından Fransa ve İspanya'da başlamıştır. İspanya Avrupa'da 1990'ların başında kalkan balığı yavru üretim tekniklerinin gelişmesi, üretim miktarı ve işletme sayısının oldukça artmasını sağlamıştır. İspanya'nın kuzey Atlantik kıyılarındaki Galicia bölgesi kalkan balığı yetiştiriciliğinin en yoğun yapıldığı bölgedir. Yıl boyunca uygun su sıcaklığına sahip olan bu bölge sayesinde İspanya 90'lı yıllardan günümüze kadar kalkan balığı yetiştiriciliğinde merkez haline gelmiştir. Bu bölgedeki korunaklı koylarda kafes sitemlerinde de kalkan yetiştirilebilmektedir. Galicia kıyıları sadece İspanya'nın değil tüm Avrupa'nın en önemli kalkan balığı üretim bölgesidir (Polat, 2011). Kalkan balığının son yıllarda sahip olduğu yetiştiricilik özellikleri ve ticari öneminden dolayı Çin ve Güney Kore'de, bu ülkeler için egzotik bir tür olmasına rağmen, kapalı ve açık sistemlerde başarılı bir şekilde üretilmektedir. Günümüzde kalkan hızlı büyüme, düşük sıcaklıklara dayanıklılık ve politrofi gibi çeşitli avantajları nedeniyle Çin'de yetiştirilen en yaygın ticari deniz balığı türlerinden biri olmuştur (Zhang vd., 2017). Kalkan balığı Danimarka, Fransa, Almanya, İzlanda, Hollanda, İngiltere gibi ülkelerde de üretiliyor olsa da bu durum istatistiki verilere yansımamaktadır. Çin dünyada 66,300 ton/yıl (Tablo 3) üretimle en fazla üretim yapan ülke konumundadır (URL-5).

Tablo 3. Kalkan balığı üretim miktarı (ton/yıl)

Ülke	2019	2018	2017	2016	2015	2014
Çin	66300	60000	45500	49500	59000	64000
İspanya	8011	7995	8771	7306	7464	7767
Portekiz	3297	2582	2745	2388	2302	3588

Kültür ortamında üretilen kalkanlarının çoğu günümüzde üretici ülkelerde tüketilmektedir. İspanya'da, üretimin yaklaşık yüzde 75'i iç piyasada tüketilmektedir; geri kalanı Fransa, İtalya ve Almanya'ya ihraç edilmektedir. Ürün genellikle taze ve bütün olarak satılır. Avrupa'da kültür kalkan balığı pazarının belirli bir düzenlemesi bulunmamaktadır ve AB ülkeleri içinde ticarete herhangi bir sınırlama, minimum

boyut ve sabit fiyat uygulaması yoktur. Üretilen kalkan balıkları daha önceleri 1,5-2,0 kg arasında talep edilirken günümüzde daha küçük boyutlarda da tüketiciler tarafından tercih edilmektedir. Şu anda kalkan balığı 0,7 kg ile 2,0 kg arasında hasat edilip pazara sunulmaktadır. Kalkan balığı yaygın olarak karada kurulan işletmelerde, pompalar vasıtasıyla denizden su alınan tanklarda (25-100 m³) üretilmektedir. Bu tanklarda oksijen doygunluğunu korumak için havalandırma sistemleri de kullanılmaktadır. Besleme, elle veya otomatik olarak verilen ekstrüde peletlerle yapılmaktadır. Deniz dalgalarından korunaklı koylarda düztabanlı çelik kafeslerde de üretim yapılmaktadır. Kalkan balığı yetiştiriciliğinde verimliliği belirleyen unsurların başında sıcaklık ve yavru kalitesi gelmektedir. Kalkan kültürü için en uygun sıcaklık aralığı 11-23 °C iken, besleme için optimum sıcaklık 14-18 °C arasındadır.

Kalkan balığı yetiştiriciliğinde yeni yetiştirme ünitelerinin inşası ve mevcut çiftliklerin kapasitesinin artırılmasıyla endüstrinin gelecekte belirgin bir gelişme görmesi muhtemeldir. Bununla birlikte, bu türün yetiştiricilik tekniklerinin geliştirilmesi (larva yaşam oranlarının artırılması, hastalıkların önlenmesi ve kontrolü, stok izleme ve genetik iyileştirme) için alanda sürekli araştırma ve geliştirme çabası gereklidir (FAO, 2009).

1.1.5. Karadeniz’de Kalkan Balığı Yetiştiriciliği

Karadeniz’de kalkan balığı yetiştiriciliği ile ilgili ilk çalışmalar Rusya ve Ukrayna’da 1990’da başlamıştır. Anapa bölgesinde bulunan işletmeler devlet destekli olarak faaliyetini sürdürmüşlerdir. Bu işletmelerde yapılan üretim çalışmalarının temel amacı doğal stokların desteklenmesi için yavru üretimi olmuştur (Maslova, 2002).

Türkiye’de kalkan balığı yetiştiriciliği çalışmaları Japonya Uluslararası İşbirliği Ajansı (JICA) ve Tarım ve Köyişleri Bakanlığı ortak çalışmasıyla Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü’nde (SUMAE) 1997 yılında “Karadeniz’de Kültür Balıkçılığının Geliştirilmesi” projesiyle başlamıştır. Bu projeyle kalkan balığı yavru üretim tekniklerinin geliştirilmesi, üretim tekniğinin özel sektöre aktarılması ve doğal stokların balıklandırma ile desteklenmesi hedeflenmiştir. JICA işbirliği ile yürütülen proje 2007 yılında tamamlanmış ve bu yıldan itibaren çalışmalar TAGEM destekli olarak yürütülmüştür. Kalkan balığı yetiştiricilik tekniklerinin geliştirilmesine yönelik birçok lisansüstü tezi yapılmıştır. Üretilen balıkların bir kısmı

stokların desteklenmesi için markalanarak doğaya bırakılmıştır. Ayrıca kalkan balığı üretiminin özel sektöre kazandırılması amacıyla deniz balıkları üreticilerine yavru ve döllenen yumurta temin edilerek deneme üretimi yapmaları sağlanmıştır. Yine bu proje kapsamında bilimsel araştırmalar yapılması amacıyla üniversitelerin ilgili fakültelerine kalkan balığı yavruları verilmiştir. SUMAE, 1997 yılından beri üretim miktarlarında farklılıklar olsa da hemen hemen her yıl düzenli olarak üretim gerçekleştirmeyi başarmıştır.

1.1.6. Kalkan Balığı Üretim Tekniği

Kalkan balığı üretiminde damızlıklar doğadan veya kültür ortamında oluşturulan stoktan temin edilebilmektedir. Kuluçkahanelerde istenilen miktarda ve kalitede juvenil elde edilebilmek için döllenen yumurtayı doğal döllenen marifetiyle elde etmek mümkün değildir. Bu nedenle döllenen yumurta temini için sağım yöntemini kullanmak gerekir (Hara vd., 2002).

Kuluçkahanelerde, istenilen zamanda ve miktarda yumurta alımını sağlamak için hormon uygulaması sıklıkla tercih edilmektedir. Hormon olarak LHRA-a (Luteinizing Hormone Releasing Hormone-Analogue) kullanımı oldukça yaygındır. Hormon uygun oosit çapına sahip (400 µm) bireylere uygulanır ve genellikle 100 µg/kg doz kullanılır (Polat vd., 2018). Balıklardan yumurta alımı hormon uygulamasından yaklaşık bir hafta sonra gerçekleşir (Hara vd., 2002; Polat, 2011). Kalkan balığında yumurta verimi (fekondite) birçok balık türüne göre çok yüksektir. Atlantik kalkan balığında 0,5-10 milyon adet/birey iken (Imslund vd., 2001) Karadeniz kalkan balığında fekondite 0,7-4 milyon adet/birey olarak bildirilmiştir (Aydın ve Şahin 2011). Doğal ve kuluçkahane kökenli kalkan balığının üreme periyodunda (Nisan-Haziran), toplam yumurta verimliliği, döllenen ve çıkış oranları arasında farklılık yoktur (Aydın vd., 2020).

Kuluçkahane de sağım yöntemiyle elde edilen yumurtaların dölleme işlemi en az iki erkeğin spermi kullanılarak gerçekleştirilir. Eğer balıklandırma amacıyla üretim gerçekleştirilecek ise döllemede kullanılacak erkek sayısı daha da artırılabilir. Dölleme işleminin ardından belli bir süre beklendikten sonra yumurtalar inkübasyon suyu ile yıkanarak üzerindeki üre, sperm ve vücut sıvısı uzaklaştırılır. Ardından 50 ppm iyodin ile 5 dakika dezenfeksiyon işlemi gerçekleştirilir. Döllenen yumurtaların

inkübasyonu 14 °C'de gerçekleştirilir. Pre-larva çıkışı ise yaklaşık 5 gün içerisinde tamamlanır (Polat vd., 2018).

Yumurtadan yeni çıkmış larvalar büyütme tanklarına 20-30 adet/litre yoğunluğunda olacak şekilde stoklanırlar. Büyütme taklarında su kalitesi çok önemlidir bu nedenle kullanılan su 5 µ'luk filtreden geçirildikten sonra ultraviyole lambalar (UV) ile sterilize edilmektedir. Larvaların beslenmesine 2. günden sonra başlanmakta ve besin olarak da rotifer (*Brachionus sp.*) kullanılmaktadır. Larvaların tank ortamında besin ile kolay karşılaşabilmesi için rotifer yoğunluğu 10 adet/mL olacak şekilde ayarlanır. Rotifer ile beslenme 30. güne kadar sürdürülür ayrıca 10. günden 45. güne kadar *Artemia* ile ve daha sonra günlerde ticari toz yemler ile beslenmektedir (Şahin, 2001).

Kalkan balığı larval aşamadan yavru aşamasına geçişte morfolojik olarak önemli değişimler geçirir. Bu değişim yaklaşık 70 gün (16-19 °C'de) sürmekte ve üç safhaya ayrılmaktadır. Bunlardan ilki, yumurtadan çıkıştan sonraki 0-2 gün önlarva safhasıdır. Bu dönemde yumurtadan henüz yeni çıkmış larvanın boyu 2,5 mm olup gözleri renklenmemiş, ağız açılmamış ve anüs oluşmamıştır. Larvalar genellikle su yüzeyine yakın bölgede kümelenerek dururlar. Besin kesesinin tüketimine bağlı olarak larvalar hızlı bir şekilde büyümeye devam ederler. İkinci safha post larva safhası diye adlandırılır ve 3-29. günler arasında devam eder. Larvaların ağız ve anüsün açılması, gözlerinin renklenmesi üçüncü günde gerçekleşmektedir. İlk yem alımı 4. Günde başlar dorsal ve anal yüzgeç ışınları yirmi beşinci günde tamamlanır. Kalkan balığı larvalarında sık olmamakla beraber 25. günden sonra büyük larvaların küçük olanlara saldırdığı gözlenebilir. Üçüncü safha ise 30-70. günler arası olup bu safhada larval evreden yavru evresine geçiş dönemidir. Bu safhada göz göçü başlamakta, balık tank zeminine doğru yönelmektedir. Kalkan balıklarının yaşama oranı 0-40. günlerde yaklaşık % 10, 40-110 günlerde ise % 75'in üstündedir. Kalkan yavrularında renk bozukluğu, gözün göç edememesi, solungaç kapağının tamamlanmaması gibi anormallikler de görülmektedir (Çiftci vd., 2002).

Kalkan balıklarının yetiştiriciliği ön büyütme ve büyütme olarak ikiye döneme ayrılmaktadır. Kuluçkahanede yaklaşık 10 g ağırlığa ulaşan (4-5 ayda) balıklar, 50-60 g ağırlığa ulaşacakları 4-5 aylık bir dönem için ön büyütme tabi tutulmaktadırlar. Ön büyütmede stok yoğunluğu 10 kg/m² olarak belirlenirken bu stok

yoğunluğunun üzerine de çıkılabilmektedir. Ön büyütme neticesinde ilk boylama yapılmaktadır. Yine ön büyütme sonrasında balıklar hastalıklara karşı aşılanmaktadır. Balıkların büyümesi su sıcaklığı başta olmak üzere çevre parametrelere ve yavru kalitesine bağlı olarak değişim göstermektedir. Yaklaşık olarak dokuz ay süren ön büyütmede balıklar 200 g ağırlığa ulaşabilmektedirler. Çevresel parametreler istenilen şekilde olduğunda yaşama oranı % 75-85 arasında değişebilmektedir. Bu dönemde, yem değerlendirme oranı 0,8 civarındadır (Person Le-Ruyet, 2002).

Kalkan balıklarının büyütme döneminde karaya kurulu açık veya kapalı devre yetiştiricilik sistemleri kullanılmaktadır. Kalkan balığı yetiştiriciliğinde yüzer kafes sistemlerinde üretim modeli Karadeniz şartlarında denenmiş ancak yaz aylarında deniz suyu sıcaklığının 20 °C'nin üzerine çıkmasından dolayı uygun olmadığı belirlenmiştir (Aksungur vd., 2003). Kalkan balıkları tank tabanını kullandıkları ve genellikle birbiri üzerinde bulunmaları durumundan dolayı yüksek yoğunlukta stoklanabilirler. Yetiştiricilik sisteminde stok yoğunluğu 300 g balıklar için 30-35 kg/m², 750 g ve daha ağır balıklar için 45 kg/m²'ye kadar çıkılabilmektedir. Büyütme döneminde değerlendirme oranı 1,2-1,3 arasındadır. Su sıcaklığı kalkan balığı yetiştiriciliğinde önemli bir faktördür, 14-18 °C'de 3 yılda 2-2,5 kg ağırlık elde edilirken, 9-19 °C' de 3 yılda 1-1,5 kg ağırlığa ulaşılmaktadır.

Kalkan balıklarında büyümede bireysel farklılıklar görülmektedir, bu farklılıklar sadece yetiştiricilik şartlarından değil; cinsiyet, bireysel büyüme gibi farklılıklardan da kaynaklanmaktadır. Aynı yaştaki Kalkan balıklarının dişileri erkeklerinden daha büyüktür. Kalkan balıkları için yüksek protein düşük yağ içerikli beyaz balık unundan elde edilmiş yüzer pelet yemlerin kullanılması da büyümeyi olumlu etkilemektedir (Person Le-Ruyet 2002).

Kalkan balığı yetiştiriciliğinde triploid balık üretimi gibi biyoeekolojik uygulamalar da yapılmaktadır. Bu uygulamanın amacı et kalitesi yüksek balıklar elde etmektir. Karadeniz kalkan balığında gerçekleştirilen soğuk şok ile triploid birey elde etme denemelerinde % 95,9 oranında başarı elde edilmiştir. Denemelerinde 16 ve 21 °C'de yetiştirilen diploid ve triploid gruplarının ortalama ağırlığı ve boylarının, deneyin sonunda benzer olduğu belirlenmiştir (Aydın vd., 2022).

Kalkan balığı damızlık stok yönetiminde fotoperiyot uygulamasına yoğun yetiştiricilik faaliyetinde ihtiyaç duyulmaktadır. Sabit su sıcaklığı ve yerel gün

uzunluğundaki değişime göre yapılan düzenleme ile yıl içerisinde farklı dönemlerde gamet eldesi mümkündür. Karadeniz kalkan balığında yapılan çalışmada fotoperiyot uygulaması ile doğal üreme dönemi olan Mayıs ayından 3 ay erken dönemde istenilen miktar ve kalitede yumurta ve sperm elde edilmiştir (Polat vd., 2021). Sperm kalitesi ve süreklilik arzeden bir şekilde sperm temin edilebilmesi tüm balıklarda olduğu gibi kalkan balıklarında da kaliteli yavru üretimi için önem arz etmektedir.

1.2. Balık Sperminin Özellikleri

Balıklarda üreme sistemi genel olarak gonad ve buna bağlı olan sistemlerden meydana gelmektedir. Erkek balıkların gonadları testis olarak adlandırılmaktadır ve testisler vücut boşluğunda çift olarak yer alırlar. Erkek balıklarda spermatozoalar spermatogonia olarak adlandırılan hücrelerden oluşur ve bu hücrelerin spermatozola dönüşüm zincirine ise spermatogenesis denir (Demir, 1992). Spermatogenesisler ard arda tekrarlanan mitotik bölünmeler meydana gelir daha sonra mayaz bölünmeye uğrayan spermatosidler metamorfoz geçirerek spermatozoalar belirgenleşmeye başlar ve sperm olarak adlandırılır (Evans, 1998).

Balıklarda spermatozoanın ana görevi, dış ortamda (denizde veya tatlı suda) yüzerek erkek genomunu dişinin bırakmış olduğu yumurtaya iletmektir. Başarılı bir döllenme için spermatozoanın yumurtaya ulaşması ve yumurtaya nüfuz etmesi gerekir. Bu nedenle, balık spermatozoasının fizyolojik aktivitesinin çoğu motilite odaklıdır. Spermatozoanın en son olgunlaşması testis kanallarında ve dış ortamda gerçekleşebilir. Motilitenin nihai olarak gerçekleşmesi, ortamın ozmotik durumuna, pH, K^+ veya Ca^{2+} gibi inorganik iyonların konsantrasyonundaki değişikliğe bağlıdır. Yumurtadan gelen kimyasal uyarıcılarda spermatozoanın hareketliliğini arttırmada rol oynayabilmektedir (Kinsey ve ark. 2007).

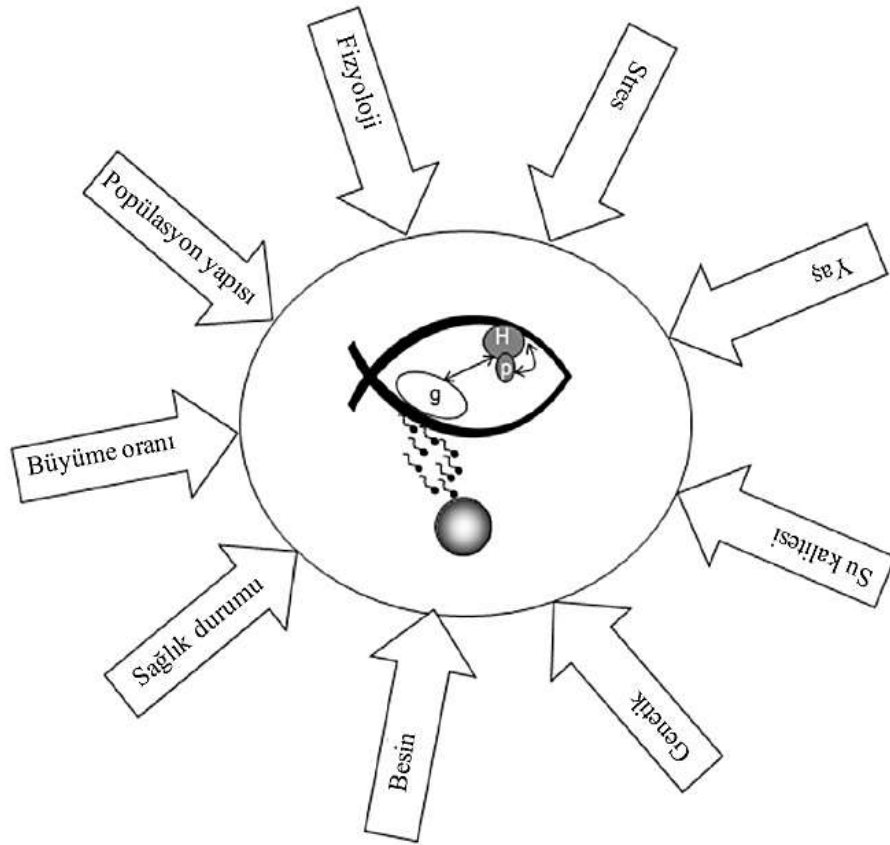
Balık sperminin fizyolojik ve morfolojik özellikleri türlere göre değişiklik gösterebilmektedir. Teleost balıkların sperm hücresi baş, mitokondriye sahip gövde ve tek kamçılı bir kuyruktan oluşmaktadır. Spermin baş kısmı genetik materyali taşıyan DNA'yı ve başın çoğunluğunu kaplayan nükleusu içerir. Spermin baş kısmını adeta kep gibi saran ve içerisinde spermatozoonun, yumurta hücre duvarını geçmesi için gerekli enzimleri içeren akrozom bulunur. Yumurtadan içeri giren sperm DNA materyali, dışıdan gelen ve yumurtada bulunan DNA materyali ile birleşerek $2n$ sayıda

DNA oluştururlar ve daha sonra hücreler bölünerek çoğalmaya başlarlar. Teleost balıklarda spermin baş kısmı 2-4  m boyutlarında olmakla birlikte spermin toplam boyuna oranla oldukça küçüktür. Kuyruk kısmın uzunluğu ise genellikle balıklarda 25–36  m arasında değişim göstermektedir (Akhter, 2011). Gövde, boyun ve birleştirici kısımlar olmak üzere ikiye ayrılır ve çok kısadır. Gövde aynı zamanda mitokondriyi barındırmaktadır. Mitokondri kuyruk hareketinin sağlanması enerji kaynağı olarak görev yapmaktadır. Spermatozoa'nın gövde kısmı (orta kısmı) dış döllenme görülen türlerde kısa, i  döllenme görülen türlerde ise daha uzundur. Bu kısım düzenli olmayan asimetrik yapıdadır. Kuyruk uzun ana parça ve kısa son parçadan oluşmaktadır. Döllenmenin gerçekleşmesi için hareketlilik gerekli bir özelliktir. Kuyruk, kıvrımlı ileri doğru hareket ile spermatozoanın ilerlemesini sa lar (Cosson, 2019).

1.3. Balıklarda Sperm Kalitesi

Sperm kalitesi öncelikle bir yumurtayı dölleme ve sonuç olarak normal bir embriyonun gelişmesine izin verme yeteneği olarak tanımlanır. Yetiştiriciliği yapılan türlerin çoğu dış döllenme ile  o alırlar: sperm suya bırakılır ve aktif hale gelen sperm suya bırakılmış yumurtalara ulaşarak d llemeyi gerçekleştirir. Döllenme başarısı ve elde edilecek larvaların hayatta kalma oranları  zeinde sadece yumurta kalitesi değil sperm kalitesi de önemli bir etkidir. Kültürü yapılan türlerin üretim başarısının elde edilen yavru kalitesi ile doğrudan ilişkilidir. Kaliteli yavru üretimi için spermin miktarı, yoğunluğu, hareketliliği gibi etmenler önem arz etmektedir. Ticari kuluçkahanelerde damızlık sto undan elde edilen sperm, hem miktar hem de kalite açısından çoğu zaman yetersiz kalmakta ve suni döllenme arzu edilen şekilde gerçekleşememektedir (Rurangwa vd., 2004). Balıklarda  reme başarısını çok sayıda faktör etkilemektedir (şekil 2; Valdebenito vd., 2015).

Erkeklerde, sperm miktarı (hacim ve konsantrasyon) ve kalitesi (hareketlilik, seminal plazma pH'sı, zar bileşimi ve stabilitesi ve DNA bütünlüğü) hem doğal hem de suni döllenmede döllenme ve üreme başarısını belirleyebilir. Seminal plazmanın pH'sı, ozmolalitesi ve bileşimi (iyonlar, lipidler, protein) ile enzimatik ve proteolitik aktivite, sperm olgunlaşmasını etkileyen spesifik biyobelirteçlerdir ve spermin yumurtaları dölleme yeteneği ile bağlantılıdır (Kowalski ve Cejko, 2019).



H: hipotalamus, p: hipofiz bezi, g: gonad

Şekil 2. Balıklarda olgunlaşma ve gamet oluşumunu belirleyen faktörler.

Sperm kalitesini etkileyen başlıca faktörler, hem doğal hem de antropojenik genetik, biyoloji ve çevresel etkilerdir. Ayrıca son zamanlarda küresel ısınmadan kaynaklı iklim değişikliğinin neden olduğu sıcaklık artışlarının da sperm kalitesi üzerindeki etkileri balık popülasyonlarının üremesi bağlamında tartışılmaktadır (Fenkes vd., 2017). Ağır metaller (civa ve kadmiyum iyonları) sperm hareketliliğini, membran ve DNA bütünlüğünü ve dölleme yeteneğini bozmaktadır. Ayrıca, herbisitler sperm motilitesi ve konsantrasyonu dahil olmak üzere sperm kalitesini düşürerek balıkların üreme potansiyelinde bir azalmaya yol açar (Rocha vd., 2018).

Genetik faktörler arasında akrabalı yetiştirme sperm kalitesini etkileyen en yaygın faktördür ve sperm kalitesinde düşüşe neden olur, bu etki yaşlanma ile daha belirgin olabilir (Langen vd., 2017). Balığın yaşı da sperm kalitesini belirleyen önemli faktörler arasındadır. Genel olarak, yakın zamanda gökkuşağı alabalığı için bildirildiği gibi, yüksek düzeyde oksidatif stresin eşlik ettiği yaşlanma sürecinden dolayı yaşlı erkekler için daha düşük kalite parametreleri kaydedilmektedir (Risopatrón vd., 2018).

Sperm kalitesi üzerinde etkili olan ve üreme fizyolojisini etkileyen biyotik ve abiyotik faktörler de mevcuttur. Balıkların beslenmeleri, besin kalitesi, erkek balıkların büyütülme ortamı ve su sıcaklığı gibi birçok dış etken sperm kalitesini etkilemektedir. Balıkların yetiştirilmesi ve üremelerinin kontrol edilmesiyle ilgili faaliyetlerin de sperm kalitesi üzerinde derin etkileri vardır. Başlıcaları; evcilleştirme, beslenme, hormonal uyarım, sperm toplama gibi faaliyetlerdir. Yetiştiricilik koşulları altında balıkların üremesi genellikle ciddi şekilde bozulur ve üreme davranışının olmaması, spermatogenez ve sperm olgunlaşmasında bozulmalar, düşük ve değişken kaliteli sperma üretimine yol açar (Mylonas vd., 2017). Genellikle, doğadan yakalanan erkekler kültür ortamındaki bireyler ile kıyaslandığında daha yüksek kaliteli spermatozoaya sahiptirler (Locatello vd., 2018).

Kültür ortamında erkek bireylerin düzenli ve kaliteli yemlerle beslenmesi, sperm kalitesini artırarak daha kaliteli larvaların elde edilmesini sağlamaktadır. Özellikle çoklu doymamış yağ asitleri (Poly Unsaturated Fatty Acids, PUFA) içinde yer alan DHA ve EPA ve n-3 serisi yağ asitleri (linolenik, stearidonik, dokosapentaenoik asitler), döl verimi ve kalitesi üzerinde etkili olmaktadır. Spermden bulunan yağ asitleri kompozisyonu ve miktarı besin maddelerindeki yağ asitleri kompozisyonuna bağlıdır (Huang vd., 2010; Harlıoğlu ve Kutluyer, 2011).

Sperm kalitesindeki farklılıklar bireyler arasında olabileceği gibi aynı bireyin farklı dönemlerde alınan spermleri arasında da gözlenebilir. Balıkların ürettikleri sperm kalitesi ve miktarı türden türe farklılık göstermektedir. Yılan balığından sperm çok zor elde edilir ve çoğunlukla hormon uygulamasına ihtiyaç duyulur. Kalkan, sarıkuyruk ve pisi gibi balıklardan yetiştiricilik ortamlarında çok az miktarda (1 mL'den az) sperm alınabilmektedir (Suquet vd., 2000). Bununla birlikte, sperm miktarı gökkuşağı alabalıklarında 19,6 mL, sibiryas mersin balıklarında 295 mL'ye kadar ulaşabilmektedir (Glogowski vd., 2002). Üreme, su ürünleri üretiminde önemli bir darboğaz olduğundan, sperm kalitesinin değerlendirilmesi akuakültür uygulamasında hayati bir rol oynar ve çoğu zaman işletmenin kazancını belirler. Ayrıca sperm kalitesinin tahmini; yüksek kaliteli spermin gerekli olduğu nesli tükenmekte olan türlerin üretim çalışmaları ve gen bankacılığında başarılı bir kriyoprezervasyon gerçekleştirmek için temel bir araçtır. Bu eylemler, özellikle nesli tehlike altında olan türlerin korunması için çok önemlidir (Kowalski ve Cejko, 2019).

1.3.1. Spermatokrit Oranı ve Sperm Yoğunluğu

Son dönemlerde yapılan çalışmalar sperm konsantrasyonunun sperm kriyoprezervasyon başarısını önemli ölçüde etkilediğini açıkça göstermiştir. Bu nedenle, başarılı balık spermi kriyoprezervasyon prosedürlerinin geliştirilmesi ve uygulanması için doğru sperm konsantrasyonu ölçümleri kritik öneme sahiptir (Judycka vd., 2018). Kalkan balığında sperma yoğunluğu ile spermatokrit oranı arasında bir ilişki söz konusu değildir. Kalkan balığında spermatozoa konsantrasyonu Sibirya mersin balığı ve tilapia dışındaki balıklarla karşılaştırıldığında, düşüktür (Tablo 4) (Suquet vd., 1994).

Tablo 4. Bazı balık türlerinin sperm yoğunlukları

Tür	Sperm yoğunluğu ($\times 10^9$ spz/mL)	Araştırmacı
Kalkan	1,8-4,2	Aydın vd., 2021
Atlantik Halibut	11,9-37,2	Suquet vd., 1994
Levrek	10-40	Suquet vd., 1994
Çipura	7,06	Engin, 2012
Tilapia	0,8	Chao vd., 1987
Sibirya Mersini	0,5	Gallis vd., 1991
Atlantik Somonu	3,5-17,9	Aas vd., 1991
Gökkuşağı Alabalığı	1,9-20,6	Ciereszko vd., 1993

Spermatokrit oranının belirlenmesi amacıyla balıktan elde edilen sperm örneği (sperm hacmi) 10 dk süre ile 10.000 devirde mikrotüpler içinde santrifüjlenir. Santrifüj sonrası spermin sperm sıvısından ayrılması sağlanmış olur. Spermatokrit, hücre hacminin toplam sperm hacmine oranı $\times 100$ olarak ifade edilir. Bu parametre aynı zamanda hücre yoğunluğunun doğrudan bir indekssidir. Suquet vd., (1992) Atlantik kalkan balığında yapmış oldukları çalışmada spermatokrit oranını % $40,0 \pm 2,8$ olarak bulmuştur. Aydın vd., (2021)'de kuluçkahane kökenli Karadeniz kalkan balığında spermatokrit oranını Nisan ayında % 43,2 olarak bildirmişlerdir. Karadeniz kalkan balığında fotoperiyot yöntemi uygulanarak üreme mevsiminden yaklaşık üç ay öncesinde elde edilen sperm ile yapılan çalışmada spermatokrit oranı % $41,7 \pm 4,42$ bulunmuştur (Polat vd., 2021). Spermatokrit oranı; Atlantik halibutda % 47-100, levrekte % 65-90 arasında, cod balığında % $59,4 \pm 9,7$ olarak belirlenmiştir. Yetiştiriciliği yaygın olan gökkuşağı alabalığında ise bu oran en yüksek % $25,8 \pm 3,1$ bulunmuştur (Suquet vd., 1994).

Seminal sıvıdaki spermatozoa yoğunluğu, balıklarda sperm kalitesinin değerlendirilmesi için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Balıklarda spermatozoa yoğunluğunun (sperm hücreleri/mL) belirlenmesi için standart yöntem, hemositometre veya benzer yöntemlerdir (Engin, 2012). Spermatozoa yoğunluğu üreme mevsimi süresince düzenli bir azalma eğilimi göstermektedir. Ayrıca balığın yaşına bağlı olarak da spermatozoa yoğunluğunda azalma olmaktadır (Büyükhatipoğlu ve Holtz, 1984).

1.3.2. pH ve Ozmolarite

pH ve ozmotik basınç spermin aktivasyonunu belirleyen en önemli faktörlerdir. Bazı türlerde ozmolarite, sıcaklık, pH veya aktivasyon çözeltisi bileşiminden bağımsız olarak bir motilite tetikleyicisi olarak değerlendirilmektedir.

Spermin balık vücudundan çıkışı sonra pH'daki değişiklikler bazı türlerde sperm hareketlilik aktivasyonunu tetikler. Gonadlarda hareketsiz olan sperm dışarı bırakıldığında ortam pH'sına bağlı olarak dinein motor protein aktif hale gelir ve motiliteyi başlatır. Balıklarda da diğer türlerde olduğu gibi spermin pH'sının bilinmesi sperme uygulanacak işlemler açısından oldukça önemlidir. Balıklarda sperm pH'sı genel olarak 5,5 ile 9,5 arasında geniş bir değişim göstermektedir (Cosson, 2004).

Sperm hareketliliğinin başlangıcını sağlayan en önemli faktörlerden biri ozmotik basınçtaki değişimlerdir. Motilite çoğu balıkta dış ortamın ozmolaritesine bağlıdır. Hücre içinde oluşan iyon konsantrasyonu değişimi dışarıdaki ozmotik basınç etkisiyle şişme ya da daralmaya neden olurken çoğu türde özellikle teleost ve cyprinidlerde sperm motilitesini düzenlemektedir (Cabrita vd., 2009). Tatlı su ve deniz türlerinde sperm aktivasyonu, spermatozoanın sırasıyla hipotonik veya hipertonik ortam ile temas etmesiyle meydana gelir. Deniz balıklarının spermalarının hareketliliği tatlı su balıklarına göre daha geniş ozmotik basınç değişim sınırları içinde meydana gelir.

1.3.3. Sperm Motilitesi

Balıklarda sperm kalitesini değerlendirmede sperm motilitesi en önemli biyobelirteçtir. Motilite ve dölleme kapasitesi arasında yüksek bir korelasyon vardır (Lahnsteiner, 2000b). Ancak motilite tek başına spermin gerçek durumunu göstermeyebilir, sadece bazı uygulamaların etkisi veya spermaların yumurtaya ulaşma

ve yumurtayı dölleme olasılığı hakkında bilgi verir. Kaliteli sperm üretebilen erkek bireylerin sonraki nesillerinde de sperm kalitesinin yüksek olacağı göz önünde bulundurularak, damızlık seçiminde sperm motilite değerlendirmesinin bir araç olarak kullanılması doğru olacaktır. Hareketli sperm yüzdesi, balıklarda sperm kalitesini değerlendirmek için en faydalı parametrelerden birisidir. Çünkü sperm hareketlilik parametreleri dölleme yeteneği ile güçlü bir şekilde ilişkilidir ve dölleme başarısının tahmin edilmesine olanak tanır (Rurangwa vd., 2004).

Motilite değerlendirmesi ayrıca stres, beslenme, yetiştiricilik koşulları ve çevresel faktörler gibi dış faktörlerin etkisini değerlendirmek için de kullanılır ve damızlık kalitesinin/refahının iyileştirilmesine yardımcı olur (Cabrita vd., 2009). Motilite değerlendirmesi için tercih edilen yöntem, araştırmacının yetenek ve deneyimine bağlı olarak, ışık mikroskobu kullanılarak yapılan subjektif görsel değerlendirmedir. Son zamanlarda bilgisayar destekli [Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA)] nesnel değerlendirme yöntemlerinin geliştirilmesi, hareketlilik değerlendirmesini çok daha doğru, hızlı ve objektif hale getirdi. Ayrıca CASA sistemi bireysel spermatozoa hareketinin birçok farklı özelliği hakkında veri alınmasını da sağlamakta ve spermatozoa fizyolojisi hakkında araştırmacıların bilgi birikiminin artmasına katkı sağlamaktadır (Amann ve Waberski, 2014).

1.4. Sperm Muhafazası

1.4.1. Kısa Süreli Muhafaza

Balık gametlerinin korunması ile ilgi çalışmaların 1850'lerde başladığına inanılmaktadır. Turna, sazan, levrek gibi balıkların spermalarının korunması ilk olarak 1853'te gerçekleştirilmiştir. Bu araştırmaları takiben, 0 ila 9 °C arasındaki sıcaklıklarda salmonid sperminin depolanmasını/saklanması içeren araştırmalar gerçekleştirildi. Kısa süreli korumada, spermatozoa, seminal plazma ile birlikte, seyretilmiş veya seyretilmemiş biçimde kısa bir süre için korunabilir. Erkek gametlerin soğutulmuş koşullar altında (5 °C) kısa süreli korunması daha basit ve kolayca uygulanabilir. Spermatozoanın kısa süreli muhafazası genellikle buzdolabında, bir buz kutusunda veya yalıtımlı bir kutuda yapılır. Hiçbir özel ekipman gerekli değildir ve maliyeti düşüktür. Bu tür bir korumanın süresi bir haftadan az bir süre ile sınırlıdır (Wayman vd., 1998).

Atlantik somonu (*Salmo salar*) spermi, 5-6 °C'de saklandığında, 2,5 güne kadar yüksek dölleme seviyesini korumaktadır. Chum somonu (*Oncorhynchus keta*) spermi ile 2,5–5,8 °C'de 4 günlük depolamadan sonra % 50 dölleme, göl alabalığı (*Salvelinus namaycush*) spermi ile ise 1 °C'de 24 saat muhafazadan sonra % 80 dölleme oranı elde edilmiştir (Betsy ve Kumar, 2020). Dere alabalığının (*Salvelinus fontinalis*) spermi 2-3 °C'de muhafaza edildiğinde, dölleme yeteneğini 5 güne kadar koruduğu gözlenmiştir (Truscott vd., 1968). Büyükhatipoğlu ve Holtz (1978), seyreltilmemiş alabalık sperminin 4 °C sıcaklıkta saklandığında $8,3 \pm 2,7$ gün hareketliliğini koruduğunu bildirmiştir. Gökkuşluğu alabalığı spermi ise 16. güne kadar daha hayatta kalma başarısı göstermiştir (Stoss vd., 1987).

Dushkina (1975), Pasifik ringa balığı (*Clupea pallasii*) sperminin 0,8–1 °C'de saklandığında, dölleme kabiliyetini 3 hafta boyunca korunabileceğini bildirmiştir. Bir sazan türü olan *Tor khudree*'de yapılan çalışmada 4 °C'de ve oda sıcaklığında saklanan spermin hareketliliğinin yavaş ila orta derecede bir düşüş gösterdiği ve hareket hızındaki düşüşün oda sıcaklığında 4 °C'ye göre çok daha hızlı olduğu tesbit edilmiştir (Basavaraja ve Hegde, 2005). Agarwal vd., (2013) seyreltilmemiş *Schizothoracichthys progastus* sperminin, 3 günlük depolama sonrasında hareketlilik oranının % 50 olduğunu bildirmiştir.

1.4.2. Uzun Süreli Muhafaza (Kriyoprezervasyon)

Kriyoprezervasyon, hücrelerin canlılıklarını korumak için dokuların, organların veya herhangi bir biyolojik materyalin sıvı nitrojen içinde -196 °C'de muhafaza edilmesi işlemidir. 1935 ve 1945 yılları arasındaki dönem, spermatozoanın çok düşük sıcaklıklarda depolanması içi araştırmalara yoğunlaştığı dönem olmuştur. Hem memelilerde hem de hayvanlarda, bilim insanları, spermin -196 °C kadar düşük sıcaklıklarda hayatta kalabileceğini gözlemlemiştir. Hücreleri bu kadar düşük bir sıcaklıkta korumak, hücre ölümüne ve DNA bozulmasına yol açan biyokimyasal reaksiyonlar da dahil olmak üzere tüm biyolojik aktiviteleri durdurur. Kriyoprezervasyon sonrası canlılık oranlarının azlığı nedeniyle canlı hücrelere başarılı kriyoprezervasyon protokelleri oluşturulamamıştır. Sperm kriyoprezervasyonu konusunda ise Polge ve arkadaşlarının 1949 yılında kriyoprotektan olarak gliserol kullanımını keşfetmesiyle önemli mesafeler almıştır. Kriyoprotektanların keşfi, yeni

tip kriyobiyojik çalışmaların yolunu açmış ve böylece kriyoprezervasyon protokollerinin optimizasyonunda ilerleme sağlanmıştır. Kanatlı spermleri başarıyla kriyoprezerve edildi ve kriyoprezerve edilmiş spermatozoa kullanılarak civcivler üretildi (Betsy ve Kumar, 2020). Donmuş spermi zldkten sonra tüm hücreleri yeniden canlandırmak her zaman mümkün değildir. Dondurarak saklama sayesinde hücreler yüzyıllarca korunabilir ve daha sonra zldkten sonra yeniden canlandırılabilir.

Dondurarak saklama sperm için potansiyel olarak yıkıcı bir süreçtir. Bu nedenle donmuş/çözdürülmüş spermin dölleme kabiliyeti, dondurma işlemine tabi tutulmadan önceki dölleme yeteneğinden daha iyi olmayacaktır. Kısacası çözülmüş spermin kalitesi genellikle dondurulan spermin kalitesinin bir yansımasıdır. Sıvı nitrojende depolamada alan sınırlılığı ve yoğun laboratuvar çalışması gerekliliği nedeniyle, düşük kaliteli spermler kriyoprezervasyon için tecih edilmemelidir (Ciereszko vd., 2020).

Sperm kalitesini etkileyen faktörlere ilişkin mevcut bilgilerin kullanılması kriyoprezervasyon başarısının tahmin edilmesi için son derece faydalıdır. Sperm kalitesinde herhangi bir iyileşme, spermlerin donma-zlme ile ilgili strese dayanması için kritik olabilir. Mükemmel denebilecek kalitede taze sperm, başarılı bir kriyoprezervasyon için bir ön koşuldur. Dondurarak saklama sırasında, spermatozoa, donma-zlmenin neden olduğu ciddi strese dayanmak zorundadır (Bailey vd., 2000). Spermatozoanın hayatta kalmasını etkileyen ana faktörler, soğuk şokuna duyarlılık, soğutma ve dondurma oranları, seyreltici bileşimi ve ozmotik stresir (Watson, 2000). Kriyoprezervasyondan sonra hareketli sperm yüzdesinde ciddi düşüş yaşanır (Valcarce ve Robles, 2016).

1.4.2.1. Su rnleri Yetiştiriciliğinde Kriyoprezervasyon

Kriyoprezervasyon yeni bir teknoloji olmamasına rağmen, su ürünleri yetiştiriciliğinde son yıllarda önem kazandığı görülmektedir ve balık spermini canlı olarak uzun süre saklamanın günümüzdeki tek ve en iyi yoludur. Sıvı nitrojen içinde muhafaza edilen balık sperminin saklama süresinin 200 ila 32.000 yıl arasında olduğunu tahmin edilmektedir (Cloud ve Patton, 2009). Balık spermlerinin dondurulması ilkez 1953 yılında Blaxter tarafından ringa balığında

gerçekleştirilmiştir. Bilim insanlarının sperm kriyoprezervasyonu konusuna yoğun bir ilgisi olmasına rağmen, bu araştırma alanı sadece büyük baş hayvanların spermlerinin kriyoprezerve edilmesi ve pratikte kullanılması konusunda yoğunluk kazanmıştır. Suni tohumlamanın ortaya çıkışı, büyükbaş hayvan endüstrisinde devrim niteliğinde değişiklikler getirmiştir. 2000 yılından sonra, büyük baş hayvanlarda olduğu gibi su ürünlerinde de kriyoprezervasyon araştırmalarının yapıldığı gözlemlenmiştir. Ancak, daha az uygulama nedeniyle ilerleme yavaş olmuştur. Büyük baş hayvanların gamet kriyoprezervasyonunda olduğu gibi kültür balıklarının da spermilerinin dondurularak bu teknolojinin gerçek anlamda sahada uygulanması ve sonuçlarının görülmesi sonrasında daha çok önem kazanacağı ve ilgi göreceği düşünülmektedir. Bu nedenle, balık spermının kriyoprezervasyonunun yaygın olarak kullanım hedefine ulaşması için araştırmalar devam ettirilmelidir (Best, 2008).

Bu teknoloji yavru kalitesinin iyileştirilmesi ve yıl boyunca üretimde kullanılacak kaliteli spermın stoklanması açısından da dikkat çekmektedir (Betsy ve Kumar, 2020). Balık yetiştiriciliğinde kriyoprezervasyon ve kriyoprezerve sperm kullanımı genetik olarak geliştirilmiş bireyler üretmek için uygulanabilir. Doğal balık stoklarının genetik olarak korunması, spesifik yerli balık stoklarında genetik çeşitliliği kaybetme tehdidine karşı spermın uzun süreli depolanması, uygulanan koruma programlarına sigorta görevi görecektir.

Gametlerin dondurularak saklanması, gametlerin verimliliğini ve gücünü etkilemeden uzun yıllar boyunca ömrünü uzatır. Böylece kriyoprezerve edilen spermıler su ürünleri yetiştiricilik endüstrisinin gelecekteki yetiştiricilik programları için önemli bir genetik kaynak sağlayabilir. Su ürünleri yetiştiriciliğinde kriyoprezervasyon uygulamasında istenilen özelliğe sahip melezlerin üretilmesi büyük avantajdır. Kriyoprezervasyon ile cinsiyetlerin gamet mevcudiyeti senkronize edilebilir, spermın ekonomik kullanımı sağlanabilir, anaç yönetimi basitleştirilebilir ve genetik seçim programları veya türlerin korunması için sperm depolaması yapılabilir (Cabrita vd., 2010). Kriyoprezervasyon su ürünlerinde genetik ve ıslah çalışmalarında yıl boyunca ihtiyaç duyulan sperme rahatça ulaşmaya imkan vermektedir.

Çok farklı deniz ve tatlı su teleost balık türlerinin spermilerinin başarılı bir şekilde kriyoprezervasyonu ile sayısız spermatozoayı depolamanın ve doğrudan

kullanılabilmenin mümkün olduğu ispatlanmıştır. Günümüzde 200'den fazla balık türünün sperminin dondurularak saklanması sağlanmıştır (Jawahar ve Betsy, 2020). Su ürünlerinde sperm kriyoprezervasyonu yapılan bazı balıklar Tablo 5’de gösterilmiştir.

Kriyoprezervasyon, balık spermlerinin dondurulup uzun süre depolanmasının yanında erkek ve dişilerin üreme zamanlarının senkronize olmadığı; hastaliksız sotklar üreten programlar gibi üreme programlarında da kullanılabilinmektedir. Bu nedenle balık sperm bankalarının geliştirilmesi önem arz etmektedir (Diwan vd., 2020). Bir sperm bankasının en önemli görevi, çok uzun bir süre kaybolmayacak ve yumurtaların döllenmesi yoluyla bir türün eşey hattına kolayca dahil edilebilecek formdaki genlerin veya gen kombinasyonlarının saklanması olanak vermesidir. Kısacası gen bankaları genetik bir depodur. Sperm gen bankaları, nesli tükenmekte olan balık popülasyonlarının genetik çeşitliliğini korumak ve akrabalı çiftleşmeye engel olmak için de kullanılabilir (Suquet vd., 2000). Gen bankaları 5-10 yaşında sperm verebilen hermafrodit türlerin de üreme kabiliyetini, istenilen zamanda sperm kullanımına olanak sağlamasıyla büyük ölçüde artırabilmektedir (Gwo, 1993).

Tablo 5. Sperm kriyoprezervasyonu başarıyla yapılan bazı balıklar türleri

Tür	Bilimsel Adı	Araştırmacı
Ringa	<i>Clupea harengus</i>	Blaxter 1953
Atlantik cod	<i>Gadus morhua</i>	Mounib vd., 1968
Kefal	<i>Mugil cephalus</i>	Chao vd., 1975
Gökkuşáğı alabalığı	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Ciereszko ve Dabroski 1996
Atlantik somonu	<i>Salmo salar</i>	Stoss ve Refstie 1983
Sazan	<i>Cyprinus carpio</i>	Kurokura vd., 1984
Tilapia	<i>Oreochromis sp.</i>	Chao vd., 1987
Kalkan	<i>Psetta maxima</i>	Suquet vd., 1998
Kalkan	<i>Scophthalmus maximus</i>	Chereguini vd., 2003
Çipura	<i>Sparus aurata</i>	Fabbrocini vd., 2000
Halibut	<i>Hippo glossus</i>	Billard vd., 1993
Mersin	<i>Acipenser baeri</i>	Glogowski vd., 2002
Yılan balığı	<i>Anguilla japonica</i>	Tanaka vd., 2002
Kırmızı Mercan	<i>Pagrus major</i>	Liu vd., 2006

Balıklarda sperm dondurma çalışmaları değerlendirildiğinde, birçoğunda benzer yolların izlendiği görülmektedir. Temel uygulama aşamaları; toplanan spermin aktivasyonundan kaçınılması, uygun ekstenderlar ile spermin seyreltilmesi, sperm ısısının kademeli olarak düşürülmesi, dondurulması ve dondurulan spermin düşük ısıda (-196 °C) muhafazasıdır (Holtz, 1993).

Kriyoprezervasyon işlemlerinde deniz balıkları spermalarının dondurmaya karşı daha dayanıklıdır. Bunu; spermatozoa membranındaki kolesterol/fosfolipit oranının yüksek olması ve başlangıçtaki ATP içeriğinin yüksek olmasının sağladığı düşünülmektedir. Yine soğuğa karşı dirençte deniz balıklarının spermatozoa membranında bulunan fosfatil kolinin etkili olabileceği vurgulanmıştır (Suquet vd., 2000).

Balık spermatozoaları, kendine özgü karakterleri ile doğada benzersizdir. Spermatozoanın kalitesi ve miktarı türe ve bireye bağlıdır. Genelde hareketsizdirler ve sadece çok az türde hareketli spermatozoa bulunur. Hareketsiz spermatozoa, bir aktivasyon ajanına (yaşam ortamı suyu) ihtiyaç duyar. Balık spermaları çok küçüktürler ve boyutları 45 ile 55 µm arasında değişir. Balıklarda 5 µm'den daha küçük olan oval veya küresel çekirdeğe sahip sperm üreten türlerde vardır. Bu nedenle, yoğunlukları $0,1 \times 10^9$ ile 50×10^{12} hücre/mL'ye arasında değişim gösterebilmektedir. Ömürleri çok kısadır ve bu nedenle balıktan alındıktan sonra kısa süre içinde dölleme için kullanılmaları gerekir, aksi takdirde dış kirleticiler (bakteri, mantar vb) nedeniyle bozulurlar. Balık sperminin, kontaminasyonun yanı sıra seminal plazmanın sıcaklığından ve buharlaşmasından etkilenmesi de olası bir durumdur. Bu nedenle, uygun bir muamele ile spermi korumak gerekir (Betsy ve Kumar, 2020).

1.4.2.2. Kriyoprezervasyonda Antioksidan Kullanımı

Antioksidanlar serbest radikalleri etkisizleştiren ve oksidasyonu engelleyen önemli moleküllerdir. Serbest radikaller, son katmanında eşlenmemiş elektronu bulunan kimyasallardır. Bu nedenle oldukça kararsız yapıdadırlar. Bu eşlenmemiş elektronlarını eşleyebilmek ve kararlı yapıya geçebilmek için etraflarındaki moleküllere saldırırlar ve onlardan elektron koparır ya da onlara elektron sunarlar. Böylece etkileştikleri moleküllerin yapısını bozarak hücre ve DNA hasarı meydana getirirler. Antioksidanlar ise serbest radikallere ihtiyaçları olan elektronu vererek onları etkisiz hale getirir ve bunu yaparken kendileri kararsızlaşmazlar. Bu yolla serbest radikallere karşı mücadele eder ve onların olumsuz etkilerini azaltırlar/önlerler. Sağlıklı bir organizmada serbest radikal-antioksidan ilişkisi denge halindedir. Bu denge serbest radikal yönüne bozulur ise oksidatif stres oluşur. Antioksidan bileşiklerin dondurarak saklamada sulandırıcılara eklenmesinin lipid peroksidasyonu

gibi olumsuzlukların azaltılmasında yararlı olduğu bildirilmiştir (Osipova vd., 2016; Figueroa vd., 2018). Aşırı ROS, antioksidanların enzimatik savunmasını zayıflatarak hücreler üzerinde oksidatif strese ve ayrıca DNA, protein ve lipid içeriğine zarar vererek sperm kalitesinin düşmesine neden olmaktadır (Eriani vd., 2018). Reaktif oksijen türlerinin miktarındaki artış, membran bütünlüğünü bozabilir ve sperm hareketliliğini azaltabilir. Ayrıca baz bozulması, nokta mutasyonu, DNA fragmentasyonu ve proteinlerin çapraz bağlanması yoluyla spermatozoadaki genetik materyale zarar verebilir. Bu da düşük sperm kalitesi ile sonuçlanabilir (Agarwal vd., 2005; Bucak vd., 2010). Oksidatif stres seminal plazmadaki pro-oksidan ve anti-oksidan dengesinin değişmesiyle meydana gelmektedir. Böylece motilitede azalma, dölleme kabiliyetinde düşüş ve aksonemal yapıda olumsuzluklar da görülebilmektedir. Antioksidanların seyrelticilere eklenmesi ile ROS'un neden olduğu DNA hasarlarının azaltılması da mümkündür (Martínez-Páramo vd., 2013; Öğretmen vd., 2015).

Antioksidanların sperm dondurulmasında sulandırıcılara eklenmesiyle spermatozoanın kalitesi korunabilir (Shui vd., 2004). İki tür antioksidan vardır: enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlar. Doğal antioksidanlar olarak da bilinen enzimatik antioksidanlar arasında glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz bulunur. Bu antioksidanların tümü spermin doğal antioksidan savunma sistemine katılır. Sentetik antioksidanlar veya diyet takviyeleri olarak da bilinen enzimatik olmayan antioksidanlar, indirgenmiş glutatyon (GSH), ürat, askorbik asit, E vitamini (atokoferol), karotenoidler (b-karoten), ubikinon, taurin, hipotaurin, selenyum ve çinkodur (Shiva vd., 2011; Partyka vd., 2012). Teleost balık türlerinde yapılan çalışmalar seminal plazmanın anti-oksidatif fonksiyona sahip olduğunu göstermiştir (Ciereszko ve Dabrowski, 2000). Gökkuşluğu alabalığında SOD, askorbik asit (VC) ve ürik asit seminal plazmada kan plazmasından daha yüksek konsantrasyona sahip önemli semen antioksidanları olarak kabul edilmiştir (Metwally ve Fouad, 2009).

Şimdiye kadar memelilerde yapılan araştırmalar göstermiştir ki sulandırıcılara antioksidanların (taurin, hipotaurin, prolin, glutamin, glisin, histidin ve metiyonin) eklenmesi, çözülme sonrası sperm hareketliliğini iyileştirmiş ve DNA parçalanmasını azaltmıştır. Son zamanlarda, farklı balık türlerinde (*D. labrax*, *S. aurata*, *O. mykiss*, *S. fontinalis*, *P. major*, *Carassius auratus*) antioksidanların seyrelticilere eklenmesi ile

ilgili çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda, amino asit ilavesinin DNA parçalanmasını azalttığını ve DNA'yı iplik kopmalarına karşı koruduğunu, ayrıca çözölme sonrası bazı sperm kalite parametrelerini iyileştirdiğini tespit edilmiştir. Bununla birlikte, balık sperminin dondurularak korunmasında antioksidanların sulandırıcılara eklenmesi üzerine yapılan çalışmalar sınırlıdır. Bu nedenle, ekonomik ve ekolojik önemi olan balıklarda, kriyoprezervasyonda antioksidan takviyesinin etkisi konusunda yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır (Kutluyer vd., 2014).

1.4.2.3. Çalışmada Kullanılan Antoksidanlar

Taurin: Taurin renksiz, suda çözünebilen, protein yapısına katılmayan, moleköl ağırlığı 125 g/mol olan ve serbest olarak bulunabilen bir aminoasittir (Kendler, 1989). Taurin, tiyol içeren aminoasitlerden oluşur ve sisteinden sentezlenir. Taurinin, detoksifikasyon, ozmoreğölasyon, Ca^{+2} akışını dengeleme, membran bütönlüğünü sağlama gibi önemli süreceşlerde rol aldığı bildirilmektedir. Taurin hücrenin oksidan/antioksidan dengesi ve hücre bütönlüğünü koruma gibi özellikleri ile bir antioksidan olarak koruyucu ve dengeleyici etkilere sahiptir (Osipova vd., 2016). Taurinin; doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunu azaltmak, reaktif oksijen türevlerini temizlemek ve kararlı hale getirmek gibi etkileri de vardır. Taurin dondurma-özdürme sırasında meydana gelen ROS'un etkilerine karşı spermatozoonları korumada önemli rol oynar. Taurin, spermin motilite kaybını ve lipid peroksidasyonunu azaltarak etkinliğini ortaya koymaktadır (Baliouis vd., 2021).

Ürik Asit: Ürik asit, hipoksantin ve ksantinden üretilen düşük moleköl ağırlıklı bir organik bileşiktir. Ürik asit tekli oksijen türleri ve lipid peroksitler dahil olmak üzere reaktif türlerin güçlü bir temizleyicisidir. Hidrofilik bir antioksidan olmasına rağmen, suda sınırlı özünörlüđe sahiptir. Balıklarda türe göre farklılıklar gösterebilir seminal plazmada en yüksek düzeyde bulunan antioksidandır. Bu nedenle ROS'a karşı önemli bir koruyucu işlevi olduğu düşünölmektedir (Félix vd., 2020). Birçok alışma, ürik asidin, allantoin, glioksilat, allantoat, üre ve oksalat gibi zararsız ürönlere dönüştürölmeden önce, özellikle hidroksil radikallerini (OH) ve hipokloröz asidi (HOCl) nötrale edebilen güçlü bir antioksidan olduğunu göstermiştir (Becker, 1993). Spermin; hareketliliği, sayısı, morfolojisi ve DNA hasarı gibi hemen hemen tüm ana parametreler, seminalde bulunan ürik asidin konsantrasyonundan önemli

ölçüde etkilenir. Normal ve yüksek seminal ürik asit konsantrasyonlarında daha iyi sperm kalite parametreleri gözlenmektedir (Motrich vd., 2006). Franz vd. (2010) kahverengi alabalık sperminde yapmış oldukları çalışmada ürik asit ve katalazın sperm canlılığı üzerinde olumlu bir etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Ürik asidin, sağlam membranlara sahip spermatozoa miktarını artırabileceği, sperm hareketliliğini ve yüzme hızını iyileştirdiği ve ayrıca sperm plazma zarındaki LPO'yu (lipid peroksidasyonu) azalttığı için ana antioksidan olabileceğini belirtmişlerdir.

Rozmarinik Asit: Son dönemlerde sperm kriyoprezervasyonunda bitkisel kökenli antioksidanların da kullanılmasına başlanmıştır. Özellikle güçlü ve koruyucu etkileri bilinen bir antioksidan olan rozmarinik asit tercih edilenler arasında olmuştur. Rozmarinik asit (RA), biberiye (*Rosmarinus officinalis*)'de bulunan önemli bir doğal antioksidandır ve biyolojik sistemlerde serbest radikallerin temizleyicisi olarak hareket edebilmektedir. Biberiye Akdeniz kökenli Lamiaceae familyasından çok yıllık bir bitkidir. RA'nın in-vitro çalışmalarda anti-HIV-1, antibakteriyel, antioksidan, anti-kanserojen ve anti-alerjik aktiviteler, antiviral özellikler gibi bazı biyolojik faaliyetleri olduğu tespit edilmiştir (Bulduk ve Gökce, 2017). Hayvancılık rasyonlarının RA gibi biyoaktif bileşenler içeren bitkilerle takviye edilmesi büyümeyi, üreme performansını, yem kullanımını, doğurganlığı, antioksidan durumu ve immünolojik endeksleri teşvik etmede önemli sonuçlar göstermiştir (Alagaway vd. 2017).

1.4.2.4. Kriyoprezervasyonda DNA Hasarı

DNA en iyi şekilde korunmuş genetik bilginin yumurtaya aktarılmasını sağlamakla birlikte, DNA'nın fiziksel ve kimyasal bir formda embriyoya verilmesini sağlayarak gelişen embriyonun genetik bilgiye kolayca ulaşmasını sağlamaktadır. Güncel çalışmalar, kriyoprezervasyonun sperm genomunu çeşitli şekillerde etkilediğini göstermektedir. Antioksidanların sulandırıcılara eklenmesi kriyo hasarı seviyelerini azaltabileceğinden, antioksidan kullanımı-DNA hasarı ilişkisi yaygın olarak çalışılan bir konudur. DNA'da meydana gelen hasarların; fertilizasyon, embriyonal gelişim ve canlının yaşam kalitesi üzerinde olumsuz yönde etkileri vardır. DNA hasarı düzeyinin bilinmesinin, kriyoprezervasyon protokollerinin geliştirilmesi ve iyileştirilmesi için faydalı olduğu düşünülmektedir (Pérez-Cereales vd., 2010; Cabrita vd., 2011; Pereira vd., 2019).

DNA hasarı bir kriyo hasar olarak ortaya çıkabilir ve genellikle sperm kalitesinin diğer parametrelerini etkilemez. Döllenme sırasında DNA'larının füzyonu bir embriyonun genomunu oluşturarak döllenmenin kalitesini belirlemektedir. Oositler onarım mekanizmalarına sahip olduğundan, sperm DNA'sındaki bir miktar doğal hata düzeltilebilir. Ancak DNA hasarları bazen tamamen düzeltilemeyebilir. Bu nedenle bazı hatalar döle aktarılabilir ve bu durum anormalliklerin miktarının artmasına neden olur (Kopeika vd., 2003). Sperm, yumurtanın tamir edebileceğinden daha fazla DNA hatası biriktirebilir, bu da embriyonik gelişimin olmamasına veya hasarlı DNA'nın döle transferi ile anormal bir gelişime yol açar (Drevet, 2017). Balık spermalarında DNA hasarları genellikle dondurma/çözme işlemi sırasında DNA oksidasyonu veya seyreltici içindeki kriyoprotektan maddelerin (CPA) konsantrasyonunun toksisitesi ile ilişkilidir (Martínez vd., 2012; Gosálvez vd., 2014). Spermde oluşan DNA hasarının nedeni olarak üç sebep ileri sürülmüştür. Bunlardan birincisi, spermin gelişimi süresince uygun olmayan ortamlar, ikincisi oksidatif stres ve üçüncü olarak da belirli bir moleküler işlemler serisine maruz kalmadır. Bunlardan oksidatif stres DNA'nın tek ve çift iplikli kırıkları ile ilişkilidir (Agarwal ve Saleh, 2002).

DNA hasarına sahip spermin dölleme yeteneği ya azalmakta ya da tamamen yok olmaktadır. Eğer döllenme gerçekleşmiş ise kusurlu embriyo gelişimi beklenen bir durumdur. Bu nedenle DNA hasarı durumu, spermin dölleme potansiyelini ve embriyo sağlığını değerlendirmede bir belirteç olarak kullanılabilir (Collins, 2004). DNA hasarının, birçok tatlı su balığı türünde döllenme oranının azalmasına ve anormal gelişim gösteren larva sayılarında artışa yol açacağı düşünülmektedir. Sperm DNA hasarı ile sper motilitesi ve membran bütünlüğü arasında negatif korelasyon tespit edilmiştir (Cabrita vd., 2001; Gwo vd., 2003; Pérez-Cereales vd., 2011).

Dondurulmuş spermin değerlendirilmesinde DNA durumunun ortaya konulması, kriyoprezervasyonun ticari ölçekte uygulanması için ya da sperm bankalarında saklanan örneklerin değerlendirilmesi için önemlidir. Çünkü genetik bilgi kaybı ya da bu hasarla ilişkili larva anormalliklerinin ortaya çıkması istenilen bir durum değildir (Labbe vd., 2001; Zilli vd., 2003; Cabrita vd., 2005).

Kriyoprezervasyon öncesi ve sonrasındaki DNA membran bütünlüğünün yanı sıra plazma zarının veya seminal plazma içeriğinin bileşimindeki değişiklikler, hasarın düzeyini etkileyebilmektedir (Martínez-Páramo vd., 2009).

Sperm DNA hasarının belirlenmesinde birçok metot kullanılmaktadır. Bu metotlar ile elde edilen sonuçlar arasında çok güçlü bir ilişki vardır. Son zamanlarda düşük seviyedeki DNA hasar düzeylerinin bile hassas bir şekilde belirlenebilmesi, az sayıda hücre ile analizin gerçekleştirilebilmesi, ekonomik olması, sonuçların kısa sürede elde edilebilmesi ve değerlendirilmesi gibi nedenlerden dolayı DNA hasar tespitinde SCD yönteminin (sperm kromatin dağılımı, sperm chromatin dispersion, SCD) kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. SCD testi, denatüre edilmiş hasarlı DNA'dan dolayı oluşan karakteristik hale şeklindeki yapının, normalden daha büyük çaplı görüntülenmesine dayanır. SCD testi, basit, hızlı, doğru, tekrarlanabilir ve kısa sürede sonuç verebilen metottur (Chohan vd., 2006).

1.5. Önceki Çalışmalar

Son dönemlerde balıklarda sperm kriyoprezervasyonu, sperm kriyoprezervasyonunda antioksidan kullanımı ve kriyoprezerve edilmiş spermden görülen DNA hasarları konularındaki araştırmalara odaklanılmıştır.

Balık spermin kriyoprezervasyonunda zamana bağlı soğutma işlemi önemini belirlemek için yapılan bir çalışmada çipura sperminin dondurulmasında soğutma oranı 1 °C'den -100 °C'ye kadar dakikada 10 °C indirilmesinin uygun olacağı belirlenmiştir. Çipura spermi kriyoprezervasyonunda % 10'un altındaki dimetil sülfoksit (DMSO) konsantrasyonlarında daha iyi motilite oranları elde edilmiştir (Fabbrocini vd., 2000).

Engin (2012), çipura sperm kriyoprezervasyonunda ticari ekstender (IMV) kullanmış (% 10 DMSO) ve 1. ayda % 72,7±0,35 gibi yüksek bir motilite değeri elde etmiştir.

Çipura sperminin dondurma protokolünü optimize etmek ve daha ekonomik/verimli sonuçlar elde etmek için Özgörey ve Akçay (2020), seyreltici olarak Ringer solüyonunun kullanımını önermişlerdir. Ayrıca %10 DMSO'in % 10 etilen glikol (EG) ve % 10 dimetil asetamid (DMA)'e göre daha uygun kriyoprotektan olduğunu belirtmişlerdir. Dondurulmuş spermin çözündürme sıcaklığı 26 °C'de 20 sn olarak önermişlerdir. Bu sıcaklıkta motilite değerini % 69,37 olarak bulmuşlardır.

Liu vd. (2007), % 15 DMSO kullanarak *P. major* spermini kriyoprezerve etmiştir. Çözöldükten sonra sperm motilitesi, döllenme oranı ve yumurtadan çıkma

oranı sırasıyla % 81.0, % 92.8 ve % 91.8 olarak bulmuştur.

Chen vd., 2010, *P. major* üzerine yaptıkları bir çalışmada 1-73 ay depolamadan sonra sperm motilitesinin kademeli olarak % 87,67'den % 50,67'ye düştüğünü belirlemiştir. Spermin dölleme oranı ise 26. ayda (% 60,33) olurken 73 ay saklanan spermelerde dölleme oranı % 39,56 olarak bulunmuştur.

Zilli vd. (2005), levrek spermelerinin uzun süreli muhafazasında 1:3 (sperm hacmi/ekstender) oranındaki seyreltmede % 95 motilite oranını bildirmiştir.

Eszter Kása (2017), *Eurasian perch* spermini dondurmuş ve çözündürme sonrası % 26,4'lük bir hayatta kalma oranı ile % 2,45'lik bir dölleme oranı elde etmiştir.

Dreanno vd. (1997), Atlantik kalkan balığında yapmış oldukları çalışmada spermelerin dondurulmasında % 15 DMSO'de, gliserol, etilen glikol ve metanole göre en yüksek motilite değerini ($63,3 \pm 4,6$) elde etmişlerdir. Ayrıca bu çalışma sonunda kalkan spermelerinde 1:2 (sperm hacmi/ekstender) seyreltme oranının, 1:1, 1:4 ve 1:9 oranlarına göre en yüksek hareketlilik değerini verdiği belirtilmiştir. Dondurulmuş spermelerin 40 °C'deki çözündürme işleminde elde edilen hareketlilik yüzdesi 20 °C ve 30 °C'ye göre yüksek olmuştur. Yine bu çalışmanın sonuçlarına göre payetlere çekilen spermin kademeli soğutulması için sıvı azot yüzeyinde 6,5 cm mesafede tutulduktan sonra depolanması önerilmektedir.

Chereguini vd. (1997), kalkan balığı sperminin kısa süreli muhafazası ve dondurulması çalışmalarında; kısa süreli muhafazayı 0-15 °C arasında önermektedirler. Ayrıca dondurma/çözündürme sonrası yüksek hareketlilik değeri için sakkaroz solüsyonu ile % 10 DMSO ve % 10 yumurta sarısı kullanımı gerektiğini bildirmişlerdir.

Suquet vd. (1998), kalkan balığı spermini dondurduktan 9 ay sonra çözündürmüş ve dölleme çalışması yapmışlardır. Bu çalışmanın sonucuna göre taze sperm ile dondurulmuş/çözündürülmüş spermin dölleme kapasitesi arasında fark istitiki olarak önemli bir fark bulunamamıştır. Ayrıca çıkan larvaların yaşam oranları da benzer bulunmuştur.

Chereguini vd. (2003), 49 kalkan balığının spermelerini dondurmuş ve daha sonra çözündürerek dölleme çalışması (n=1153) gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada dölleme oranları % 69,2'nin üzerinde bulunmuştur.

Chen vd., (2004), iki farklı extender ile % 10 DMSO kullanarak kalkan

spermelerini 1,8 mL'lik kriyoviyallere doldurarak dondurmuşlardır. Ortalama dölleme oranını % 70,1±8,9, yumurtadan çıkış oranını ise % 46,8±5,2 olarak bildirmişlerdir. Bu sonuçlar taze spermle yapılan dölleme çalışması sonuçları ile benzerlik göstermiştir.

Atlantik halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) sperminin dondurulması, uzun süre depolaması (3 ay) ve çözündürme sonrasında dölleme başarısı en yüksek % 10 DMSO ile dondurulup saklanmış grupta tespit edilmiştir (Ding vd., 2011).

Mounib (1978), morina spermini -196 °C'de dondurarak depolamış ve daha sonra çözündürme işlemi yaparak gerçekleştirdiği döllemede % 80-89'luk bir oran elde etmiştir.

Mezgit (*Melanogrammus aeglefinus*) ve Atlantik coddan (*G. morhua*) alınan sperm, DeGraaf ve Berlinsky (2004) tarafından % 10 DMSO kullanılarak dondurulmuş ve depolanmıştır. Çözündürme sonrasında yapılan değerlendirmede motilite oranlarını sırasıyla % 63,0 ve % 66,0 olarak belirlemişlerdir. Bu çalışmanın neticesinde cod balığı sperminin uzun süre dondurularak saklanabileceğini ve çözöldükten sonra da yumurtaları dölleyebileceğini ortaya konmuşlardır.

Rideout (2004), propilen glikol (PG), DMSO ve gliserol kullanarak mezgit balığı ve Atlantik cod spermini dondurarak saklamıştır. PG kullanılan grupta %62,5 ve %56,3'lük bir hayatta kalma oranı görülmüş, bu da PG'nin diğer antifriz reaktiflerinden daha üstün olduğunu göstermiştir.

Atlantik cod spermi farklı antifriz ajanları ile dondurularak saklanmış, ancak PG kullanıldığında spermin daha yüksek hayatta kalma oranına (% 66) sahip olduğu görülmüştür (Butts vd., 2011).

Salmonidlerde birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların çoğu da ticari öneminden ve dünyada yetiştiriciliği yaygın olarak yapılmasından dolayı gökkuşağı alabalığı (*O. mykiss*) üzerinde yapılmıştır. Ayrıca kaynak alabalığı (*Salvelinus fontinalis*) ve alp alabalığı (*S. alpinus*) üzerine de birçok çalışma bulunmaktadır (Kutluyer, 2014).

Coho somonu (*Oncorhynchus kisutch*), Chinook somonu (*O. tshawytscha*) ve gökkuşağı alabalığı (*O. mykiss*) spermelerinin dondurularak saklanması ve çözödürülmesi sonrasında yapılan dölleme çalışmasında dölleme oranı % 29-83 arasında bulunmuştur.

O. gorbusha ve *Salmo trutta*'nın da dondurularak saklanması ve çözündürülmesi sonrasında dölleme oranı % 44-85 arasında bulunmuştur (Yongsheng vd., 2020).

Yang (2018), Atlantik somonu (*S. salar*) sperminin dondurularak saklanması ve taşınması konusunda bir yöntem geliştirmek için Ringer ve % 10 metanol kullanmış ve bu çalışmada % 36'lık bir sperm hayatta kalma oranı elde edilmiştir.

Şu ana kadar ondan fazla orfoz türünden alınan spermier dondurularak saklanmıştır. Bunların bazıları; seven orfoz (*Epinephelus septemfasciatus*), dev orfoz (*Epinephelus lanceolatus*), kırmızı benekli orfoz (*Epinephelus akaara*), gölgeli orfoz (*Epinephelus marginatus*), uzun dişli orfoz (*Epinephelus bruneus*), kara orfoz (*Epinephelus malabaricus*) yağlı orfoz (*Epinephelus tauvina*) turuncu benekli orfoz (*Epinephelus coioides*), kelp orfoz (*Epinephelus moara*) ve kahverengi-mermer orfoz (*Epinephelus fuscoguttatus*)'dur (Imaizumi vd., 2005; Cabrita vd., 2008; Kiriyaakit vd., 2011; Qi vd., 2014; Tian vd., 2015; Ahn vd., 2018; Yusoff vd., 2018). Bu türlerin sperm kriyoprezervasyonunda genellikle % 5–15 DMSO veya % 8–15 PG kullanılmıştır. *E. marginatus* (% 36,8) dışında, bu türlerde kriyoprezervasyon sonrası sperm aktivitesi % 57,24 (*E. moara*) ile % 99,5 (*E. bruneus*) arasında değişmektedir (Tian vd., 2017).

Mersin balığı türlerinden mersin morinası (*Huso huso*), çuka balığı (*Acipenser ruthenus*), Sibirya, Avrupa ve Rus mersin balığı (*A. baeri*, *A. sturio*, *A. gueldenstaedii*), gibi ticari öneme sahip olanların yanı sıra nesli tehlike altında olan türlerde de sperm dondurma protokolleri geliştirilmiş ve başarı ile uygulanmıştır. Mersin balıklarının sperm dondurma deneylerinde, DMSO'nun kriyoprotektan olarak kullanılması, en yüksek çözölme sonrası motilite ile sonuçlanmasına rağmen, fertilizasyon yüzdeleri bakımından en yüksek sonuç % 5 metanol kullanıldığında elde edilmiştir (Horvath vd., 2008).

Tatlı su balıklarında, proteinler (BSA) veya lipoprotein (yumurta sarısı) gibi nüfuz etmeyen kriyoprotektanlar, plazma zarının zarar görmesini önlemek için yaygın olarak kullanılmıştır (Nynca vd., 2014).

Han vd. (2015), kalkan balığı spermindeki oksidan ve antioksidanların konsantrasyon ve aktiviteleri ile sperm kalitesine etkilerini incelemiştir. Elde ettikleri sonuçlar, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon redüktaz (GR), ürik asit, vitamin E (VE) ve vitamin C (VC)'nin seminal plazmada spermatozoadan daha fazla

olduğunu göstermiştir. Her birinin varyasyonu kendine özgü değişim sergilemiştir. Seminal plazmada, SOD ve GR'nin aktivitesi 30 Kasım'dan 15 Aralık'a kadar yükselmiş ve ardından 30 Aralık'ta azalma eğilimi göstermiştir. Hem VC hem de ürik asit konsantrasyonları ise 30 Aralık'ta artmıştır. 30 Aralık'ta seminal plazmadaki oksidanlar en yüksek seviyeye ulaşmış laktik asit (LA) ve ATP seviyeleri ise en düşük seviyeye inmiştir.

Shaliutina-Kolešová vd. (2013), çalışmalarında Rus mersin balığı (*Acipenser gueldenstaedtii*), Sibirya mersini (*A. baerii*), sazan (*C. carpio*) ve dere alabalığının (*S. fontinalis*) spermatozoalarında antioksidan savunma düzeylerinin normalden daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Ek olarak, spermatozoa ve seminal plazmada oksidatif stres yanıtı düzeylerinde farklılıklar gözlemlemişlerdir. Analiz edilen antioksidanlardan spermatozoada glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitesini, dere alabalığında $12,56 \pm 3,23$ mU/mg ve Rus mersin balığında $11,56 \pm 3,12$ mU/mg olarak bulmuşlardır. Seminal plazmada ise sırasıyla $6,81 \pm 1,56$ mU/mg ve $9,56 \pm 3,12$ mU/mg olarak tespit etmişlerdir. Seminal plazmanın antioksidan sistemi spermatozoanın antioksidan sistemine göre ROS kaynaklı potansiyel olarak metabolik veya fonksiyonel bozukluklara ve sperm hareketliliğinde daha fazla bir azalmaya neden olabileceğini ifade etmişlerdir.

Lahnsteiner vd. (2011), brook alabalığı (*S. fontinalis*) sperminin dondurularak saklanması sulandırıcılara 1,5 mmol/l glutatyon eklenmesinin çözündürme sonrası spermin yüzme hızını arttırdığını ve % 76,3'lük bir döllenme oranı ile sonuçlandığını bildirmiştir.

Kutluyer vd. (2015), bir akvaryum balığı olan goldfish (*C. auratus*) sperminin dondurulmasında seyrelticiye L-metionin eklemenin çözündürme sonrasında sperm motilite hızı ve süresinde önemli bir artışa neden olduğunu göstermişlerdir. En iyi L-metionin konsantrasyonunu ise 1,5 mM olarak belirlemişlerdir. Ayrıca L-metionin içeren sulandırıcı kullanılması kontrol grubuna göre DNA hasarını azaltmıştır.

Öğretmen vd. (2015), sazan (*C. carpio*)'da sisteinin dondurma/çözülme sonrası sperm motilitesi, sperm motilite süresi, DNA hasarı ve döllenme üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Sistein 2,5 mM, 5 mM, 10 mM ve 20 Mm konsantrasyonları içeren sulandırıcılarla sperm örneklerini kriyoprezervasyona tabi tutmuştur. Bu çalışmanın sonuçlarına göre sistein konsantrasyonundaki artışın sazan balığı sperm motilite hızı

ve süresinde önemli bir artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Tüm sistein konsantrasyonları karşılaştırıldığında, en iyi sistein konsantrasyonu 20 mM olarak belirlenmiştir. Bu konsantrasyonda en yüksek motilite (% 76,00±1,00) ve dölleme (% 97,00±1,73) elde edilmiştir. Ayrıca sistein ilavesi, dölleme ve kuluçka oranını arttırmış ve DNA hasarını azaltmıştır. Yapılan bu çalışmanın sonuçlarına göre sazan balığı sperminin dondurulmasında sulandırıcılara sistein eklenmesi tavsiye edilmiştir.

Martínez- Páramo vd. (2013) iki kükürt içeren amino asit, taurin ve hipotaurinin Avrupa levrek sperminin dondurularak saklanması üzerindeki etkilerini inceledikleri çalışmada, sulandırıcılara 1 mM taurin ve 1 mM hipotaurin eklenmesinin, çözündürme sonrası sperm kalitesini ve sperm motilitesini iyileştirdiğini ve DNA hasarını azalttığını bildirmişlerdir. 1 mM hipotaurin ilaveli sulandırıcının sperm motilitesini (% 30,1±3,2) ve 1 mM taurin ilaveli sulandırıcının ise sperm hızını kontrol grubuna göre arttırdığı (18,1±2,6 lm/s) bildirilmiştir. Ayrıca taurin ve hipotaurin ilaveli sulandırıcıların kullanıldığı spermelerde kontrole kıyasla (% 55,7±0,8) önemli ölçüde daha az (sırasıyla 52,8±0,9 ve 51,8±0,9) DNA hasarı olmuştur.

Kutluyer (2014), gökkuşağı alabalığı (*O. mykiss*) sperminin kriyoprezervasyonunda sulandırıcılara antioksidan ilavesinin etkisini belirlemek amacıyla çalışma yapmıştır. Bu çalışmada standart sulandırıcı ve bu sulandırıcıya farklı antioksidanlar (katalaz, superoksit dismutaz, peroksidaz, okside glutatyon, redukte glutatyon, L-metiyonin, ürik asit, L-askorbik asit, α - tokoferol, β -karoten ve karnitin) eklenerek 12 farklı grup oluşturulmuştur. Çözündürme sonucunda, L-metiyonin ve ürik asit ilavesinin motiliteyi arttırdığı ($p<0,05$), α - tokoferol ve ürik asit ilavesinin motilite süresini arttırdığı ($p<0,05$), 1., 3. ve 6. ay sonunda çözündürme sonrasında elde edilen bulgulara süreye bağlı olarak motilite ve motilite süresinin düştüğü belirlenmiştir. Ayrıca yumurta dölleme ve açılma oranlarının, kriyoprezerve edilen sperm ile döllenenlerde taze sperm ile döllenenlerden düşük olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, sulandırıcılara antioksidan ilavesinin gökkuşağı alabalığının sperm kriyoprezervasyonunda sperm parametrelerini olumlu etkilediği bildirilmiş ve antioksidan kullanımı önerilmiştir.

Liu vd. (2014), *P. major* sperminin dondurulmasında altı farklı antioksidanın çözündürme sonrası sperm hareketliliği, canlılığı, zar bütünlüğü ve mitokondriyal fonksiyon üzerindeki etkilerini bilgisayar destekli sperm analiz sistemi ve akış

sitometrisi ile değerlendirmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre en yüksek motilitenin 100 mM trehalozda (% 78,34±3,41) ve 50 mM taurin'de (% 77,46±1,54), ardından 25 mM C vitamininde (% 79,03±5,37) meydana geldiğini bildirmişlerdir. Ayrıca 25 mM E vitamini (% 69,64±1,64) ve 25 mM A vitamini (% 78,89±2,81) dahil bütün antioksidan ilaveli sulandırıcılar ile yapılan dondurma/zdrmelerde kontrol (% 66,80±5,55) grubuna göre daha yüksek sperm hareketliliği tespit edilmiştir. Sonuç olarak, bu çalışmada 100 mM trehaloz ve 50 mM taurin antioksidanın, *P. major* sperminin zdrme sonrası kalitesini iyileştirmede en belirgin koruyucu etkiyi sağladığını göstermişlerdir.

Luño vd. (2014), boar sperm dondurmasında antioksidan olarak RA kullanılan grubun zdrme sonrasında sperm hareketliliğinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Yeni vd. (2018), boğa spermimde yapmış oldukları çalışmada RA 25 ve RA 50 µg/mL dozlarının spremin antioksidan aktivitesini arttırdığını ve sperm hücrelerinde MDA ve kromatin hasarı miktarını azalttığını bildirmişlerdir.

Yapılan literatür taramasında Rozmarinik asit, ürik asit ve Taurinin gibi antioksidanların kalkan balığı sperminin dondurma/zdrme sonrası sperm kalite parametrelerine etkilerine yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu tez çalışmasında 25, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonundaki üç farklı antioksidanın etkin dozunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Araştırma Yeri

Bu tez çalışması Mayıs 2021 ile Haziran 2022 tarihleri arasında T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM)'ne bağlı Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü (SUMAE) Müdürlüğü deniz balıkları kuluçkahanesi ve Üreme Fizyolojisi Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir (Şekil 3). Ülkemizde kalkan balığı üretimi sadece SUMAE bünyesinde bulunan deniz balıkları kuluçkahanesinde gerçekleştirilebilmektedir. SUMAE deniz balıkları kuluçkahanesine karadan 200, 400 ve 800 m açıktan; 18, 40 ve 58 m derinlikten deniz suyu alımı yapılmaktadır. Her bir hat 80 m³/saat kapasite ile çalışabilmektedir. Farklı derinliklerden alınan deniz suyu, balık bulunan tanklara verilmeden önce 50 µ'a kadar filtre edilmektedir. Yumurta inkübasyonu veya yavru büyütme aşamasında ise deniz suyu 1 µ'a kadar filtre edilip ultraviyole (UV) lamba sisteminden geçirilip dezenfekte edilerek kullanılmaktadır.



a: SUMAE deniz balıkları ünitesi, b: Kriyoprezervasyon laboratuvarı

Şekil 3. Araştırma üniteleri

2.1.2. Araştırmada Kullanılan Damızlık Materyali

Çalışmada SUMAE Deniz Balıkları kuluçkahanesinde üretilen ve damızlık olarak belirlenmiş 5 yaşında 40 adet erkek ve 3 adet dişi Karadeniz kalkan Balığı kullanılmıştır (Şekil 4).



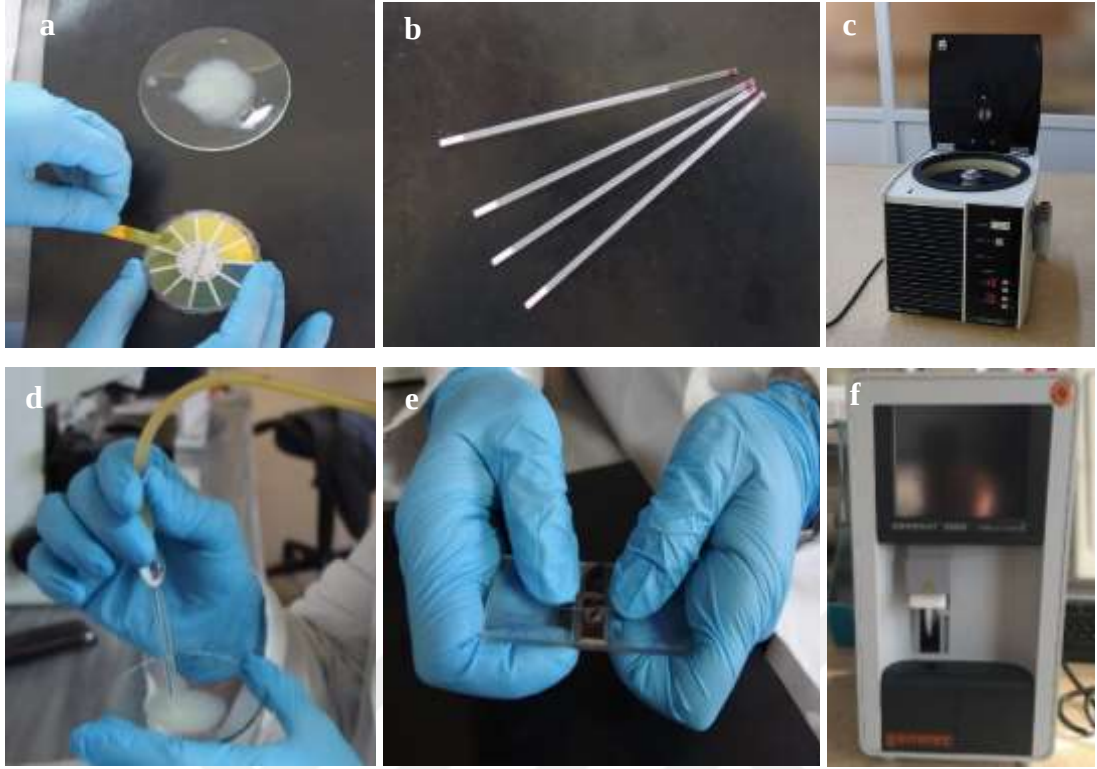
a: Üstten görünüş, b: Alttan görünüş
Şekil 4. Karadeniz kalkan balığı;

2.1.3. Damızlıkların Muhafazası ve Kullanılan Diğer Malzemeler

Çalışmada kullanılan damızlık kalkan balıkları 15 m³ tanklarda muhafaza edilmiştir. Balıkların boy ölçümleri için 1 mm hassasiyetli ölçüm tahtası, ağırlıklarının belirlenmesinde ise 1 g hassasiyetli elektronik terazi kullanılmıştır. Dişi bireylerin hormon uygulamasına uygun olup olmadığına karar vermek için gerekli olan oosit örnekleri alımı için iç çapı 1,5 mm olan kateter ve oositlerin muhafazası için 5 mL hacimli cam şişeler kullanılmıştır. Pelet formda hormon hazırlamak için toz halinde luteinizan hormonu salgılatma hormon türevi (LHRH-a Sigma L4513), kakao yağı, kolesterol, etanol, pipet, porselen havan, havaneli, el çekici, hassas terazi ve deliklerinin iç çapı 3 mm olan peletleme kalıbı kullanılmıştır.

2.1.4. Sperm Kalite Kriterleri Belirlenmesinde Kullanılan Materyaller

Çalışmada kullanılacak olan spermelerin toplanmasında 1 mL steril şırınga kullanılmıştır. Spermeleri değerlendirme aşamasına kadar muhafaza etmek amacıyla içerisinde kuru buz kalıpları bulunan strafor kutular tercih edilmiştir. Sperm özellikleri SCA (Sperm Class Analyser) V.5.4. Nikon Eclipse CI mikroskop negatif faz kontrast objektif mikroskopta gerçekleştirilmiştir. Spermin CASA'da görüntüleme ve analizi için 10 µl derinlikli Makler chamber kullanıldı. Spermatokrit oranının belirlenmesi için mikro-hematokrit kapillar tüpler (75 mm uzunluğunda, iç çapı 1 mm ve 0,1 mL kapasite), santrifüj, hesaplama cetveli, spermatozoa yoğunluğunun hesaplanması için seyreltme pipeti ve thoma lamı kullanılmıştır. Spermin pH değeri indikatör kağıdı (Merck 5,5-9,0), ozmolaritesi Gonotec Osmomat 3000 cihazı ve hareketlilik süresi hassas kronometre (1/100sn) ile ölçülmüştür (Şekil 5).



a: pH indicator kağıdı, b: Kapiller tüp, c: Santrifüj, d: Seyreltme pipeti,
e: Thoma lamı, f: Ozmolarite ölçüm cihazı

Şekil 5. Sperm kalite parametrelerinin belirlenmesinde kullanılan bazı materyaller.

2.1.5. Sperm Kriyoprezervasyon Materyali

Spermilerin dondurulması ve muhafazası sürecinde falkon tüpler (15 ve 50 mL), mikro pipet, 0,25 ve 0,5 mL'lik payet, pens, cımbız, mikropipet, polivinil alkol, beher (500 mL), koruyucu eldiven ve gözlük, sıvı azot (-196 °C), kanister, sperm muhafaza tankı (IMV TR-26) kullanılmıştır. Ayrıca spermin dondurulmaya hazır hale getirilmesi için: NaCl (sodyum chloride), KCl (potasyum chloride), MgCl₂ (magnesium chloride), NaH₂PO₄ (sodium phosphate monobasic), NaHCO₃ (sodium bicarbonate), HEPES (sodium salt), Glucose, DMSO (dimetil sülfoksit) antioksidan olarak ürik asit, taurin ve rozmarinik asit kullanılmıştır.

2.1.6. Yumurta Sağımı ve İnkübasyonu

Yumurta sağımı ve inkübasyonu için sağım masası, ıslak havlu, plastik kap, yumurtaların inkübasyonu için 1000 mL'lik cam beherler ve sıcaklığı ayarlanabilir inkübatörler kullanılmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Damızlık Yönetimi

Çalışmada kullanılacak damızlık bireyler belirlenirken türe özgü vücut formuna sahip, büyüme performansı ve genel sağlık durumu iyi olan balıklar rastgele seçilmiştir. Balıklar tanklarda m^2 'ye 6-8 kg olacak şekilde muhafaza edilmiştir ve su değişimi günlük günde 10 kez olacak şekilde ayarlanmıştır. Damızlıklar haftada üç kez doğal habitatında en fazla tercih ettiği mezgit, barbun, hamsi gibi yaş yem ile doyana kadar beslenmişlerdir. Kalkan balığı bir dip balığı olması nedeniyle genellikle tank zemininde hareketsiz olarak (beslenme faaliyeti haricinde) yaşamını sürdürür. Bu nedenle damızlık muhafaza tankının zemin temizliğine özellikle önem verilmiş ve günlük temizlik yapılarak yaş yem ve fekal artıklar uzaklaştırılmıştır. Ayrıca her ay düzenli olarak tanklar basınçlı su makinesi ile yıkanmış ve kimyasal ajanlarla dezenfekte edilmiştir.

2.2.2. Sperm Toplama

Çalışmada sperm kalitesini belirlemek ve kriyoprezervasyon işlemi için gerekli olan sperm materyalinin toplanması öncesinde balıkların ürogenital bölgesi tatlı su ile yıkandıktan sonra kurulanmıştır. Testislerin olduğu bölgeye hafifçe baskı yapılarak balıkta sperm olup olmadığı kontrol edilmiş ve kanallardaki üre ile vücut sıvısı hafif baskı ile boşaltılmıştır. Daha sonra, abdominal masaj yapılarak vücut dışına çıkması sağlan sperm 1 mL'lik steril şırıngaya Şekil 6'da gösterildiği gibi alınmıştır. Alınan sperm örnekleri, içerisinde kuru buz bulunan kutuya konarak (+4 °C) muhafaza edilmiş ve laboratuvar ortamına taşınmıştır.



Şekil 6. Kalkan balığından sperm toplama işlemi

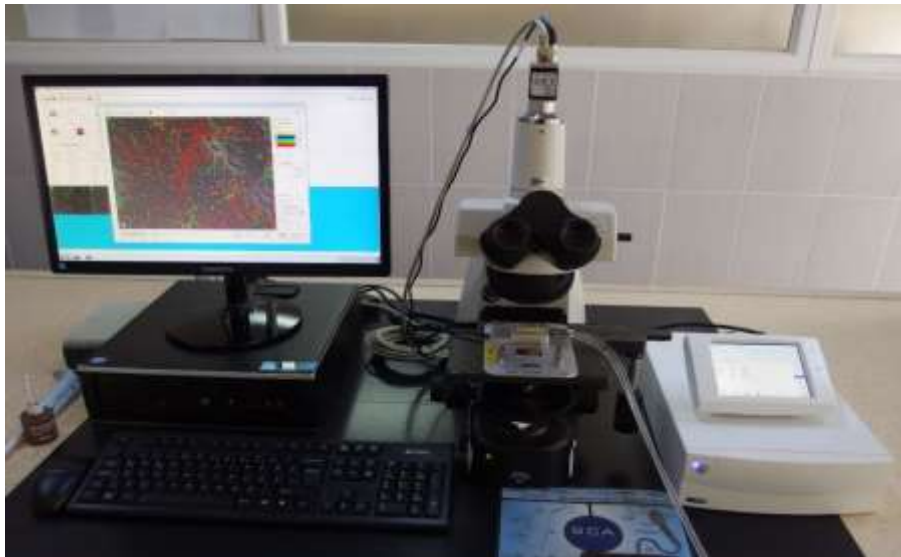
2.2.3. Sperm Kalitesinin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan kuluçkahane kökenli 5 yaşındaki Karadeniz kalkan balıklarının tamamında üreme döneminde (Mayıs) sperm kalite parametreleri incelenmiştir. Her bir balık için bütün parametreler üç tekerrürlü gerçekleştirilmiştir.

2.2.3.1. Sperm Kalite Parametreleri

Sperm kalite parametre ölçümleri; taze ve çözündürülen örneklerde CASA sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 7). Sperm 10 µm derinliğinde Makler çemberinde 1:400 oranında seyreltilip sperm ısısındaki steril deniz suyu ile aktive edilip 10. ve 60. saniyelerde analiz edilmiştir. CASA sisteminde 9 sperm özelliği belirlenmiştir. Bunlar:

1. MOT, hareketli sperm oranı (%)
2. VCL, eğrisel hareket hızı (µm/s)
3. VAP, ortalama hız (µm/s)
4. VSL, doğrusal hareket hızı (µm/s)
5. LIN, lineerlik ($VSL/VCL \times 100$) (%)
6. WOB, titreşim indeksi oranı (%)
7. STR, doğrusallık ($VSL/VAP \times 100$) (%)
8. ALH, yatay yer değiştirme (µm)
9. BCF, sperm vuruş frekansı (Hz)'dir.



Şekil 7. Sperm kalite parametre ölçümlerinin gerçekleştirildiği CASA sistemi

2.2.3.2. Sperm pH'sı ve Hareketlilik Süresi

pH, taze spermden bir damla indikatör kağıdına damlatılıp yayıldıktan sonra kağıdın renk değişimine göre skalaya bakılarak belirlenmiştir. Sperm mikroskop altında aktive edildikten sonra sperm canlılığını kaybedinceye kadar geçen süre spermin hareketlilik süresi olarak, saniye cinsinden, kaydedilmiştir.

2.2.3.3. Spermatokrit Oranı ve Konsantrasyonu

Spermatokrit oranı, mikro-hematokrit kapıllar tüplere çekilen sperm örneğinin santrifüjlenmesi (12000 rpm, 10 dakika) ile sperm sıvısı ve spermin ayrılması sağlanarak belirlenmiştir. Sperm yoğunluğu hemositometrik yöntemle belirlenmiştir. Sayım için seyreltme pipetine çekilen 1 birim sperm üzerine 100 birim saf su ilave edilerek spermin seyreltilmesi sağlanmıştır. Daha sonra bir damla seyreltilmiş sperm, lam (Thoma haemocytometer, derinlik 0.1 mm) üzerine damlatılarak lamel ile kapatılmıştır. Mikroskop altında lam üzerinde bulunan 16 karedeki sperm miktarı sayılmış ve sperm yoğunluğu (mL^{-1}) = $1000 \times \text{sayılan sperm miktarı} / (\text{alan, mm}^2) \times (\text{derinlik, mm}) \times \text{seyreltme oranı}$ formülü ile hesaplanmıştır. Sonuçlar $\times 10^9$ spermatozoa/mL olarak kaydedilmiştir (Polat vd., 2014).

2.2.3.4. Sperm Ozmolaritesinin Belirlenmesi

Taze spermdaki hareketlilik (motilite) birçok balık türünde dış ortamın ozmolaritesine bağlıdır. Hücre içinde oluşan iyon konsantrasyonu değişimi ve dışarıdaki ozmotik basınç sperm motilitesini etkilemektedir (Cabrita vd., 2009). Taze spermin ozmolaritesini belirlemek için eppendorf tüpe alınan 50 µl örnek Gonotec Osmomat 3000 cihazı ile mOsm/kg cinsinden ölçülmüştür.

2.2.4. Sperm Kriyoprezervasyonu ve Antioksidanlar

Sağım elde edilen ve spermatolojik özellikleri belirlenen spermin kriyoprezervasyonu için ekstender olarak kalkan ringer solüsyonu (KRS) kullanılmıştır. Sulandırıcının hazırlanmasında kullanılan kimyasallar Tablo 6'da verilmiştir. Kriyoprezervasyonda motilite değeri % 90'nın üzerinde olan sperm kullanılmıştır. Dondurma işleminde sperm, 1:9 (sperm:ekstender) oranında seyreltilmiş ve kriyoprotektan olarak % 10 DMSO kullanılmıştır (Chen vd., 2004).

Tablo 6. Kriyoprezervasyon da kullanılan standart sulandırıcı (KRS)

Kimyasallar	Miktar (mM/L)	Kimyasallar	Miktar (mM/L)
NaCl	150	NaHCO ₃	7,0
KCl	2,5	Glukoz	2,8
CaCl ₂	3,5	Hepes	9,8
MgCl ₂	0,9	pH	7,4

Tablo 7’de yer alan antioksidanlar seyreltilen spermlere belirlenen dozlarda ilave edildikten sonra 0,5 mL semen tüplere (payet) doldurulmuş ve açık uçları polivinil alkol ile kapatılmıştır. Tüm bu işlemler yapılırken kullanılan bütün malzemenin temiz ve sperm ısısı ile aynı olması sağlanmıştır. Payetler çelik levha üzerine sırayla yerleştirildikten sonra sıvı azot (-196 °C) dolu kabın 6,5 cm yüzeyinde azot buharında 15 dakika bekletilmiş ve süre sonunda sıvı azot içine konarak dondurma işlemi gerçekleştirilmiştir. Dondurulmuş spermin uzun süre depolanmasını sağlamak amacıyla payetler kanisterlere konarak etiketlenmiş ve depolama tankına yerleştirilmiştir. Dondurulmuş sperm örneklerinin çözündürme işlemi payetler 40 °C’de 5 saniye su banyosunda tutularak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 7. Çalışmada kullanılan antioksidanlar ve dozları

Antioksidanlar	Kullanım Dozları (µg/mL)		
Ürik Asit	25	50	100
Taurin	25	50	100
Rozmarinik asit	25	50	100

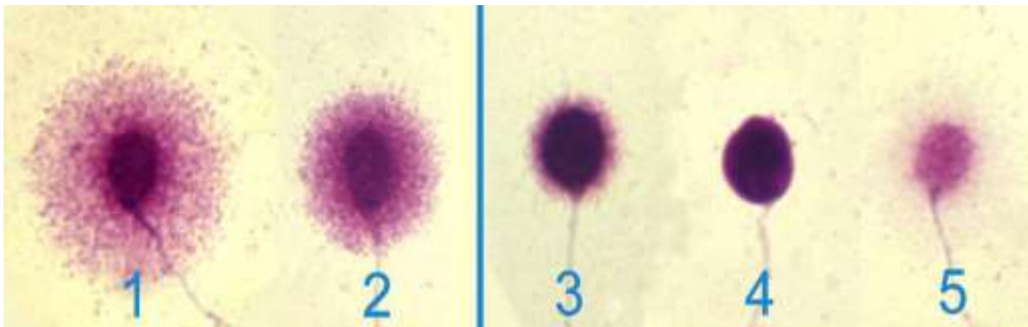
2.2.5. DNA Hasarının Belirlenmesi

Antioksidanların DNA hasarına etkisini belirlemek için taze ve antioksidan ilave edilip çözündürülmüş spermler slayt üzerine sabitlenmiş ve CASA’da DNA hasarı düzeyleri belirlenmiştir. Slaytların hazırlanması için DNA hasar analizi kiti (GoldCyto Sperm DNA kit) kullanılmıştır (Fernández vd., 2003). Slaytların hazırlanması aşağıdaki basamaklar takip edilerek yapılmıştır.

- 1- Lizis çözeltisinin oda sıcaklığına (22 °C) ayarlanması.
- 2- Sperm (dondurulmuş/çözündürülmüş ve taze) numunesinin kültür besiyerinde mililitre başına 5-10 milyon adete seyreltilmesi.
- 3- Agarozun suda 5 dakika boyunca 90-100 °C’de eritilmesi.
- 4- Agaroz 37 °C’de tutulan sıcaklık kontrollü bir su banyosuna aktarılması ve

- sıcaklık eşit oluncaya kadar 5 dakika bekletilmesi.
- 5- Agaro eppendorf'a 30 mikrolitre semen örneği eklenip karıştırılması.
 - 6- Agaro eppendorftan hücre süspansiyonunun lama yerleştirilmesi.
 - 7- Slaytların 4 °C'de buzdolabına konularak numunenin bu ortamda 5 dakika boyunca jelde bekletilmesi.
 - 8- Slaytın asit denatürasyon çözeltisine yatay bir pozisyonda batırılıp oda sıcaklığında (22 °C) 7 dakika inkübe edilmesi.
 - 9- Slaytın 5 mL temperlenmiş lizis çözeltisi içeren başka bir inkübasyon tepsisine yerleştirilmesi ve 25 dakika inkübe edilmesi.
 - 10- Lizis çözeltisini yıkamak için slaytın bol damıtılmış su içeren bir tepsiye yatay olarak yerleştirilmesi ve 5 dakika boyunca inkübe edilmesi.
 - 11- Slaytın yatay olarak % 70 etanol (2 dakika), ardından % 90 etanol (2 dakika) ve son olarak % 100 etanol (2 dakika) içeren bir tepsiye yerleştirilmesi.
 - 12- Oda sıcaklığında kurumaya bırakılması.
 - 13- Slaytların A –TA solüsyonunda inkübe edilmesi (1 dakika).
 - 14- Slaytlara B-TB solüsyonunun uygulanması (2 dakika).
 - 15- Slaytların suyla yıkanarak, oda sıcaklığında kurumaya bırakılması.
 - 16- Mikroskop altında slaytların renk seviyesinin kontrol edilmesi.

Her bir tekrörden 500'er sperm DNA hasarı belirlemek için incelenmiştir. Büyük haleye sahip sperm DNA hasarsız (1 ve 2) ve küçük haleye sahip olan sperm ise DNA hasarlı sperm (3, 4 ve 5) olarak değerlendirilmiştir (Şekil 8).



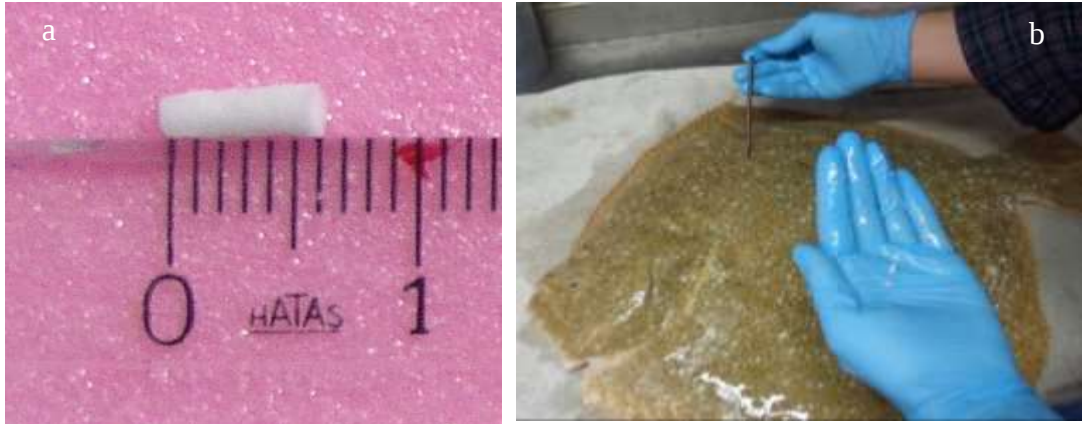
1 ve 2: DNA hasarsız sperm, 3, 4 ve 5: DNA hasarlı sperm

Şekil 8. Sperm DNA hasar durumu

2.2.6. Yumurta Eldesi ve Dölleme Çalışmaları

2.2.6.1. Hormon Hazırlama ve Uygulama

Çalışmada dondurulmuş spermin çözündürme sonrası dölleme kabiliyetinin belirlenmesinde kullanılacak olan yumurtaların eldesi için dişi bireylere pellet formda LHRH-a hormonu uygulanmıştır. Sentetik LHRH-a hormonu 5 mg tartılarak seramik havan içerisinde konulduktan sonra üzerine 1 mL % 60'lık etanol ilave edilmiştir. Daha sonra karışımın üzerine 625 mg kolesterol ilave edilerek homojenize edilmiş ve inkübatörde 25 °C'de 2 saat dinlendirilmiştir. Bu karışımın üzerine 125 mg kakao yağı ilave edilerek toz haline gelene kadar sürekli karıştırılmıştır. Elde edilen toz karışım peletleme kalıbındaki 3 mm çapındaki gözeneklere doldurularak sıkıştırılmıştır (Şekil 9). Her bir pelet bireysel olarak tartılarak içerdiği hormon miktarı belirlenmiş ve kullanılıncaya kadar cam şişeler içerisinde -18 °C'de muhafaza edilmiştir. Hormon uygulanacak dişi bireylerin belirlenmesi için kateter yardımıyla gonadlardan oosit örnekleri alınmış ve mikroskop altında çap ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Oosit çap ortalaması 400 µm'den büyük olan dişi bireylere 100 µg/kg dozda LHRH-a hormonu balığın dorsal bölgesinde kas doku içine 5 mm iç çapı olan metal aparat yardımı ile uygulanmıştır (Şekil 9). Balıklardan yumurta alımı hormon uygulamasından yaklaşık bir hafta sonra gerçekleşmiştir.



a: Pelet hormon, b: Hormonun balığa uygulanması

Şekil 9. Yumurta temini için kalkan balığa hormon uygulaması

2.2.6.2. Yumuta Sağımı

Sağım masasına alınana dişi bireylerin gonad bölgesi alttan ve üstten iki el arasına alınarak hafifçe bastırılmış ve yumurta çıkışı sağlanmıştır (Şekil 10). Yumurtalar kuru plastik kaba alınmıştır.



Şekil 10. Kalkan balığından yumurta sağımı

2.2.7. Dölleme Kabiliyetinin Belirlenmesi

Çalışmada üç farklı dişi kalkan balığının yumurtası birleştirilerek yumurta havuzu oluşturulmuş ve buradan alınan yumurtalar kullanılmıştır. Her bir dölleme çalışması üç tekerrürlü olarak yapılmış ve her tekrerrür için yumurta havuzundan 10 g yumurta alınmıştır. Daha sonra çözdürme protokolüne uygun şekilde çözdürülen sperm hemen yumurtanın üzerine dökülmüş ve 50 mL deniz suyu ilave edilerek dölleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Döllemeden 5 dk sonra yumurtalar 1 μ 'a kadar filtre edilmiş inkübasyon suyu ile yıkanarak üre ve vücut sıvısının uzaklaştırılması sağlanmış ve 100 ppm iyodin çözeltisi ile muamele edilerek dezenfekte edilmiştir. Daha sonra yumurtalar 1 litrelik beherlere konularak 14 °C'de sıcaklık kontrollü inkübatör dolaplarda inkübe edilmiştir. Her gün beherdeki suyun 2/3'lik kısmı değiştirilmiştir. Dölleme oranlarının hesaplanması için dölleme işleminden 2,5 saat sonra (14 °C su sıcaklığında 2'li hücre bölünmesi başlangıcı) rastgele örnekleme ile yumurta örnekleri alınmıştır. Yapay dölleme işlemine tabi tutulmuş olan bu yumurta örneklerinde hücre bölünmeleri görülenler döllelenmiş, herhangi bir bölünme görünmeyenler veya opak durumdakiler döllelenmemiş olarak değerlendirilmiştir. Döllelenme oranı: döllelenmiş yumurta sayısı/toplam yumurta sayısı x 100 formülüne göre hesaplanmıştır. Çıkış oranı ise: yumurtadan çıkan prelarva sayısı/toplam yumurta sayısı x 100 formülüne hesaplanmıştır (Aydın, 2008; Polat, 2018).

2.2.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Veriler, Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 16.0 programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar değerlerin ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir (Ort $\pm$ SD). Gruplar arası farklılıkların hesaplanması Duncan post-hoc testinin ardından one-way ANOVA ile yapılmıştır ($p<0,05$).

2.3. Bulgular

2.3.1. Kalkan Balığı Taze Sperminin Spermatolojik Özellikleri

Kuluçkahane kökenli 5 yaşındaki kalkan balıklarından (n=40) elde edilen spermin; sperm miktarı, spermatokrit oranı, sperm yoğunluğu, canlılık süresi, sperm ozmolaritesi ve pH'sı belirlenmiştir. Kalkan balığı sperminde belirlenen spermatolojik özelliklere ait sonuçlar Tablo 8'de; CASA ile yapılan analiz sonuçları ise Tablo 9'da verilmiştir.

Tablo 8. Karadeniz kalkan balığının spermatolojik özellikleri (n=40)

Parametreler	Ortalama ($\pm$ SD)
Boy (cm)	47,6 $\pm$ 1,8
Ağırlık (g)	2100,7 $\pm$ 341,4
pH	7,10 $\pm$ 0,20
Sperm miktarı (mL)	2,09 $\pm$ 0,50
Spermatokrit oranı (%)	37,80 $\pm$ 5,20
Spermatozoa yoğunluğu ($\times 10^9$ spz)	1,98 $\pm$ 0,30
Süre (dk)	19,78 $\pm$ 2,70
Ozmolarite (mOsmol/L)	308,33 $\pm$ 4,40

Tablo 9. CASA ile belirlenen sperm kalite parametreleri (n=40, $\pm$ SD)

Parametreler	10. saniye	60. saniye
Motilite- MOT (%)	92,58 $\pm$ 2,93	79,93 $\pm$ 5,22
Eğrisel hız - VCL (μ m/s)	91,78 $\pm$ 26,85	61,95 $\pm$ 15,73
Doğrusal hız - VSL (μ m/s)	48,22 $\pm$ 15,61	33,78 $\pm$ 9,28
Ortalama hız - VAP (μ m/s)	71,19 $\pm$ 22,93	47,76 $\pm$ 11,88
Lineerlik - LIN (%)	44,16 $\pm$ 6,38	41,69 $\pm$ 6,19
Doğrusallık İndeksi - STR (%)	58,67 $\pm$ 5,17	57,17 $\pm$ 4,62
Salınım/titreşim indeksi - WOB (%)	70,93 $\pm$ 5,41	66,19 $\pm$ 6,10
Yatay yer değiştirme - ALH (μ m)	2,75 $\pm$ 0,59	2,07 $\pm$ 0,23
Sperm vuruş frekansı - BCF (Hz)	4,95 $\pm$ 0,76	4,44 $\pm$ 0,83

2.3.2. Spermin Kriyoprezervasyonu

Spermin kriyoprezervasyonunda 10 adet erkek kalkan balığı kullanılmıştır. Kullanılan balıklardan sperm toplanmadan önce CASA’da analiz edilebilecek miktarda örnek alınarak motilite değeri belirlenmiştir. Motilite değeri $\geq 90\%$ olanların spermleri toplanarak bir sperm havuzu oluşturulmuştur. Sperm havuzunun spermatolojik parametreleri (Tablo 10) belirlendikten sonra kriyoprezervasyon için; kalkan ringer sulandırıcısına üç farklı antioksidanın her biri (ürük asit, taurin ve rozmarinik asit) 25, 50 ve 100 $\mu\text{g/mL}$ dozlarda ilave edilmiştir. Dondurma işleminden bir hafta sonra payetler çözündürülerek sperm motilite değerleri CASA ile analiz edilmiştir (Şekil 11). Dondurma/çözdürme sonrasında grupların sperm motilite değerleri arasındaki farklılık istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$). Çözdürme sonrası en yüksek motilite değeri 10. saniyede rozmarinik asit 25 $\mu\text{g/mL}$ ile ürik asit 100 $\mu\text{g/mL}$ sperm gruplarında gerçekleşmiştir. 60. Saniyede ise en yüksek motilite değeri rozmarinik asit 25 ve 50 $\mu\text{g/mL}$ sperm gruplarında belirlenmiştir. Çözdürme sonrası 10. saniye sonuçlarına göre (Tablo 11) rozmarinik asit 25 $\mu\text{g/mL}$ sperm örnekleri standart sulandırıcı kullanılan kontrol grubu örneklerinden analiz edilen parametreler bakımından önemli ölçüde farklı olup diğerleriyle benzer özelliklere sahiptir. Çözdürme sonrası 60. saniyedeki sonuçlara bakıldığında (Tablo 12) gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p < 0,05$).

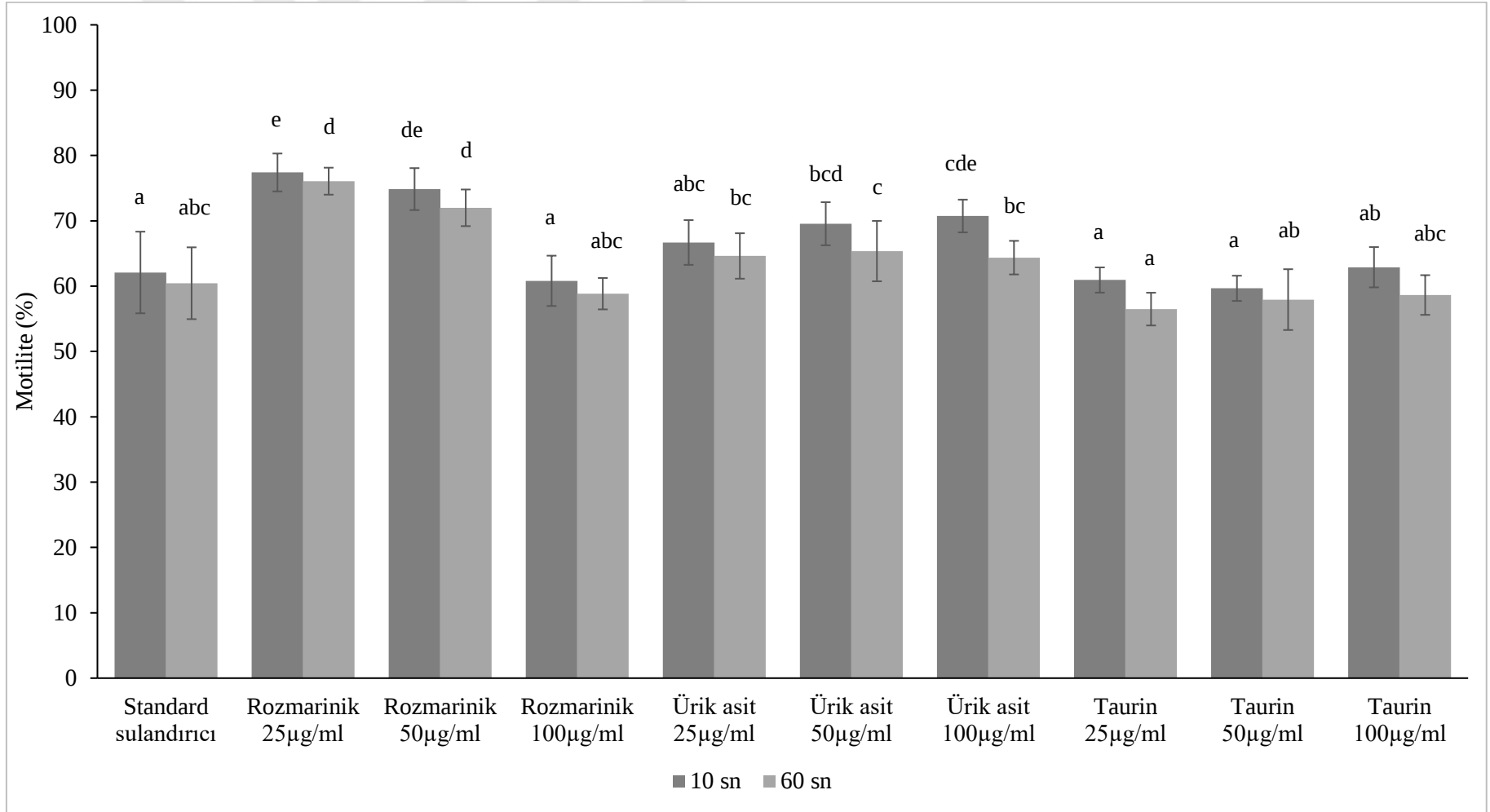
Tablo 10. Sperm havuzunun spermatolojik parametreleri (n=10, $\pm$ SD)

Parametreler	10. saniye	60. saniye
Motilite- MOT (%)	95,82 $\pm$ 2,23	84,95 $\pm$ 6,18
Eğrisel hız - VCL ($\mu\text{m/s}$)	94,73 $\pm$ 31,62	66,83 $\pm$ 25,27
Doğrusal hız - VSL ($\mu\text{m/s}$)	46,53 $\pm$ 20,10	36,78 $\pm$ 18,83
Ortalama hız - VAP ($\mu\text{m/s}$)	71,68 $\pm$ 27,48	52,11 $\pm$ 23,61
Lineerlik - LIN (%)	42,53 $\pm$ 4,98	44,40 $\pm$ 7,17
Doğrusallık İndeksi - STR (%)	57,27 $\pm$ 3,43	59,27 $\pm$ 5,33
Salınım/titreşim indeksi - WOB (%)	70,72 $\pm$ 4,02	69,86 $\pm$ 5,67
Yatay yer değiştirme - ALH (μm)	2,98 $\pm$ 0,61	2,16 $\pm$ 0,36
Sperm vuruş frekansı - BCF (Hz)	4,98 $\pm$ 0,48	4,69 $\pm$ 0,95

Antioksidanlar ilave edilerek dondurulan kalkan balığı spermi 1, 3, 6, 9 ve 12. aylarda çözündürülerek CASA sisteminde analizleri gerçekleştirilmiştir. Çözdürme sonrası 10. saniyedeki motilite değeri Tablo 13’de, 60. saniyedeki ise Tablo 14’de verilmiştir. Çözdürme sonrası motilite değerlerinde zaman ve sulandırıcılara göre

gruplar arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Çözdürme sonrası elde edilen bulgulara göre motilite değerinde zamana bağlı olarak bir düşüş görülmektedir. Farklı aylarda çözdürülen spermiler arasındaki en yüksek motilite değeri 25 µg/mL rozmarinik asit ilave edilen gruptan elde edilmiştir. Farklı aylarda çözdürülen 25 µg/mL ürik asit eklenen grupta ise zamana bağlı motilite değerinde bir düşüş olmasına rağmen bu azalma istatistiksel olarak önemli değildir ($p<0,05$). Farklı aylarda çözdürme sonrası 60. saniyede en yüksek motilite değeri ise 50 µg/mL rozmarinik asit ilave edilen grupta görülmüştür. Standart sulandırıcı ve 25, 50 ve 100 µg/mL taurin ilave edilen grupta zamana bağlı motilite değeri düşüş göstermesine rağmen aradaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p<0,05$).





Şekil 11. Antioksidanlar eklenen Karadeniz kalkan balığı sperminin (donmuş/çözülmüş) motilite değerleri

Tablo 11. Çözdürme sonrası 10. saniyedeki sperm kalite parametreleri ($\pm$ SD)

Antioksidanlar	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
Standart sulandırıcı	42,12 $\pm$ 7,67	20,82 $\pm$ 3,69	29,32 $\pm$ 6,10	34,29 $\pm$ 2,86	51,55 $\pm$ 2,49	56,50 $\pm$ 2,05	1,68 $\pm$ 0,19	3,87 $\pm$ 0,21
Rozmarinik 25 $\mu\text{g/mL}$	57,29 $\pm$ 5,84	33,86 $\pm$ 11,07	44,46 $\pm$ 8,25	46,63 $\pm$ 5,69	61,51 $\pm$ 3,69	68,51 $\pm$ 1,95	1,94 $\pm$ 0,25	4,98 $\pm$ 1,35
Rozmarinik 50 $\mu\text{g/mL}$	55,03 $\pm$ 8,72	28,54 $\pm$ 3,87	41,03 $\pm$ 6,58	40,17 $\pm$ 6,61	56,01 $\pm$ 5,18	64,63 $\pm$ 5,93	2,00 $\pm$ 0,31	4,27 $\pm$ 0,77
Rozmarinik 100 $\mu\text{g/mL}$	48,46 $\pm$ 8,59	27,59 $\pm$ 11,59	37,00 $\pm$ 10,07	41,54 $\pm$ 13,02	57,23 $\pm$ 11,02	63,67 $\pm$ 10,06	1,71 $\pm$ 0,11	4,56 $\pm$ 1,76
Ürik asit 25 $\mu\text{g/mL}$	48,90 $\pm$ 5,11	25,45 $\pm$ 4,34	35,72 $\pm$ 4,66	37,19 $\pm$ 7,86	53,62 $\pm$ 6,83	60,82 $\pm$ 7,72	1,84 $\pm$ 0,11	4,26 $\pm$ 0,50
Ürik asit 50 $\mu\text{g/mL}$	52,43 $\pm$ 4,63	29,00 $\pm$ 8,11	39,57 $\pm$ 7,37	42,74 $\pm$ 8,32	57,86 $\pm$ 6,36	65,62 $\pm$ 6,48	1,88 $\pm$ 0,17	4,06 $\pm$ 1,21
Ürik asit 100 $\mu\text{g/mL}$	55,10 $\pm$ 2,19	29,47 $\pm$ 3,29	40,77 $\pm$ 1,47	38,18 $\pm$ 6,30	54,64 $\pm$ 5,68	60,40 $\pm$ 3,65	1,94 $\pm$ 0,12	4,53 $\pm$ 0,90
Taurin 25 $\mu\text{g/mL}$	52,22 $\pm$ 5,74	32,48 $\pm$ 7,62	41,66 $\pm$ 7,31	47,80 $\pm$ 8,05	62,50 $\pm$ 6,23	68,95 $\pm$ 6,04	1,72 $\pm$ 0,06	4,89 $\pm$ 1,38
Taurin 50 $\mu\text{g/mL}$	46,01 $\pm$ 5,74	22,79 $\pm$ 7,62	32,69 $\pm$ 7,31	34,14 $\pm$ 8,05	50,53 $\pm$ 6,23	57,69 $\pm$ 6,04	1,76 $\pm$ 0,06	3,81 $\pm$ 1,38
Taurin 100 $\mu\text{g/mL}$	51,06 $\pm$ 7,76	28,50 $\pm$ 0,38	39,12 $\pm$ 4,40	43,42 $\pm$ 4,48	58,57 $\pm$ 4,00	66,90 $\pm$ 1,88	1,83 $\pm$ 0,31	4,32 $\pm$ 0,77

Tablo 12. Çözdürme sonrası 60. saniyedeki sperm kalite parametreleri ($\pm$ SD)

Antioksidanlar	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
Standart sulandırıcı	39,04 $\pm$ 5,28	17,06 $\pm$ 3,97	25,76 $\pm$ 5,08	31,14 $\pm$ 4,60	48,70 $\pm$ 4,21	54,92 $\pm$ 4,85	1,68 $\pm$ 0,14	3,68 $\pm$ 0,15
Rozmarinik 25 $\mu\text{g/mL}$	48,58 $\pm$ 3,50	23,48 $\pm$ 7,58	34,23 $\pm$ 6,61	36,61 $\pm$ 9,37	53,56 $\pm$ 7,27	60,27 $\pm$ 8,21	1,92 $\pm$ 0,16	4,16 $\pm$ 0,97
Rozmarinik 50 $\mu\text{g/mL}$	45,44 $\pm$ 3,65	21,28 $\pm$ 1,13	31,45 $\pm$ 3,59	36,26 $\pm$ 1,84	53,19 $\pm$ 1,17	60,24 $\pm$ 4,42	1,90 $\pm$ 0,11	3,78 $\pm$ 0,21
Rozmarinik 100 $\mu\text{g/mL}$	41,30 $\pm$ 1,06	18,76 $\pm$ 1,62	28,24 $\pm$ 2,06	31,64 $\pm$ 5,92	48,87 $\pm$ 5,15	55,83 $\pm$ 6,62	1,70 $\pm$ 0,08	3,57 $\pm$ 0,07
Ürik asit 25 $\mu\text{g/mL}$	46,61 $\pm$ 6,66	22,05 $\pm$ 2,66	32,26 $\pm$ 4,77	35,92 $\pm$ 2,84	53,43 $\pm$ 3,13	58,89 $\pm$ 2,83	1,88 $\pm$ 0,25	3,74 $\pm$ 0,22
Ürik asit 50 $\mu\text{g/mL}$	50,26 $\pm$ 6,49	24,83 $\pm$ 4,12	36,18 $\pm$ 5,78	35,56 $\pm$ 5,03	52,17 $\pm$ 4,33	59,14 $\pm$ 4,69	1,88 $\pm$ 0,14	3,94 $\pm$ 0,19
Ürik asit 100 $\mu\text{g/mL}$	48,24 $\pm$ 4,39	23,06 $\pm$ 2,02	34,67 $\pm$ 2,35	35,03 $\pm$ 5,57	51,36 $\pm$ 4,04	59,90 $\pm$ 7,63	1,70 $\pm$ 0,07	3,64 $\pm$ 0,12
Taurin 25 $\mu\text{g/mL}$	47,30 $\pm$ 7,79	25,39 $\pm$ 7,23	35,14 $\pm$ 8,76	38,29 $\pm$ 8,81	54,54 $\pm$ 7,01	61,14 $\pm$ 8,92	1,72 $\pm$ 0,13	3,96 $\pm$ 0,57
Taurin 50 $\mu\text{g/mL}$	42,85 $\pm$ 5,41	20,91 $\pm$ 2,42	30,75 $\pm$ 3,23	37,01 $\pm$ 5,26	53,50 $\pm$ 4,66	61,67 $\pm$ 5,97	1,73 $\pm$ 0,12	3,86 $\pm$ 0,68
Taurin 100 $\mu\text{g/mL}$	40,96 $\pm$ 8,82	16,71 $\pm$ 9,53	25,34 $\pm$ 12,10	29,39 $\pm$ 13,27	48,21 $\pm$ 9,73	51,47 $\pm$ 16,18	1,80 $\pm$ 0,17	3,42 $\pm$ 0,23

Tablo 13. Uzun süreli depolama sonrası 10. saniyedeki motilite değerleri ($\pm$ SD)

Antioksidanlar	1. Ay	3. Ay	6. Ay	9. Ay	12. Ay
Standart sulandırıcı	60,32 $\pm$ 2,03 ^{b,y}	50,83 $\pm$ 5,25 ^{a,x}	54,41 $\pm$ 3,52 ^{ab,xy}	50,36 $\pm$ 5,84 ^{a,x}	52,56 $\pm$ 5,83 ^{ab,x}
Rozmarinik 25 μ g/mL	75,58 $\pm$ 1,12 ^{ab,t}	68,65 $\pm$ 5,64 ^{a,zt}	72,78 $\pm$ 2,98 ^{ab,t}	76,49 $\pm$ 3,77 ^{b,i}	69,81 $\pm$ 3,43 ^{ab,z}
Rozmarinik 50 μ g/mL	73,45 $\pm$ 1,18 ^{b,zt}	69,15 $\pm$ 3,65 ^{ab,t}	75,85 $\pm$ 4,82 ^{b,t}	71,12 $\pm$ 2,97 ^{ab,ti}	65,68 $\pm$ 4,07 ^{a,yz}
Rozmarinik 100 μ g/mL	59,77 $\pm$ 0,48 ^{ab,y}	57,89 $\pm$ 1,65 ^{ab,y}	57,52 $\pm$ 3,04 ^{ab,y}	61,63 $\pm$ 3,39 ^{b,yz}	54,86 $\pm$ 4,13 ^{a,y}
Ürik asit 25 μ g/mL	60,08 $\pm$ 6,98 ^{a,y}	65,25 $\pm$ 4,82 ^{a,zt}	58,85 $\pm$ 1,63 ^{a,y}	60,30 $\pm$ 3,90 ^{a,yz}	57,82 $\pm$ 5,72 ^{a,xy}
Ürik asit 50 μ g/mL	68,38 $\pm$ 2,61 ^{a,z}	60,64 $\pm$ 0,60 ^{ab,yz}	65,68 $\pm$ 1,74 ^{bc,zt}	67,86 $\pm$ 4,35 ^{c,zt}	59,91 $\pm$ 3,89 ^{c,xy}
Ürik asit 100 μ g/mL	67,83 $\pm$ 1,23 ^{c,z}	60,68 $\pm$ 1,46 ^{ab,yz}	58,49 $\pm$ 3,15 ^{a,y}	70,48 $\pm$ 3,25 ^{c,ti}	65,39 $\pm$ 3,45 ^{bc,yz}
Taurin 25 μ g/mL	57,94 $\pm$ 3,09 ^{b,xy}	50,58 $\pm$ 0,88 ^{ab,x}	47,70 $\pm$ 7,61 ^{a,x}	55,95 $\pm$ 3,40 ^{b,xy}	56,64 $\pm$ 2,39 ^{b,x}
Taurin 50 μ g/mL	61,48 $\pm$ 5,74 ^{b,y}	56,82 $\pm$ 2,06 ^{ab,y}	58,79 $\pm$ 4,22 ^{ab,y}	51,52 $\pm$ 6,20 ^{a,x}	55,25 $\pm$ 4,57 ^{ab,x}
Taurin 100 μ g/mL	51,83 $\pm$ 4,99 ^{a,x}	60,71 $\pm$ 2,17 ^{b,yz}	54,57 $\pm$ 1,68 ^{ab,xy}	56,93 $\pm$ 4,00 ^{ab,xy}	58,38 $\pm$ 5,04 ^{ab,xy}

a, b, c Depolama süresi arasındaki farklılığı göstermektedir

x, y, z, t, i Sulandırıcılar arasındaki farklılığı göstermektedir

Tablo 14. Uzun süreli depolama sonrası 60. saniyedeki motilite değerleri ($\pm$ SD)

Antioksidanlar	1. Ay	3. Ay	6. Ay	9. Ay	12. Ay
Standart sulandırıcı	57,02 $\pm$ 3,16 ^{a,xy}	50,96 $\pm$ 5,29 ^{a,x}	52,78 $\pm$ 5,88 ^{a,x}	55,67 $\pm$ 0,95 ^{a,xy}	53,43 $\pm$ 2,87 ^{a,x}
Rozmarinik 25 μ g/mL	70,77 $\pm$ 1,33 ^{ab,t}	72,49 $\pm$ 3,18 ^{b,t}	68,87 $\pm$ 3,85 ^{ab,zt}	65,94 $\pm$ 4,40 ^{a,zt}	63,71 $\pm$ 6,32 ^{a,z}
Rozmarinik 50 μ g/mL	70,17 $\pm$ 0,59 ^{ab,t}	73,67 $\pm$ 4,91 ^{b,t}	74,71 $\pm$ 4,79 ^{b,t}	67,65 $\pm$ 6,02 ^{ab,zt}	65,15 $\pm$ 2,23 ^{a,y}
Rozmarinik 100 μ g/mL	54,61 $\pm$ 1,36 ^{ab,x}	51,33 $\pm$ 0,03 ^{a,x}	53,54 $\pm$ 2,99 ^{ab,xy}	57,47 $\pm$ 4,41 ^{b,y}	54,61 $\pm$ 3,37 ^{ab,x}
Ürik asit 25 μ g/mL	61,54 $\pm$ 2,23 ^{ab,yz}	67,47 $\pm$ 3,14 ^{b,zt}	54,58 $\pm$ 2,45 ^{a,xy}	61,20 $\pm$ 5,24 ^{ab,yz}	56,69 $\pm$ 4,36 ^{a,x}
Ürik asit 50 μ g/mL	60,99 $\pm$ 3,59 ^{ab,yz}	59,82 $\pm$ 2,83 ^{a,yz}	68,16 $\pm$ 2,53 ^{ab,xy}	64,61 $\pm$ 2,74 ^{ab,zt}	60,24 $\pm$ 7,08 ^{ab,xy}
Ürik asit 100 μ g/mL	64,81 $\pm$ 0,83 ^{ac,z}	63,35 $\pm$ 4,18 ^{abc,yz}	62,02 $\pm$ 5,30 ^{ab,yz}	69,85 $\pm$ 3,44 ^{c,t}	57,42 $\pm$ 2,23 ^{a,xy}
Taurin 25 μ g/mL	56,50 $\pm$ 2,91 ^{a,xy}	51,40 $\pm$ 3,69 ^{a,x}	52,26 $\pm$ 6,57 ^{a,x}	50,05 $\pm$ 2,37 ^{a,x}	52,55 $\pm$ 5,08 ^{a,x}
Taurin 50 μ g/mL	59,28 $\pm$ 6,56 ^{a,xyz}	59,77 $\pm$ 2,34 ^{a,yz}	54,96 $\pm$ 4,02 ^{a,xy}	55,16 $\pm$ 2,48 ^{a,xy}	52,10 $\pm$ 5,68 ^{a,x}
Taurin 100 μ g/mL	53,74 $\pm$ 3,59 ^{a,x}	58,84 $\pm$ 9,16 ^{a,xy}	58,43 $\pm$ 4,95 ^{a,xy}	49,94 $\pm$ 4,08 ^{a,x}	56,45 $\pm$ 6,58 ^{a,x}

a, b, c Depolama süresi arasındaki farklılığı göstermektedir

x, y, z, t Sulandırıcılar arasındaki farklılığı göstermektedir

2.3.3. Döllenme ve Çıkış Oranları

Kalkan balığı sperminin dondurulmasında sulandırıcılara eklenen antioksidanların çözündürme sonrası spermin döllenme kabiliyetine etkisinin belirlenmesi için yapılan çalışmanın sonuçlarına göre antioksidan ilaveli tüm gruplarda döllenme oranı standart sulandırıcıya göre daha yüksek bulunmuştur. Antioksidan ilaveli sulandırıcılardan en yüksek döllenme oranı rozmarinik asit 25 µg/mL grubunda gerçekleşmiştir. Ayrıca rozmarinik asit 25 ve 50 µg/mL, ürik asit 50 ve 100 µg/mL ile taurin 100 µg/mL gruplarındaki döllenme oranı ile standart sulandırıcı grubunun döllenme oranı arasındaki farklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Taze sperm kullanılarak yapılan döllenme işlemindeki döllenme oranı tüm gruplardan daha yüksek bulunmuştur. En düşük çıkış oranı ise standart sulandırıcı grubunda gerçekleşmiştir. Antioksidan ilaveli gruplar arasında ise en yüksek çıkış oranı rozmarinik asit 50 µg/mL ve ürik asit 50 µg/mL gruplarında gerçekleşmiştir (Tablo 15).

Tablo 15. Dondurma/çözündürme sonrası döllenme ve çıkış oranları

Antioksidanlar	Döllenme Oranı (%)	Çıkış Oranı (%)
Taze sperm	89,67±3,20 ^a	76,67±3,50 ^a
Standart sulandırıcı	70,67±1,50 ^c	55,67±5,10 ^d
Rozmarinik 25 µg/mL	81,67±2,52 ^b	67,00±2,00 ^{bc}
Rozmarinik 50 µg/mL	78,33±4,51 ^b	70,00±4,36 ^b
Rozmarinik 100 µg/mL	75,00±3,61 ^{bc}	65,33±1,53 ^{bce}
Ürik asit 25 µg/mL	75,67±3,50 ^{bc}	66,33±1,20 ^{bc}
Ürik asit 50 µg/mL	78,33±3,20 ^b	70,67±4,00 ^b
Ürik asit 100 µg/mL	80,33±3,50 ^b	68,33±3,20 ^b
Taurin 25 µg/mL	76,33±2,50 ^{bc}	61,33±2,50 ^{cde}
Taurin 50 µg/mL	75,67±1,50 ^{bc}	59,00±3,00 ^{de}
Taurin 100 µg/mL	78,56±3,50 ^b	65,33±5,50 ^{bc}

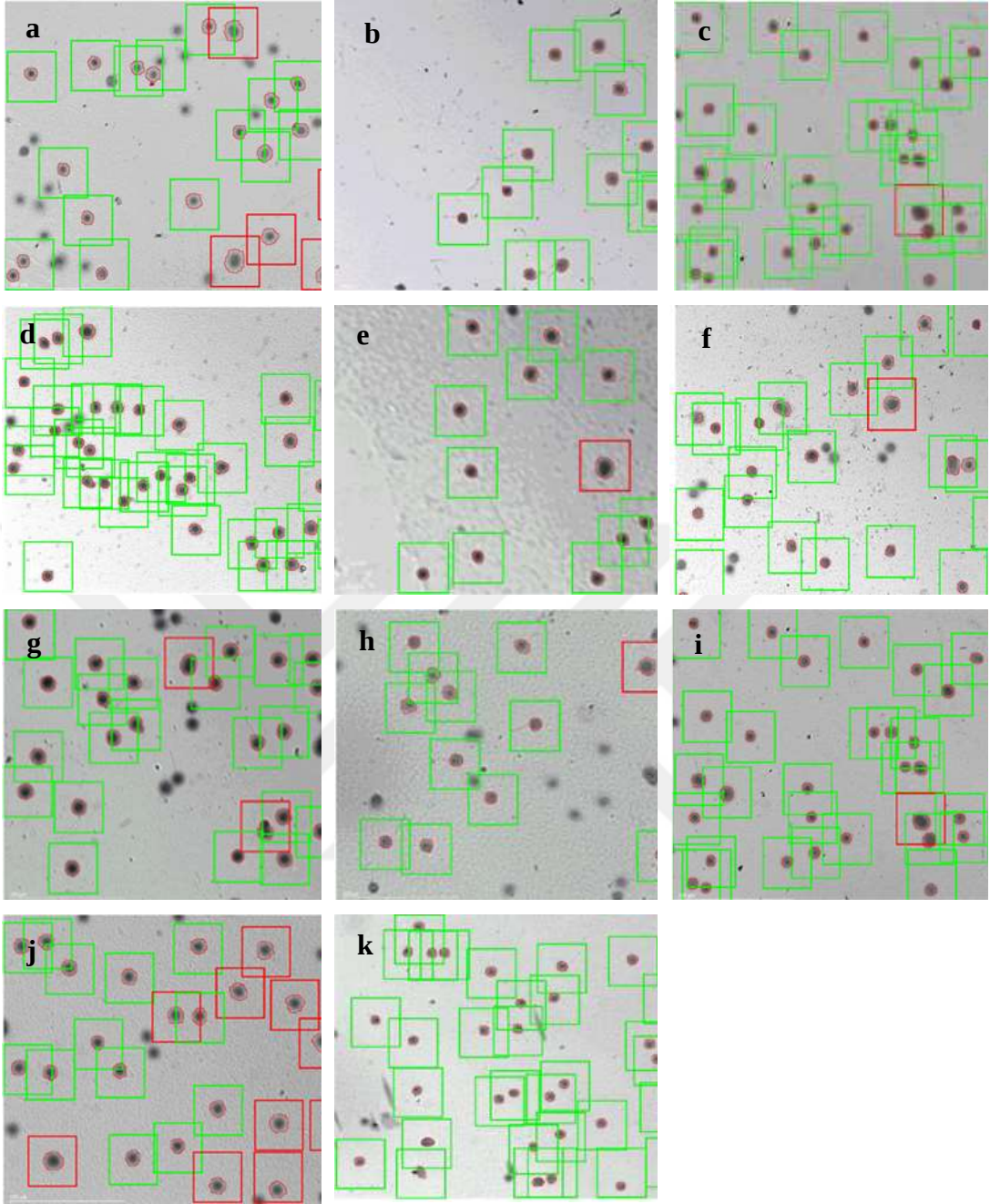
2.3.4. Antioksidanların DNA Hasarına Etkileri

Sperm kriyoprezervasyon işleminde kullanılan kimyasallar ve sıvı azot kaynaklı ultra soğuk ortam (-196 °C) sperm DNA yapısında kalıcı hasarlara neden olmaktadır. DNA hasarının belirlenmesi için uygun hale getirilen; taze ve farklı antioksidanlar ilave edilerek dondurulan/çözündürülen kalkan balığı sperm örnekleri CASA sisteminde analiz edilmiş (Şekil 12) ve DNA hasarı düzeyleri belirlenmiştir (Tablo 16). Elde edilen sonuçlar, spermilerin dondurularak saklanması ve ardından çözündürülmesi sonrasında DNA hasarında bir artış olduğunu göstermektedir. DNA

hasarı düzeyi antioksidan eklenen tüm gruplarda standart ekstender grubuna göre daha düşük olmuştur ve aradaki fark istatistiki olarak önemlidir ($p<0,05$). Antioksidan grupları arasındaki en yüksek DNA hasar oranları taurin dozlarında gerçekleşmiştir. Taurin 25 ve 50 $\mu\text{g/mL}$ ile diğer antioksidan grupları arasındaki farklar istatistiki olarak önemli bulunurken; taurin 100 $\mu\text{g/mL}$ ile diğer antioksidan grupları arasındaki farklar istatistiki olarak önemli değildir ($p<0,05$). En düşük DNA hasarları ise ürik asit 50 $\mu\text{g/mL}$ 'de ve rozmarinik 50 $\mu\text{g/mL}$ gruplarında belirlenmiştir. En düşük DNA hasar oranı taze spermde tespit edilmiş olup, taze ve kriyoprezerve edilmiş sperm grupları arasındaki DNA hasarı oranları arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$).

Tablo 16. Dondurulmuş/çözdürülmüş sperminin DNA hasarı oranları

Antioksidanlar	DNA Hasarı	
	Hasarsız DNA (%)	Hasarlı DNA (%)
Taze sperm	99,67 $\pm$ 26,83	0,33 $\pm$ 0,38 ^e
Standart sulandırıcı	71,13 $\pm$ 19,01	28,87 $\pm$ 11,26 ^a
Rozmarinik 25 $\mu\text{g/mL}$	89,73 $\pm$ 19,19	10,27 $\pm$ 2,94 ^d
Rozmarinik 50 $\mu\text{g/mL}$	94,80 $\pm$ 5,51	5,20 $\pm$ 1,11 ^{de}
Rozmarinik 100 $\mu\text{g/mL}$	90,33 $\pm$ 11,02	9,67 $\pm$ 2,79 ^d
Ürik asit 25 $\mu\text{g/mL}$	90,27 $\pm$ 9,97	9,73 $\pm$ 2,41 ^d
Ürik asit 50 $\mu\text{g/mL}$	94,93 $\pm$ 9,39	5,07 $\pm$ 1,57 ^{de}
Ürik asit 100 $\mu\text{g/mL}$	93,33 $\pm$ 5,21	6,67 $\pm$ 1,61 ^d
Taurin 25 $\mu\text{g/mL}$	83,40 $\pm$ 9,43	16,60 $\pm$ 4,92 ^{bc}
Taurin 50 $\mu\text{g/mL}$	81,07 $\pm$ 11,60	18,93 $\pm$ 2,53 ^b
Taurin 100 $\mu\text{g/mL}$	88,80 $\pm$ 14,41	11,20 $\pm$ 4,76 ^{cd}



a: RA 25 µg/mL, b: RA 50 µg/mL, c: RA 100 µg/mL, d: ÜA 25 µg/mL, e: ÜA 50 µg/mL, f: ÜA 100 µg/mL, g: TA 25 µg/mL h: TA 50 µg/mL, i: TA 100 µg/mL, j: standart sulandırıcı, k: taze sperm (yeşil çerçeve içindeki hasarsız DNA, kırmızı çerçeve içindeki ise hasarlı DNA'ya sahip spermelerdir)

Şekil 12. CASA'da DNA hasarı analiz örnekleri

3. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Su ürünleri sektöründe yetiştiriciliği yapılan ve potansiyel türlerin sperm kriyoprezervasyonu; üretimde ihtiyaç duyulan erkek birey sayısının azaltılması, gamet senkronizasyonunun sağlanması, üstün özellikli bireylerin spermalarının muhafaza edilerek kaliteli yavru üretiminin sağlanması ve gen bankacılığı gibi laboratuvar çalışmaları için önemli bir biyoteknolojik uygulama olarak değerlendirilmektedir.

Bu çalışma, Karadeniz'in ekonomik değeri en yüksek yassı balığı olan kalkan balığının sperm kriyoprezervasyonunda antioksidanların kullanımının çözdürme sonrası sperm kalitesi ve DNA hasarı üzerine etkilerini inceleyerek bu türün sperm kriyoprezervasyon tekniğinin geliştirilmesi için yapılmıştır. Ülkemizde kalkan balığını üretimi, ticari olarak yaygınlaşmamış olmasına rağmen, SUMAE tarafından başarılı bir şekilde gerçekleştirilmektedir. Atlantik kalkanında sperm kriyoprezervasyonunu geliştirmek ve çözdürme sonrası sperm kalitesini iyileştirmek için sulandırıcıların içeriğinde ve kriyoprotektan türlerinde değişikliğe gidilirken (Chereguini vd., 2000; Chen vd., 2004) bu çalışmada Karadeniz kalkan balığı sperminin dondurulmasında farklı antioksidanların etkisi araştırılmıştır. Bu çalışma aynı zamanda ülkemizde kalkan balığı sperm kriyoprezervasyonunun iyileştirilmesi için yapılan ilk çalışmadır.

Balıklarda spermin dondurularak uzun süre saklanması söz konusu olacak ise öncelikle spermi kullanılacak olan bireyin morfolojik ve genetik yönden sağlıklı olması gerekmektedir. Başarılı bir dondurma için sperm kalitesinin en üst seviyede olması elzem bir durumdur. Bu nedenle çalışmamızda ortalama ağırlığı $2100,7 \pm 341,4$ g ve ortalama boyu $47,6 \pm 1,8$ cm olarak belirlenen 5 yaşındaki kuluçkahane kökenli erkek bireyler kullanılmıştır. Çalışma, kalkan balığının doğal üreme dönemi olan ve yüksek sperm verimine sahip olduğu Mayıs ayında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada erkek bireylerden sezondaki ilk sağımalarında elde edilen spermeler kullanılmıştır. Aydın vd. (2021), kalkan balıklarından Şubat ve Temmuz ayları arasında, 6 ay boyunca sürekli sperm alınabileceğini; hacimsel olarak (mL) en yüksek sperm verimin ve kalitesinin üreme dönemi olan Mayıs ayında sağlanabileceğini, ayrıca Haziran ayından sonra ise sperm miktarı ve kalitesinde azalmanın başladığını bildirmişlerdir. Kültür ortamında kalkan balığı spermasyonu uzun sürmekte ve bu süre 9 aya kadar çıkabilmektedir (Devauchelle vd., 1988). Doğal

ortamda ise kalkan balığı spermiasyonu sadece 4 aylık bir süreyi kapsamaktadır (Jones, 1974). Benzer durum; gökkuşağı alabalığı (*Salmo gairdneri*) (Büyükhatipoğlu ve Holtz, 1984), dil balığı (*Solea senegalensis*) (Beirão vd., 2011), Atlantik halibut (*H. hippoglossus*, L) (Ding vd., 2011) ve kahverengi alabalık (*Salmo trutta*) (Hajirezaee vd., 2010) için de rapor edilmiştir.

Çalışmada ayrıca, kuluçkahane kökenli 5 yaşındaki kalkan balıklarının sperm kalite parametreleri de belirlenmiştir. Toplam 40 adet bireyin spermi tek tek alınarak gerçekleştirilen çalışmanın sonuçlarının daha önce Karadeniz kalkan balığı ve Atlantik kalkan balığı ile yapılan çalışmalar ile benzer olduğu görülmüştür.

Balık spermi yoğunluğunun belirlenmesinde farklı yöntemler olsa da çoğunlukla hemositometrik yöntemi tercih edilmektedir. Bu yöntemde thoma lamı üzerine belli oranda seyrettilerek yerleştirilen örnek içerisindeki sperm hücreleri tek tek sayılarak sperm yoğunluğu hesaplanmaktadır (Fauvel vd., 1999). Bu çalışmada da hemositometrik yöntemi tercih edilmiştir. Diğer balıklarla karşılaştırıldığında, kalkan balığının toplam sperm üretimi, sperm hacmi ve sperm konsantrasyonu düşüktür. Bu çalışmada sperm miktarı $2,09 \pm 0,50$ mL ve sperm yoğunluğu ise $1,98 \pm 0,30$ ($\times 10^9$ spz/mL) olarak bulunmuştur. Aydın vd. (2021), kuluçkane kökenli kalkan balığında yapmış olduğu çalışmada sperm yoğunluğunun $2,15 \times 10^9$ spz/mL ile $1,49 \times 10^9$ spz /mL arasında değiştiğini bildirmiştir. Polat vd. (2021), fotoperyot uygulaması ile Ocak ve Şubat ayları arasında elde ettiği spermlerin yoğunluğunun $2,18 \pm 0,15 \times 10^9$ spz/mL ile $2,24 \pm 0,10 \times 10^9$ spz/mL arasında; sperm hacminin ise $1,92 \pm 0,26$ ile $2,41 \pm 0,17$ mL arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Atlantik kalkan balığında sperm hacmi $0,2-2,2$ mL arasında, sperm yoğunluğu ise $0,7$ ile 11×10^9 spz/mL arasında değişmektedir (Suquet vd., 1998). Bu tez çalışmasında sperm hacmi ve konsantrasyonu ile ilgili elde edilen sonuçlar, hem Karadeniz hemde Atlantik kalkan balığı ile daha önce yapılan çalışmaların sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir.

Kalkan balığı sperm verimi Avrupa pisi balığından ($0,7 \pm 0,16$ mL) daha fazla olup sperm yoğunluğu ($2,7 \pm 0,16 \times 10^9$ spz/mL) (Şahin vd., 2012) ise benzer özelliktedir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre kalkan balığı diğer bazı deniz balıklarından [Atlantik halibut ($11,9-37,2 \times 10^9$ spz/mL), levrek ($10-40 \times 10^9$ spz/mL), Atlantik somonu ($13,8-16,5 \times 10^9$ spz/mL)] daha düşük sperm hacmi ve yoğunluğuna sahiptir. Ayrıca ülkemizde üretim miktarı en yüksek tatlı su balığı olan gökkuşağı

alabalığının sperm miktarı ve yoğunluğu da ($16,17 \pm 7,79$ mL; $18,48 \pm 6,37 \times 10^9$ spz/mL) kalkan balığından daha yüksektir (Kutluyer, 2014).

Kalkan balığında spermatokrit oranının spermatozoa miktar ve yoğunluğu ile ilişkili olmadığı bildirilmiştir (Suquet vd., 1994). Kalkan balığı, spermatokrit oranı % $23,4 \pm 1,6$ (Aas vd., 1991) olan Atlantik somonu ve % $25,8 \pm 3,1$ (Ciercszko ve Dabrowski, 1999) olan gökkuşağı alabalığından daha yüksek; % 65-90 olan levrek, % 23-99 (Tvedt vd., 2001) olan Atlantik halibut, % $40,72 \pm 4,23$ (Butts vd., 2011) olan Atlantik cod ve % $94,0 \pm 1,22$ (Şahin vd., 2012) olan Avrupa pisi balığından daha düşük bir orana sahiptir. Bu çalışmada belirlenen spermatokrit oranı (% $37,80 \pm 5,20$) Aydın vd. (2021) 'nin Karadeniz kalkan balığında ve Suquet vd. (1992) 'nin Atlantik kalkan balığında elde ettikleri sonuçlar ile benzerlik göstermektedir.

Birçok balık türünde olduğu gibi kalkan balığında da sperm hareketliliğinin başlangıcını sağlayan en önemli faktör ortamın ozmotik basınç (Morisawa vd., 1983) ve pH'sındaki değişimlerdir. Deniz balıklarının spermlerinin hareketliliği tatlı su balıklarına göre daha geniş bir ozmotik basınç değişimi sınırları içinde meydana gelir. Hücre içinde oluşan iyon konsantrasyonu değişimi dışarıdaki ozmotik basınç etkisiyle şişme ya da daralmaya neden olurken çoğu türde, özellikle teleost ve cyprinidaeelerde, sperm motilitesini düzenlemektedir (Aydın, 2011). Yapılan bu çalışmada bulunan ozmolarite değeri ($308,33 \pm 4,40$ mOsmol/l), Atlantik kalkan balığı ve sazan balığı ile benzer; Atlantik halibut, levrek, cod balığı ve çipura'ya göre düşük; gökkuşağı alabalığı ve Atlantik somonundan ise daha yüksektir (Suquet vd., 1994; Cosson vd., 2008).

Balıklarda da diğer türlerde olduğu gibi spermin pH'sının bilinmesi sperme uygulanacak işlemler açısından oldukça önemlidir. Balıklarda sperm pH'sı genel olarak 5,5 ile 9,5 arasında değişim göstermektedir. Deniz balıklarında sperm pH'sı daha çok suyun pH'sına yakınlık arz etmektedir. Alabalıklarda da pH büyük çoğunlukla 5-10,5 arasında bir değere sahiptir (Ciereszko vd., 2010). Kutluyer (2014), gökkuşağı alabalığında yapmış olduğu çalışmada pH'yı 7,5 olarak belirlemiştir. Bu çalışmada bulunan pH değeri ($7,10 \pm 0,20$) Aydın vd. (2021), Polat vd. (2021) ve Suquet vd. (1993)'in çalışmaları ile uyumludur.

Sperm motilite süresi; aktivasyon anından başlayan ve tüm hareketin bittiği ana kadar geçen süre olarak tanımlanmaktadır. Salmonlarda yapılan çalışmalarda sperm

motilite sürelerinin 1–2 dakika arasında değişiklik gösterdiği ve deniz balıklarında ise sperm hareketliliği süresinin genellikle alabalık, turna ve sazan balıklarından daha uzun sürdüğü bilinmektedir (Rainis vd., 2005). Yapılan bu çalışmada $19,78 \pm 2,70$ dakika olarak bulunan motilite süresi gökkuşağı alabalığı sperm motilite süresine göre oldukça yüksektir. Çalışma sonuçlarının, kalkan balığında yapılan daha önceki çalışmalardan (Aydın vd., 2021; Polat vd., 2021) çok az farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Bu farklılıkların balıkların bireysel özelliklerinden ve çevresel faktörlerden kaynaklandığı değerlendirilmektedir.

Kriyoprezervasyona tabi tutulacak olan sperm, motilite oranı bakımından değerlendirilmeye tabi tutulmalıdır. Bu çalışmada Karadeniz kalkan balığının sperm motilite oranı üreme dönemi olan Mayıs ayında belirlenmiştir. Literatür incelendiğinde kalkan balıklarında motilite oranının üreme döneminde (Mayıs-Haziran) en üst seviyeye çıktığı ve üreme dönemi sonrası düşüşe geçtiği bilgisi ile karşılaşılmaktadır (Aydın vd., 2021; Suquet, 1998). Benzer durum dil balığı (*S. senegalensis*) (Beirão vd., 2011) ve kahverengi alabalık (*Salmo trutta*) (Hajirezaee vd., 2010) için de rapor edilmiştir. Aydın vd. (2021) doğadan temin ettikleri kalkan balıkları ile kuluçkahane kökenli bireylerin sperm özelliklerini karşılaştırdıkları çalışmada sperminin aktive edilmesinden hemen sonra 5. saniyede (% 92) en yüksek motilite değerini elde ettiklerini ve sperm motilite oranının 15. dakikadan sonra önemli derece düştüğünü ifade etmişlerdir. Ayrıca doğadan yakalanan kalkan balığının sperm motilitesini kuluçkahane kökenli bireylere göre daha yüksek bulmuşlardır. Suquet vd. (2000)'nin kalkan balığından sağım yöntemi ile elde ettikleri spermin motilite oranı aktivasyon sonrası 10. saniyede % 95'in üzerinde iken 60. saniyede bu oran % 80'nin altına düşmüştür. Lanes vd. (2008) Brezilya pisi balığında (*Paralichthys orbignyanus*) taze spermin motilite oranını % 60 ± 6 , olarak bildirmiştir. Tian vd. (2008) benekli halibut (*Verasper variegatus*) balığının taze sperminin kalite durumunun değerlendirilmesi için yapmış olduğu çalışmada ilk aktivasyonda motilite oranını yaklaşık % 80'e bulmuştur. Liu vd. (2014) kırmızı mercan (*P. major*) taze sperminin antioksidan içeriği ile ilgili yapmış oldukları çalışmada sperm motilite değerinin % 85'in üzerinde olduğunu bildirmişlerdir. Kutluyer (2014) gökkuşağı alabalığında (*O. mykiss*) taze sperm motilitesini % $81,39 \pm 1,04$ bulmuştur. Bu tez çalışmasında bulunan taze sperm motilite oranı (% $92,58 \pm 2,93$) kalkan balığında daha önce yapılan

alışmalar ile benzerlik gösterirken diğerk balık türlerinden daha yüksektir. Sonuç olarak, kalkan balığı sperm motilite oranı oldukça yüksektir.

Kriyoprezervasyon, farklı şekillerde uygulanan ve kültür ortamında üretiminin artmasına yardımcı olan asırlık bir teknolojidir. Spermilerin dondurularak saklaması eski sayılabilecek bir uygulama olmamasına rağmen, su ürünleri yetiştiriciliğinde son yıllarda benimsenmiş ve konu ile ilgili çalışmalar artmıştır. Yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu dondurma protokellerinin geliştirilmesi ile ilgilidir (Betsy ve Kumar, 2020). Bugüne kadar 200'den fazla tatlı su ve deniz balık türünün spermeleri başarıyla dondurularak saklanmış ve zdrme sonrası sperm kalitesinin muhafazası konusunda teknikler geliştirilmiştir. Sperm kriyoprezervasyonu başarılı ve rutin olarak kullanılan bu prosedür olmasına rağmen sperm fonksiyonunda ciddi zararlı değişikliklere neden olmaktadır. Uygun seyrelticilerin seğimi, kriyoprotektanlar ve dondurma hızı dondurma başarısını etkileyen en önemli unsurlardır. Reaktif oksijen türlerinin dengesizliği, dondurma/zdrme sonrası hücre hasarının ana tetikleyicilerinden biri olarak kabul edilir. Kriyoprezervasyon işlemi sırasında spermatozoa antioksidan sistemi yok edilir, çünkü sperm sulandırıcılarda seyreltildiğinde seminal plazmada bulunan doğal antioksidanlar azalır. Sulandırıcıya antioksidanların eklenmesinin, zlm sperm kalitesini iyileştirdiği araştırmacılar tarafından ortaya konulmuştur (Kutluyar vd., 2016; Figueroa vd., 2016). Literatür araştırıldığında son zamanlarda, farklı balık türlerinde (*D. labrax*, *S. aurata*, *O. mykiss*, *S. fontinalis*, *P. major*, *C. auratus* ve *Salmo trutta fario*) antioksidanların seyrelticilere eklenmesi ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda, amino asit ilavesinin DNA parçalanmasını azalttığı ve DNA'yı iplik kopmalarına karşı koruduğu ve zlme sonrası sperm kalite parametrelerini iyileştirdiği bildirilmiştir (Amidi vd., 2016). Lahnsteiner vd. (2011), brook alabalığı (*S. fontinalis*) sperminin dondurulmasında sulandırıcılara 1,5 mmol/l glutatyon eklenmesinin zdrme sonrası spermin yüzme hızını arttırdığı ve % 76,3'lk bir döllenme oranının gerçekleştiğini tespit etmiştir. Kutluyar vd. (2015), goldfish (*C. auratus*) sperminin dondurulmasında seyrelticiye L-metionin eklemenin zdrme sonrasında sperm motilite hızı ve süresinde önemli bir artışa neden olduğunu bildirmişlerdir. En iyi L-metionin konsantrasyonunu ise 1,5 mM olarak belirlemişlerdir. Ayrıca L-metionin içeren sulandırıcı kontrol grubuna göre DNA hasarını azaltmıştır. Öğretmen vd. (2015) sazan (*C. carpio*) balığında

DNA hasarı bir kriyoprezervasyon hasarı olarak ifade dilmektedir. Döllenme sırasında DNA'lar bir embriyonun genomunu oluşturarak döllenmenin kalitesini belirlemektedir. Hasarlı DNA aktarılması embriyonik gelişimde problemlere ve anormal prelarva sayısında artışlara neden olabilmektedir (Kopeika vd., 2003). Balık sperminde DNA hasarlarının genellikle dondurma/çözme işlemi sırasında DNA oksidasyonu veya seyreltici içindeki kriyoprotektan maddelerin konsantrasyonunun toksisitesi ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (Martínez vd., 2012; Gosálvez vd., 2014). DNA hasarının tespiti, dondurularak saklanan spermdeki genetik anormallikleri belirlemek ve döllenmiş yumurtalardan hatalı embriyo gelişimini önlemek için kritik öneme sahiptir.

Yapılan çalışmalarda kriyoprezervasyon öncesinde spermde ROS üretimi olmadığı, ancak donma/çözdürmeden sonra ROS'ların oluştuğu tespit edilmiştir. Spermin antioksidan aktivitesinin kriyoprezervasyon ile azaldığı ve dolayısıyla spermin ROS hasarına duyarlı hale geldiği tespit edilmiştir (Halliwell vd., 1984; Gosálvez vd., 2009). Dondurarak saklamanın sperm DNA'sı üzerindeki etkisi ile ilgili balık türleri üzerinde yapılan çalışma sayısı sınırlıdır. Zilli vd. (2003) comet assay yöntemi uygulayarak, kriyoprezervasyonun levrek sperminde DNA parçalanmasına neden olduğunu ve kriyoprotektanların bu etkiyi önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir. Cabrita vd. (2005) çipura (*S. aurata*) ve gökkuşağı alabalığında (*O. mykiss*) yapmış oldukları çalışmada; özellikle gökkuşağı alabalığında kriyoprezerve edilmiş spermdeki DNA hasarı oranının (% 30,29) taze spermde (% 11,19) yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada taze çipura sperminde DNA hasarını % 28,23 olarak bulurken; 1:6 seyreltilerek yapılan dondurma sonrasında % 31,35, 1:20 seyreltmede ise % 33,16 olarak bulmuşlardır. Zilli vd. (2003), levrek (*D. labrax*) spermi kriyoprezervasyon protokolünün önemli ölçüde DNA hasarına ve dolayısıyla; motilite, membran stabilitesi ve sperm işlevselliğinin bozulmasına da neden olduğunu göstermişlerdir. Oksidatif stresi, bu fonksiyonel özelliklerdeki bozulmanın ana nedeni olarak varsaymışlardır. Jeuthe vd. (2022) *S. alpinus*'da yapmış oldukları çalışmada bireysel sperm DNA hasarı ile larva çıkış oranı ve larva canlılığı arasında bir ilişkinin varlığını bildirmişlerdir ve DNA hasarının % 24 ile % 86 arasında değişen bir oranda olduğunu göstermişlerdir. Döllenmiş yumurta oranları ile DNA hasarı arasında da güçlü bir korelasyonun varlığını bu çalışma ile ispatlamışlardır.

Son zamanlardaki çalışmaların sonuçları, kriyoprezervasyonun sperm genomunu çeşitli şekillerde etkilediğini açıkça göstermektedir. DNA hasarının çoğunlukla ROS'un neden olduğu bir lezyon olduğu anlaşılmıştır. Bu zararlı etkiyi en aza indirmek için sulandırıcılara antioksidanların eklenmesi gerektiği birçok araştırmacı tarafından da tavsiye edilmektedir (P rez-Cerezales vd., 2010; Cabrita vd., 2011; Mart nez-P ramo vd., 2013;  ğretmen vd., 2015). Bu tez çalışmasında test edilen tüm antioksidan doz gruplarındaki DNA hasarı oranının, standart sulandırıcı grubu DNA hasarı oranından istatistiki olarak anlamlı ölçüde düşük olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$). Taze kalkan balığı spermde DNA hasarı % 0,33 olarak bulunurken; antioksidan ilaveli gruplarda % 5,07 ( rik asit 50  g/mL) ile % 18,93 (taurin 50  g/mL) arasında değiştiği ve standart sulandırıcılı grupta ise DNA hasarının % 28,87 olduğu belirlenmiştir. Literatür gözden geçirildiğinde bazı antioksidanların daha az oranda etkili olabileceği bazılarının ise olumsuz etkilerinin olabileceği ifade edilmektedir. Bu çalışmada taurinin test edilen diğer antioksidanlara göre daha az etkili olduğu değerlendirilmektedir. Çalışmanın sonuçlarına göre, sulandırıcılara antioksidan ilavesinin dondurma/ zd rme sürecinde sperm parametrelerinin korunmasına ve DNA hasarı oranının daha düşük olmasına katkı sağladığı söylenebilir. Kriyoprezerve edilmiş spermde DNA hasarının düşük olması başarılı bir embriyonik gelişimin teminatı olduğu gibi kaliteli larva elde edilmesinin de garanti edilmesini sağlamaktadır. Bu alışma ile dondurulmuş kalkan balığı spermının üretimde en az kayıplara neden olacak şekilde kullanılması için sulandırıcılara antioksidan eklenmesinin önemi ortaya konulmuştur. Sperm DNA'sındaki hasar, bir dereceye kadar yumurta tarafından onarılabilir. Bu nedenle DNA'sı zarar görmüş sperm dölleme kapasitesi ve embriyo gelişim başarısı ile ilgili çalışmalar, balık sperm kalitesinin değerlendirilmesi için son derece önemlidir (P rez-Cerezales vd., 2010). Kalkan balığı spermının dondurma/ zd rme sonrası dölleme ve çıkış oranları hakkında az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada elde edilen dölleme oranları diğer kalkan balığı sperm dondurma/ zd rme deney sonuçları (Chereguini vd., 2001; Chereguini, 2003; Chen vd., 2004), halibut (*V. variegatus*) ve Atlantik halibut (*H. hippoglossus*) (Tian vd., 2008) gibi diğer balık türlerindeki çalışma sonuçlarına göre daha yüksektir. Cabrita vd. (2001) gökkuşağı alabalığında (*O. mykiss*) 0,5 ve 5 mL kriyo edilmiş sperm kullanarak yapmış oldukları çalışmada  zd rme sonrası dölleme

oranlarını sırasıyla % 90 ve %73 olarak bulmuşlardır. Chen vd. (2010) *P. major*'de yaptıkları çalışmada uzun süreli muhafazada çözündürme sonrası dölleme oranını 13. ayda % 69,22 olarak bulmuşlar ve 73. ayda dölleme oranının önemli seviyede azaldığını (% 39,56) belirlemişlerdir. Lahnsteiner vd. (2011) kaynak alabalığı (*S. fontinalis*) ve gökkuşağı alabalığında (*O. mykiss*) yaptıkları çalışmada antioksidan ilavesinin dölleme oranı üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada, kaynak alabalığında çözündürme sonrası dölleme oranı % 67,9 bulunmuş ve en yüksek dölleme oranı ise (>75) katalaz, redukte glutatyon ve metiyonin ilave edilen gruplardan elde edilmiştir. Gökkuşağı alabalığında ise; katalaz, peroksidaz, okside ve redukte glutatyon, okside ve redukte metiyonin ilave edilen gruplarda dölleme oranının % 88 ile % 92 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Kutluyer vd. (2014) gökkuşağı alabalığında 11 farklı antioksidan ile yaptıkları kriyoprezervasyonda çözündürme sonrası dölleme oranını % 77,13 ile % 90,01 arasında bulmuş ve antioksidan grupları arasındaki farkın istatistik olarak önemli olmadığını belirtmişlerdir. Çıkış oranları bakımından ise antioksidan ilave edilen sulandırıcı grupları ile standart sulandırıcı grubu arasındaki farkın önemsiz olduğunu bulmuşlardır. Yapılan bu tez çalışmasında ise antioksidan ilaveli bazı grupların (rozmarinik asit 25 ve 50 µg/mL, ürik asit 50 ve 100 µg/mL, taurin 100 µg/mL) dölleme oranları ile standart sulandırıcı grubunun dölleme oranı arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Çıkış oranı en yüksek rozmarinik asit 50 µg/mL ve ürik asit 50 µg/mL gruplarında bulunurken taurinin tüm dozlarında çıkış oranı standart sulandırıcı ile istatistiksel olarak benzer olmuştur. Yüksek dölleme oranı, antioksidanların çözüldükten sonra sperm motilitesi üzerindeki olumlu etkisinden kaynaklanmaktadır. Dölleme ve çıkış oranları, antioksidan eklenen tüm gruplarda standart sulandırıcı eklenen gruptan daha yüksek bulunmuş olmasına rağmen hiçbir grup taze sperm ile rekabet edecek durumda değildir. Çalışmadaki çıkış oranlarının literatürdeki diğer bazı balık türleriyle yapılan çalışma sonuçlarına göre daha az olduğu görülmektedir. Bu durum Karadeniz kalkan balığı sperminde dondurma/çözündürme sonrası oluşan DNA hasarının dölleme oranını çok fazla etkilemediğini, ancak embriyonik gelişimin başarılı bir şekilde tamamlanmasında olumsuz etkileri olabileceğini göstermektedir. Bu çalışmada, antioksidan ilave edilen gruplardaki çıkış oranları; Atlantik kalkanı sperm dondurma/çözündürme sonrasında Squet vd. (1998) (% $41\pm9,5$), Chereguini vd. (2003)

(% 45-60) ve Chen vd. (2004)'nin (% 34,7±3,6) elde ettikleri çıkış oranlarından daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlara göre Karadeniz kalkan balığı spermi kriyoprezervasyonunda antioksidan kullanımının spermin dölleme kapasitesi üzerindeki dondurma/çözdürme süreci kaynaklı olumsuz etkiyi azalttığı ve çıkış oranında başarılı sonuçlar alınmasını sağladığı görülmüştür.

Bu çalışmada, uzun süreli depolamada antioksidanların sperm motilitesi üzerine etkilerini belirlemek için 1, 3, 6, 9 ve 12. ay sonunda çözdürme gerçekleştirilmiş ve yapılan analizlerde tüm gruplarda motilite değerlerinde zamana bağlı olarak bir düşüşün olduğu görülmüştür. Ancak istatistiki olarak değerlendirildiğinde (1. ve 12. ay) bu düşüşün tüm gruplar için önemsiz olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Kutluyer vd. (2014) gökkuşuğu alabalığında (*O. mykiss*) spermin uzun süreli depolanmasında (1, 3 ve 6. ay) motilite değerlerinde, dölleme ve çıkış oranlarında düşüşün olduğunu ancak aylar arasındaki farkların istatistiki olarak önemli olmadığını bildirmişlerdir. Chen vd. (2014) *P. major*'da yapmış oldukları çalışmada 1. ay (% 71,33), 13. ay (% 69,22) ve 26. ay (% 60,33) sonundaki sonuçlarda önemli farklılıklar olmadığını ancak 48. ay (% 47,22) ve 73. ay (% 39,56) sonunda önemli derecede azalmaların olduğunu bildirmişlerdir. Malik vd. (2015) Frisian Holstein boğası sperminin uzun süreli (6 yıl) depolanmasında çözdürme sonrası sperm canlılığında, 1 yıl depolama ile 2 yıl depolama arasında önemli ölçüde farklılık olmadığını ($p>0,05$) ancak 4, 5 ve 6 yıllık depolama sonucunda sperm canlılığının 1. yıla göre önemli ölçüde farklılık gösterdiğini bildirmiştir. Spermin sıvı nitrojen içinde uzun süreli saklanması boğa sperminin canlılığı, hareketliliği ve anormalliği üzerinde etkileri olduğunu; bu etkilerinin muhtemelen soğutma, dondurma ve çözdürme dahil olmak üzere kriyoprezervasyon sürecinin zararlı etkisinden kaynaklandığını vurgulamışlardır. Kriyoprezervasyonun bu olumsuz etkilerini azaltmak için ROS'un etkilerini azaltacak antioksidanların kullanımlarını önermişlerdir. Park vd. (2022) yüksek ekonomik değeri olan orfoz balıklarının (*E. lanceolatus*) spermelerini % 10 DMSO ve seyrelticiye 300 mM sakaroz ilave ederek dondurmıştır. 1, 3, 4 ve 5 yıllık depolamanın ardından sperm motilitesinin 1. yılında en yüksek değerde (% 63,27) olduğunu ve 5 yıllık depolamadan sonra sperm motilite oranının azaldığını bildirmiştir. Bu çalışmada 1. yılın sonunda sperm motilite oranında önemli bir değişim olmamıştır.

3.1. Öneriler

Küresel balık üretiminde son yıllarda gerçekleşen hızlı büyümenin en önemli ögesi su ürünleri yetiştiriciliğidir. Bu büyümenin sürdürülebilirliği için kültürü yapılan veya yetiştiricilik için potansiyel türlerin üreme kalitesinin artırılması konusunda daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir. Bu noktada üretim başarısının daha yüksek seviyelerde gerçekleşebilmesi için kaliteli gametlerin elde edilmesi ve saklanması yönelik bilgiler önem kazanmaktadır.

Sperm kriyoprezervasyonu, protokollerde küçük veya büyük değişikliklerle çiftlik hayvanları, sucul canlılar ve insanlar dahil hemen hemen bütün canlılar spermalarında uygulanabilmektedir. Balık sperminin dondurulması için gerekli olan protokol günümüzde teknolojik anlamda çok az değişiklikle çeşitli balık türleri için uyarlanarak kullanılabilir. Ancak hayvancılıktan uyarlanan balık spermi kriyoprezervasyon protokolünün ve bununla ilgili mekanizmaların iyileştirilmesine ihtiyaç vardır. Sperm kriyoprezervasyon yoluyla üstün özellikli ve kaliteli spermaların muhafaza edilerek ileri dönemlerde üretimde kullanılması, elde edilecek ürünün üstün özellikte ve yüksek verimlilikte olmasına neden olacaktır.

Son yıllarda ülkemizde yetiştiriciliğe kazandırılmaya çalışılan ve yetiştiricilik için en önemli potansiyel tür olma özelliğini taşıyan Karadeniz kalkan balığının üretim tekniklerinin geliştirilmesi için sperminin dondurularak (sperm kriyoprezervasyonu) saklanması oldukça önemlidir. Bu biyoteknolojinin kalkan balığında uygulanması ile üretimde ihtiyaç duyulan erkek birey sayısının azaltılmasına, gamet senkronizasyonunda yaşanan sorunların giderilmesine, üstün özellikli bireylerin spermalarının muhafaza edilerek kaliteli yavru üretiminin sağlanmasına ve gen bankacılığı gibi laboratuvar çalışmalarına katkı sağlanacaktır.

Bu çalışmada kalkan balığının sperminin dondurulmasında kullanılan 3 farklı antioksidanın her birinin 3'er farklı dozunun çözündürme sonrası sperm kalitesi, dölleme oranı, çıkış oranı, motilite ve DNA hasarı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre antioksidan ilave edilen tüm gruplarda incelenen parametreler bakımından antioksidan ilave edilmeyen sulandırıcıya göre daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Bu nedenle kalkan balığı sperminin kriyoprezervasyonunda antioksidan kullanılmasını öneriyoruz. Çalışmamız sonuçlarına göre 25 µg/mL rozmarinik asit ve 100 µg/mL ürik asit en etkin antioksidanlar olarak belirlenmiştir.

Su ürünleri yetiştiriciliğinde spermi dondurarak saklamanın sperm kalitesi üzerindeki zararlı etkileri dikkate alınarak bilimsel çalışmalar yapılmaya devam edilmelidir. Antioksidan ilaveli sulandırıcıların uzun süreli depolamada etkisini anlayabilmek için en az 5 yıl boyunca takibinin yapılarak; sperm hareketlilik, DNA hasarı düzeyi, dölleme başarısı gibi parametrelerin incelenmesinin devam ettirilmesi gerekir. Çalışmada kullanılan antioksidanların ara dozlarının ve birbirleriyle kombinasyonlarının denenerek etkilerinin daha detaylı olarak ortaya konulması yararlı olacaktır.

Bu çalışma ile ilkez kalkan balığı sperminin dondurulmasında bitkisel kaynaklı (rozmarinik asit) antioksidan kullanılmıştır ve diğer antioksidanlara göre daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Dolayısıyla antioksidan etkisi bilinen farklı bitkisel ürünlerin kalkan balığı sperm kriyoprezervasyonunda kullanılarak sperm hareketlilik, DNA hasarı düzeyi, dölleme başarısı gibi parametreler üzerindeki etkilerinin incelenmesi gerekmektedir. Kalkan balığı sperm kriyoprezervasyonunun geliştirilmesi ve çözdürme sonrası sperm kalitesini artırmak amacıyla yapılan çalışmaların devam ettirilmesi, yetiştiricilik için ülkemizde en önemli potansiyel tür olan kalkan balığının yetiştiricilik tekniğinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

KAYNAKÇA

- Aas, G. H., Refstie, T. and Gjerde, B. (1991). Evaluation of milt quality of Atlantic salmon. *Aquaculture*, 95: 125-132. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90079-M](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90079-M)
- Agarwal, A. and Saleh, R. A. (2002). Role of oxidants in male infertility: rationale, significance and treatment. *Urologic Clinics*, 29(4): 817-827. [https://doi.org/10.1016/S0094-0143\(02\)00081-2](https://doi.org/10.1016/S0094-0143(02)00081-2)
- Agarwal, A., Gupta, S. and Sharma, R., K. (2005). Role of oxidative stress in female reproduction, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3: 1-21. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-28>
- Agarwal, N., K., Saini, V. and Raghuvanshi, S., K. (2013). Characterization and short-term storage of semen of a coldwater Himalayan fish species. *Biojournal* 8(1):1-8.
- Ahn, J., Y., Park, J., Y. and Lim, H., K. (2018). Effects of different diluents, cryoprotective agents, and freezing rates on sperm cryopreservation in *Epinephelus akaara*. *Cryobiology*, 83:60-64. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.06.003>
- Aksungur, N., Akbulut, B., Şahin, T., Üstündağ, C., Çiftçi, Y. ve Kutlu, İ. (2003). *Karadeniz’de Kalkan Balığı (Psetta maxima) Yetiştiriciliğinin Araştırılması*. Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Trabzon, 65 s.
- Alagawany, M., El-Hack1, AEM., Farag, MR. M., Gopi, M., Karthik, K., Yashpal Singh Malik, S. Y. and Dhama, K. (2017). Rosmarinic Acid: Modes of Action, Medicinal Values And Health Benefits. *Animal Health Research Reviews*, 1-10. <https://doi.org/10.1017/S1466252317000081>
- Amann, R. P. and Waberski, D. (2014). Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*, 81(1): 5-17. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.004>
- Amaoka, K., Yoseda, K., Sahin, T., Ustündağ, C. and Ciftci, Y. (2001). *Field guide: Flatfishes (order Pleuronectiformes) found in the Black Sea and its adjacent waters*. Trabzon: Central Fisheries Research Institute, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Turkey and Japan International Cooperation Agency. Special Publication No:1, Trabzon, 27s.
- Amidi, F., Pazhohan, A., Nashtaei, S. M. Khodarahmian, M. and Nekoonam, S. (2016). The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell and tissue banking*, 17(4): 745-756. <https://doi.org/10.1007/s10561-016-9566-5>
- Aydın, İ. and Şahin, T. (2011). Reproductive performance of turbot (*Psetta maxima*) in the southeastern Black Sea. *Turkish Journal of Zoology*, 35(1): 109-113. <https://doi.org/10.3906/zoo-0905-26>

- Aydın, İ., (2008). Karadeniz kalkan balığı (*Psetta maxima* Linnaeus, 1758) yumurta kalitesinin blastomer morfolojisi ile tahmin edilmesi ve triploid uygulamasının yumurta kalitesine etkilerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Rize Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Rize, 78s.
- Aydın, İ., (2011). Kültür Balıklarında Sperm Kalitesi: Kalite Parametrelerinin Ölçümü ve Kaliteyi Etkileyen Faktörler. *Yunus Araştırma Bülteni*, 1: 8-13.
- Aydın, İ., Beken, A. T., Öztürk, R. Ç., Polat, H. and Terzi, Y. (2021b). Potential Application of Cryogenic Freezer on Turbot Sperm Cryopreservation. *Cryoletters*, 43 (4): 200-205. <http://doi.org/10.54680/fr22410110312>
- Aydın, İ., Cagri Ozturk, R., Küçük, E., Polat, H. and Altınok, İ. (2022) Temperature appeared to be an effective factor on growth performance of diploid and triploid turbot, *Scophthalmus maximus*, during the early life stage, *Aquaculture*, 546. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737316>
- Aydın, İ., Öztürk, R. Ç., Polat, H., Beken, A. T., Terzi, Y., Özel, O. T. and Küçük, E. (2021a). Sperm characteristics of wild-caught and hatchery-reared turbot, *Scophthalmus maximus*, originated from the Black. Sea. *Journal of Applied Ichthyology*, 01-1. <https://doi.org/10.1111/jai.14272>
- Aydın, İ., Polat, H. and Sahin, T. (2020). Reproductive Performance of Wild and HatcheryReared Black Sea Turbot, *Psetta maxima*, in the Southern Black Sea Coast. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 20: 351-357. http://doi.org/10.4194/1303-2712-v20_5_03
- Bailey, J. L., Bilodeau, J. F. and Cormier, N. (2000). Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon, *Journal of Andrology*, 21(1): 1-7. <https://doi.org/10.1007/s10561-008-9081-4>
- Bailly, N. and ChaNet, B. (2010). *Scophthalmus* Rafinesque, 1810: the valid generic name for the turbot, *S. maximus* (Linnaeus, 1758). *Cybium*, 34(3): 257-261. <https://doi.org/10.26028/cybium/2010-343-003>
- Baliou, S., Adamaki, M., Ioannou, P., Pappa, A., Panayiotidis, M. I., Spandidos, D. A. and Zoumpourlis, V. (2021). Protective role of taurine against oxidative stress. *Molecular medicine reports*, 24:(2), 1-19. <https://doi.org/10.3892/mmr.2021.12242>
- Basavaraja, N. and Hegde S., N. (2005). Some characteristics and short-term preservation of spermatozoa of Deccan mahseer, *Tor khudree* (Sykes). *Aquaculture*, 36:422. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2109.2004.01194.X>
- Baynes, M. S. and Scott, P. A. (1987). Cryopreservation of rainbow trout spermatozoa: the influence of sperm quality, egg quality and extender composition on post-thaw fertility. *Aquaculture*, 66(1): 53-67. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(87\)90283-3](https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90283-3)

- Becker, B. F. (1993). Towards the physiological function of uric acid, *Free Radical Biology and Medicine*, 14.(6), 615-631, [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90143-i](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90143-i)
- Beirão, J., Soares, F., Herráez, M. P. and Dinis, M. T., Cabrita, E. (2011). Changes in *Solea senegalensis* sperm quality throughout the year. *Animal Reproduction Science*, 126(1–2): 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.04.009>
- Best, B., P. (2008). Scientific justification of cryonics practice. *Rejuvenation Research*, 11(2): 493–503. <https://doi.org/10.1089/rej.2008.0661>
- Betsy, J. and Kumar, S. (2020). *Cryopreservation: History and Development. In Cryopreservation of Fish Gametes*, ISBN 978-981-15-4024-0, 352p, Springer Nature Singapore Pte Ltd, Betsy, J., & Kumar, S., (Ed.), *Cryopreservation of Fish Gametes*, 135-149 p. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4025-7_6
- Bucak, M. N., Sariözkan, S. and Tuncer, P., B. (2010). The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircusancryrensis*) spermparameters, lipid peroxidation and antioxidantactivities. *Small Ruminant Research*, 89: 24-30. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.11.015>
- Bulduk, İ. ve Gökce, S. (2017). Yüzey Yanıt Metodolojisi İle Biberiye Yaparaklarından Rosmarinik Asit Ekstraksiyonunun Optimizasyonu, *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, Cilt 5, Sayı 2, Sayfa 441 – 454.
- Butts, I. A. E., Babiak, I., Ciereszko, A., Litvak, M. K., Słowińska, M., Soler, C. and Trippel, E. A. (2011). Semen characteristics and their ability to predict sperm cryopreservation potential of Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Theriogenology*, 75(7): 1290-1300. <https://doi.org/10.1016/j.2010.11.044>
- Buyukhatipoglu S. and Holtz, W. (1978). Preservation of trout sperm in liquid/frozen state. *Aquaculture*, 14:49–56. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(78\)90139-4](https://doi.org/10.1016/0044-8486(78)90139-4).
- Büyükhatipoglu, S. and Holtz, W. (1984). Sperm output in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) effect of age, timing and frequency of stripping and presence of females. *Aquaculture*, 37(1). [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(84\)90044-9](https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90044-9)
- Cabrita, E., Anel, L. and Herraéz, M., P. (2001). Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. *Theriogenology*, 56:623–635. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00594-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00594-5)
- Cabrita, E., Engrola, S. and Conceicao, L., E., C. (2008). Successful cryopreservation of sperm from a sex-reversed dusky grouper, *Epinephelus marginatus*, *Aquaculture*, 287:152–157. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.10.019>
- Cabrita, E., Ma, S., Diogo, P., Martínez-Páramo, S., Sarasquete, C. and Dinis, T. M. (2011) The influence of certain aminoacids and vitamins on post-thaw fish sperm motility, viability and DNA fragmentation. *Animal Reproduction*, 125(1-4): 189-195. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.03.003>

- Cabrita, E., Robles, V., Rebordinos, L., Sarasquate, C. and Herraiez, M. P.(2005) Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology*, 50: 144-153, <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.12.003>
- Cabrita, E., Roblesand, V. and Herráez, P. (2009). *Reproductive Aquaculture Marine and Freshwater Species*, Taylor and Francis Group, ISBN 978-0-8493-8053-2, 549p, Cabrita, E., Roblesand, V., Herráez, P. (Ed.), *Sperm Quality Assessment*, 93-147p.
- Cabrita, E., Sarasquete, C., Martínez-Páramo, S., Robles, V., Beirão, J., Pérez-Cerezales, S. and Herráez, P. M. (2010) Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *Journal of Applied Ichthyology*, 26(5): 623-635. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01556.x>
- Chanet, B. (2003). Interrelationships of Scophthamid Fishes (*Pleuronectiformes: Scophthalmidae*). *Cybum*, 27(4): 27. <https://doi.org/10.26028/cybum/2004-274-005>
- Chen, S L., Ji, S. X., Yu, C. G., Tian, S. Y., & Sha, X. Z. (2004). Cryopreservation of sperm from turbot (*Scophthalmus maximus*) and application to large-scale fertilization, *Aquaculture*, 236: 547–556. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.10.027>
- Chen, Y., K., Liu, Q. and H., Li, J. (2010). Effect of long-term cryopreservation on physiological characteristics, antioxidant activities and lipid peroxidation of red seabream (*Pagrus major*) sperm. *Cryobiology*, 61(2):189–193. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.07.003>
- Chereguini, O., Cal, R. M., Dreanno, C., De Baulny, B. O., Suquet, M. and Maisse, G. (1997). Short-term storage and cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) sperm. *Aquatic Living Resources*, 10(4): 251-255. <https://doi.org/10.1051/alr:1997028>
- Chereguini, O., De La Banda, I. G., Rasines, I. and Fernandez, A. (2001). Larval growth of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) produced with fresh and cryopreserved sperm. *Aquaculture Research*, 32(2): 133-143. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2001.00541.x>
- Chereguini, O., García De La Banda, I., Herrera, M., Martinez, C. and De la Hera, M. (2003). Cryopreservation of turbot *Scophthalmus maximus* (L.) sperm: fertilization and hatching rates. *Aquaculture Research*, 34(9): 739-747. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2003.00877.x>
- Chohan, K. R., Griffin, J. T., Lafromboise, M., De Jonge, C. J. and Carrell, D. T. (2006). Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *Journal of Andrology*, 27(1): 53-59, <https://doi.org/10.5653/cerm.2019.46.1.14>

- Ciereszko, A. and Dabrowski, K. (1993). Estimation of sperm concentration of rainbow trout, white fish and yellow perch using a spectrophotometric technique. *Aquaculture*, 109: 367-373. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(93\)90175-X](https://doi.org/10.1016/0044-8486(93)90175-X)
- Ciereszko, A. and Dabrowski, K. (2000). Effect of ascorbic acid supplement in vitro on rainbow trout sperm viability, *Aquaculture International*, 8: 1-8. <https://doi.org/10.1023/A:1009253330451>
- Ciereszko, A., Dietrich, G.J., Dietrich, M.A., Nynca, J., Kuzminski, H., Dobosz, S. and Grudniewska, J. (2010). Effects of pH on Sperm Motility in Several Salmoniformes Species: *Oncorhynchus mykiss*, *Salvelinus fontinalis*, *Salmo trutta*, *Salmo salar* and *Thymallus thymallus*. *Journal of Applied Ichthyology*, 26: 665–667. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2010.01536.x>
- Ciereszko, A., Dietrich, J. G., Nynca, J., Dobosz, S. and Zalewski, T. (2014). Cryopreservation of rainbow trout semen using a glucose-methanol extender. *Aquaculture*, 420: 275-281. <https://doi.org/10.1016/j.2013.11.014>
- Ciereszko, A., Judycka, S., Nynca, J., Słowińska, M. and Dietrich, M. A. (2020). *Factors influencing milt quality in fishes and its usefulness to cryopreservation*. ISBN 978-981-15-4024-0, 352p, Springer Nature Singapore Pte Ltd, Betsy, J., & Kumar, S., (Ed.), *Cryopreservation of Fish Gametes*, 25-67 pp. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4025-7_3
- Cloud, J. and Patton, S. (2009). *Basic Principles of Fish Spermatozoa Cryopreservation*. ISBN 978-0-8493-8053-2, 549p, Taylor and Francis Group, Cabrita, E., & Roblesand, V., Herráez, P. (Ed.), 237-249.
- Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology*, 26(3): 249-261. <https://doi.org/0.1385/MB:26:3:249>
- Cosson, J. (2004). The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. *Aquaculture International*, 12(1): 69-85. <https://doi.org/10.1023/B:AQUI.0000017189.44263.bc>
- Cosson, J. (2019). Fish sperm physiology: structure, factors regulating motility, and motility evaluation, ISBN 978-1-78923-814-3. 104p, IntechOpen, Yusuf Bozkurt (Ed.), *Biological Research in Aquatic Science*, <https://doi.org/10.5772/intechopen.77742>
- Cosson, J., Groison, A., L., Suquet, M., Fauvel, C., Dreanno, C. and Billard, R. (2008). Studying sperm motility in marine fish: An overview on the state of the art. *Journal of Applied Ichthyology*, 24(4): 460–486. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2008.01151.x>
- Çiftci, Y., Üstündağ, C., Erteken, A., Özongun, M., Ceylan, B., Haşımoğlu, A., Güneş, E., Yoseda, K., Sakamoto, F., Nezaki, G. ve Hara, S. (2002). *Karadeniz’de*

Kalkan Balığı (Psetta maxima) Yavru Üretim Tekniği. Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü, Trabzon, 82 s.

- Devauchelle, N., Alexandre, J. C., Le Corre, N. and Letty, Y. (1988). Spawning of turbot (*Scophthalmus maximus*) in captivity. *Aquaculture*, 69: 159- 184. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(88\)90194-9](https://doi.org/10.1016/0044-8486(88)90194-9)
- DeGraaf, J., D. and Berlinsky, D., L. (2004). Cryogenic and refrigerated storage of Atlantic cod and haddock spermatozoa. *Aquaculture* 234:527–540, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.11.037>
- Demir, N., 1992, İhtiyoloji. İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi İstanbul. Yayın No: 219. 391pp.
- Ding F., Lall S., P. and Li J. (2011). Cryopreservation of sperm from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*, L.) for commercial application. *Cryobiology*, 63(1):56–60. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2011.04.009>
- Diwan, A. D., Harke, S. N. and Panche, A. N. (2020). Cryobanking of Fish and Shellfish Egg, Embryos and Larvae: An Overview. *Frontiers in Marine Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00251>
- Dreanno, C., Suquet, M., Quemener, L., Cosson, J., Fierville, F., Normant, Y. and Billard, R. (1997). Cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) spermatozoa. *Theriogenology*, 48(4): 589-603. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(97\)00276-8](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(97)00276-8)
- Drevet, J. R. (2017). Sperm DNA integrity testing: a valuable addition to the tool box of infertility clinicians, *The Translational Andrology and Urology*, 6:S590–S591. <https://doi.org/10.21037/tau.2017.05.08>
- Dushkina L. A. (1975) Viability of herring (*Clupea*) eggs and fertilizing capacity of herring sperm stored under various conditions, *Journal of Ichthyology*, 15:423–429.
- Engin, S. (2012). Çipura (*Sparus aurata*, l. 1758) Spermlerinin Uzun Süreli Korunumu. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 130s.
- Eriani, K., Azhar, A., Ihdina, M., Rosadi, B., Rizal, M. and Boediono, A. (2018). Quality enhancement of aceh swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) frozen semen by supplementing β -carotene, *Tropical Animal Science Journal*, 41(1):1-7, <https://doi.org/10.5398/tasj.2018.41.1.1>
- Evans, D., 1998, The Physiology of Fishes. Second Edition. ISBN. 0-8493-8427- 3. CRC Press., Salem, USA.
- Fabbrocini, A., Lavadera, L., Rispoli, S. and Sansone, G. (2000). Cryopreservation of seabream (*Sparus aurata*) spermatozoa, *Cryobiology*, 40(1): 46,53. <https://doi.org/10.1006/cryo.1999.2220>

- FAO, (2009). *Psetta maxima*, In cultured aquatic species fact sheets. Roma, Italy, 7s.
- FAO, (2022). The State of World Fisheries And Aquaculture 2022. Sofya, Bulgaristan.
- Fauvel, C., Savoye, O., Dreanno, C., Cosson, J. and Suquet, M., (1999). Characteristics of sperm of captive sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) in relation to its fertilization potential. *Journal of Fish Biology*. 54: 356–369. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1999.tb00835.x>
- Félix, F., Oliveira, C. C. and Cabrita, E. (2020). Antioxidants in fish sperm and the potential role of melatonin. *Antioxidants*, 10:(1), 36, <https://doi.org/10.3390/antiox10010036>
- Félix, F., Oliveira, C. C. and Cabrita, E. (2021). Antioxidants in Fish Sperm and the Potential Role of Melatonin. *Antioxidants*, 10(1): 36. <https://doi.org/10.3390/antiox10010036>
- Fenkes, M., Fitzpatrick. J. L., Ozolina, K., Shiels, H. A. and Nudds. R. L. (2017). Sperm in hot water: direct and indirect thermal challenges interact to impact on brown trout sperm quality. *The Journal of Experimental Biology*, 220 (14):2513–2520. <https://doi.org/10.1242/jeb.156018>
- Fernández, J. L., Muriel, L., Rivero, M. T., Goyanes, V., Vazquez, R. and Alvarez, J. G. (2003). The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *Journal of andrology*, 24(1): 59-66. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2003.tb02641.x>
- Figuerola, E., Valdebenito. I. and Farias. J. G. (2016). Technologies used in the study of sperm function in cryopreserved fish spermatozoa. *Aquaculture Research*, 47(6):1691–1705. <https://doi.org/10.1111/are.12630>
- Franz, L. and 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.07.011>
- Genç, Y., Zengin, M., Bahar, S., Tabak, İ., Ceylan, B., Çiftçi, Y., Üstündağ, C., Akbulut, B. ve Şahin, T. (1998). *Ekonomik Deniz Ürünleri Araştırma Projesi Sonuç Raporu*, Proje No: TAGEM/IY/96/17/3/001, Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü, Trabzon, 157s.
- Glogowski, J., Kolman, R., Szczepkowski, M., Horváth, Á., Urbányi, B., Sieczyński, P. and Ciereszko, A. (2002). Fertilization rate of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*, Brandt) milt cryopreserved with methanol. *Aquaculture*, 211(1-4): 367-373. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00003-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00003-0)
- Gosálvez, J., Cortés-Gutierrez, E. and López-Fernández, C. (2009). Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation dynamics in fertile donors. *Fertil Steril* 92(1):170–173. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.05.068>

- Gosálvez, J., López-Fernández, C. and Hermoso, A. (2014). Sperm DNA fragmentation in zebrafish (*Danio rerio*) and its impact on fertility and embryo viability—implications for fisheries and aquaculture, *Aquaculture*, 433:173–182. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.036>
- Gwo J.C. (1993). Cryopreservation of black grouper (*Epinephelus malabaricus*) spermatozoa. *Theriogenology*, 39:6: 1331-1342.
- Gwo, J., Wu, C., Chang, W. P. and Cheng, H. (2003). Evaluation of damage in Pacific oyster (*Crassostrea Gigas*) spermatozoa before and after cryopreservation using comet assay. *Cryo Letters*, 24(3):171–180.
- Hajirezaee, S., Amiri, B. M. and 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. *Journal of Applied Aquaculture*, 22(2): 157–170. <https://doi.org/10.1080/10454431003736482>
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. (1984). Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet* 1(8391):1396–1397. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(84\)91886-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(84)91886-5)
- Han, M., Ding, F., Meng, Z. and Lei, J. (2015). Oxidants and anti-oxidants in turbot seminal plasma and their effects on sperm quality. *Journal of Ocean*, 14(4): 691-694, <https://doi.org/10.1007/s11802-015-2538-8>
- Hara, S., Özongun, M., Güneş, E. and Ceylan, B. (2002). Broodstock rearing and spawning of Black Sea turbot, *Psetta maxima*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2(1): 9-12.
- Harhoğlu, A. G. ve Kutluyer, F. (2011). Balıklarda sperm kalitesine yağ asitlerinin Etkisi. *The Black Sea Journal of Science*, 2(3): 37-45.
- Holtz, W. (1993). Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm: practical recommendations. *Aquaculture*, 110(1): 97-100. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(93\)90437-4](https://doi.org/10.1016/0044-8486(93)90437-4)
- Horvath, A., Wayman, W.R., Dean, J.C., Urbanyi, B., Tiersch, T.R., Mims, S.D., Johnson, D. and Jenkins, J.A. (2008). Viability and fertilizing capacity of cryopreserved sperm from three North American Acipenseriform species: a retrospective study. *Journal of Applied Ichthyology*, 24: 443–449. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2008.01134.x>
- Huang, X., Yin, Y., Shi, Z., Li, W., Zhou, H. and Lv, W. (2010). Lipid content and fatty acid composition in wild-caught silver pomfret (*Pampus argenteus*) broodstocks: effects on gonad development. *Aquaculture*, 310 (1-2): 192-199. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.10.015>
- Imaizumi, H., Hotta, T. and Ohta, H. (2005). Cryopreservation of kelp grouper *Epinephelus bruneus* sperm and comparison of fertility of fresh and

- cryopreserved sperm. *Aquatic Sciences*, 53:405–411.
<https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2005.00985.x>
- Imsland, A.K., Foss, A., Gunnarsson, S., Berntssen, M., FitzGerald, R., Bonga, S.W., van Ham, E., Nævdal, G. and Stefansson, S., O. (2001). The interaction of temperature and salinity on growth and food conversion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 198: 353–367,
[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00507-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00507-5)
- Islam, M. S. and Akhter, T. (2011). Tale of fish sperm and factors affecting sperm motility: a review, *Advances Life Sciences*, 1(1): 11-19,
<https://doi.org/10.5923/j.als.20110101.03>
- Jawahar, T., K. and Betsy, J. (2020). *Cryopreservation of Fish Gametes: An Overview*, ISBN 978-981-15-4024-0, 352p, Springer Nature Singapore Pte Ltd., Betsy, J., Kumar, S., (Ed.), *Cryopreservation of Fish Gametes*,
https://doi.org/10.1007/978-981-15-4025-7_7
- Jeuthe, H., Palaiokostas, C. and Johannisson, A. (2022). DNA fragmentation and membrane integrity in sperm of farmed Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Aquaculture*, 547: 737537.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737537>
- Jones, A. (1974). Sexual maturity, fecundity and growth of the turbot *Scophthalmus maximus* L. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 54(1): 109-125. <https://doi.org/10.1017/S0025315400022104>
- Judycka, S., Nynca, J., Liszewska, E., Dobosz, S., Grudniewska, J. and Ciereszko, A. (2018). Optimal sperm concentration in straws and final glucose concentration in extender are crucial for improving the cryopreservation protocol of salmonid sperm. *Aquaculture*, 486: 90-97.
<https://doi.org/10.1016/J.Aquaculture.2017.12.019>
- Kása, E., Bernáth, G., Kollár, T., Żarski, D., Lujić, J., Marinović, Z. and Horváth, Á. (2017). Development of sperm vitrification protocols for freshwater fish (Eurasian perch, *Perca fluviatilis*) and marine fish (European eel, *Anguilla Anguilla*., *General and Comparative Endocrinology*, 245: 102-107.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.05.010>
- Kendler, B.S. (1989). Taurine: An overview of its role in preventive medicine. *Prevent Medicine*, 18, 79, [https://doi.org/10.1016/0091-7435\(89\)90056-x](https://doi.org/10.1016/0091-7435(89)90056-x)
- Kinsey, W. H., Sharma, D. and Kinsey S., C. (2007) Fertilization and egg activation in fishes, 978-1-ISBN 4020-6233-9. 508p, Springer Science, Patrick J. Babin, Joan Cerdà, Esther Lubzens (Ed.) In: The fish oocyte: from basic studies to biotechnological application, pp 397–409, <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6235-3>

- Kirilova, I., Ivanova-Kicheva, M., Daskalova, D., Gradinarska, D., Kukov, A., Dimitrov, P. and Hristova, E. (2015). The role of antioxidants and biologically active substances on the motility and speed parameters of buffalo bull spermatozoa after cryopreservation. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 21(1): 209-214
- Kiriyakit, A., Gallardo, W., G. and Bart, A., N. (2011). Successful hybridization of groupers (*Epinephelus coioides* – *Epinephelus lanceolatus*) using cryopreserved sperm. *Aquaculture*, 320:106–112, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.05.012>
- Kopeika, J., Kopeika, E. and Zhang, T. (2003). Detrimental effects of cryopreservation of loach (*Misgurnus fossilis*) sperm on subsequent embryo development are reversed by incubating fertilised eggs in caffeine, *Cryobiology*, 46:43–52. [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(02\)00162-1](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(02)00162-1)
- Kowalski, R. K. and Cejko, B. I. (2019). Sperm quality in fish: determinants and affecting factors. *Theriogenology*, 135: 94-108, <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.06.009>
- Kutluyer, F. (2014). Gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)’nın sperm kriyoprezervasyonunda (dondurulması) antioksidanların kullanılması. Doktora Tezi. Tunceli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tunceli, 67s.
- Kutluyer, F., Benzer, F., Erişir, M., Öğretmen, F. and İnanan, B. E. (2016). The in vitro effect of cypermethrin on quality and oxidative stress indices of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spermatozoa. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 128: 63-67. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.10.001>
- Kutluyer, F., Kayim, M., Öğretmen, F., Büyükleblebici, S. and Tuncer, P., B. (2014). Cryopreservation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spermatozoa: effects of extender supplemented with different antioxidants on sperm motility, velocity and fertility. *Cryobiology*, 69(3): 462-466. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.10.005>.
- Kutluyer, F., Öğretmen, F. and İnanan, B. E. (2015). Effects of semen extender supplemented with L-methionine and packaging methods (straws and pellets) on post-thaw goldfish (*Carassius auratus*) sperm quality and DNA damage. *CryoLetters*, 36(5): 336-343.
- Labbe, C., Martoriati, A., Devaux, A. and Maisse, G. (2001). Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Molecular Reproduction and Development*, 60:397–404. <https://doi.org/10.1002/mrd.1102>
- Lahnsteiner, F. (2000a). Semen cryopreservation in the Salmonidae and in the Northern pike. *Aquaculture Research*, 31(3): 245-258. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2109.2000.00452.X>

- Lahnsteiner, F. (2000b). Morphological, physiological and biochemical parameters characterizing the over-ripening of rainbow trout eggs. *Fish physiology and Biochemistry*, 23(2): 107-118. <https://doi.org/10.1023/A:1007839023540>
- Lahnsteiner, F., Mansour, N. and Kunz, F. A. (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): 882-890. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.04.019>
- Lanes, C. F. C., Okamoto, M., Cavalcanti, P. V., Collares, T., Campos, V. F., Deschamps, J. C. and Sampaio, L. A. (2008). Cryopreservation of Brazilian flounder (*Paralichthys orbignyanus*) sperm. *Aquaculture*, 275(1-4): 361-365. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.12.025>
- Langen, K, Bakker T.C.M., Baldauf, S.A., Shrestha, J. and Thünken, T. (2017). Effects of ageing and inbreeding on the reproductive traits in a cichlid fish I: The male perspective. *The Biological Journal of the Linnean Society*, 120(4):752–761. <https://doi-org.eres.qnl.qa/10.1093/biolinnean/blw002>
- Lei, J. L. and Liu, X. F. (2010). *Culture of turbot: Chinese perspective*. ISBN 978-0-8138-0942-7, 389p, Blackwell Publishing, *Practical flatfish culture and stock enhancement*, Daniels H., V. and. Watanabe W., O. (Ed), 185-202p.
- Liu Q., H., Li, J. and Zhang, S., C. (2007). Flow cytometry and ultrastructure of cryopreserved red seabream (*Pagrus major*) sperm. *Theriogenology*, 67(6):1168–1174. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.12.013>
- Liu, Q., Wang, X., Wang, W., Zhang, X., Xu, S., Ma, D. and Li, J. (2014). Effect of the addition of six antioxidants on sperm motility, membrane integrity and mitochondrial function in red seabream (*Pagrus major*) sperm cryopreservation. *Fish Physiology and Biochemistry*, 41(2): 413-422. <https://doi.org/10.1007/s10695-014-9993-9>
- Locatello, L., Bertotto, D., Cerri, R., Parmeggiani, A., Govoni, N., Trocino, A. and Mordenti, O. (2018). Sperm quality in wild-caught and farmed males of the European eel (*Anguilla anguilla*), *Animal Reproduction Science*, 198: 167-176. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.09.016>
- Luño, V., Gil, L., Olaciregui, M., González, N., Jerez, R. A. and De Blas, I. (2014). Rosmarinic Acid Improves Function And In Vitro Fertilising Ability of Boar Sperm After Cryopreservation, *Cryobiology*, 69(1): 157-62. <https://doi.org/10.1016/J.Cryobiol.2014.07.002>
- Malik, A., Laily, M. and Zakir, M. I. (2015). Effects of long term storage of semen in liquid nitrogen on the viability, motility and abnormality of frozen thawed Frisian Holstein bull spermatozoa. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 4(1): 22-25. [https://doi.org/10.1016/S2305-0500\(14\)60052-X](https://doi.org/10.1016/S2305-0500(14)60052-X)

- Martínez, J. G., García, V. A. and Carrasco, S. P. (2012). DNA fragmentation and membrane damage of bocachico *Prochilodus magdalenae* (*Ostariophysi: Prochilodontidae*) sperm following cryopreservation with dimethylsulfoxide and glucose. *Neotrop Ichthyol*, 10:577–586. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252012005000018>
- Martínez-Páramo, S., Diogo, P., Dinis, M., T., Soares, F., Sarasquete, C. and Cabrita, E. (2013). Effect of two sulfur-containing amino acids, taurine and hypotaurine in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) sperm cryopreservation. *Cryobiology* 66(3):333–338. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.04.001>
- Martínez-Páramo, S., Pérez-Cerezales, S. and Gómez-Romano, F. (2009). Cryobanking as tool for conservation of biodiversity: effect of brown trout sperm cryopreservation on the male genetic potential. *Theriogenology*, 71:594–604, <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.034>
- Martínez-Páramo, S., Diogo, P. and Dinis, M., T. (2013). Effect of two sulfur-containing amino acids, taurine and hypotaurine in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) sperm cryopreservation. *Cryobiology*, 66(3): 333–338, <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.04.001>
- Maslova, O.N. (2002). Problems and Achievements in Seed Production of the Black Sea Turbot in Russia. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2: 23-27
- Mc Evoy, L.A. (1992). Multiple spawning in several commercial fish species and its consequences for fisheries management cultivation and experimentation. *Journal of Fish Biology*, 41: 125-136. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1992.tb03874.x>
- Metwally, M. A. A. and Fouad, I. M. (2009). Effects of l-ascorbic acid on sperm viability in male grass carp (*Ctenopharyngodonidellus*), *Global Veterinary*, 3: 132-136. [http://www.idosi.org/gv/gv3\(2\)09/10.pdf](http://www.idosi.org/gv/gv3(2)09/10.pdf)
- Morisawa, M., Suzuki, K., Shimizu, H., Morisawa, S. and Yasuda, K. (1983). Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. *Journal of Experimental Biology*, 107(1): 95-103. <https://doi.org/10.1242/jeb.107.1.95>
- Motrich, R. D., Olmedo, J. J., Molina, R., Tissera, A., Minuzzi, G. and Rivero, V. E. (2006). Uric acid crystals in the semen of a patient with symptoms of chronic prostatitis, *Fertility and sterility*, 85(3), 751-e1, <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.08.065>
- Mounib, M., S. (1978). Cryogenic preservation of fish and mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 53:13–18. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0530013>
- Mylonas, C. C., Duncan, N. J. and Asturiano, J. F. (2017). Hormonal manipulations for the enhancement of sperm production in cultured fish and evaluation of

- sperm quality. *Aquaculture*, 472: 21-44,
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.04.021>
- Nynca, J., Dietrich, G. J., Dobosz, S., Grudniewska, J. and Ciereszko, A. (2014). Effect of cryopreservation on sperm motility parameters and fertilizing ability of Brown trout semen. *Aquaculture*, 433: 62-65.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.037>
- Osipova, V. P., Berberova, N. T., Gazzaeva, R. A. and Kudryavtsev, K. V. (2016). Application of new phenolic antioxidants for cryopreservation of sturgeon sperm. *Cryobiology*, 72(2), 112-118,
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.02.006>
- Osipova, V., P., Berberova, N., T., Gazzaeva, R., A. and Kudryavtsev, K., V. (2016). Application of new phenolic antioxidants for cryopreservation of sturgeon sperm. *Cryobiology* 72(2):112–118.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.02.006>
- Öğretmen, F., İnanan, B. E., Kutluyer, F. and Kayim, M. (2015). Effect of semen extender supplementation with cysteine on postthaw sperm quality, DNA damage, and fertilizing ability in the common carp (*Cyprinus carpio*), *Theriogenology*, 83(9): 1548-1552.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.02.001>
- Özgöray, E. D., & Akçay, E. (2020). Freezing Protocol Optimization for Gilthead Seabream Sperm, *Sparus aurata* L. *Veterinaria Eurasia*, 46(2): 54-62.
<https://doi.org/10.5152/actavet.2020.19026>
- Park, J. Y., Zidni, I., Lee, Y. H., Lee, H. B. and Lim, H. K. (2022). Effect of long-term storage on the quality of cryopreserved sperm of the giant grouper, *Epinephelus lanceolatus*. *Aquaculture*, 555: 738154.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738154>
- Partyka, A., Łukaszewicz, E. and Nizanski, W. (2012). Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. *Theriogenology*, 77:1497–1504,
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.11.006>
- Pereira, J. R., Pereira, F. A., Perry, C. T., Pires, D. M., Muelbert, JRE., Garcia, JRE., Corcini, C. D. and Varela Junior, A. S. (2019). Dimethylsulfoxide, methanol and methylglycol in the seminal cryopreservation of *Suruvi*, *Steindachneridion scriptum*. *Animal Reproduction Science*, 200:7–13.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.09.024>
- Pérez-Cereales, S., Martínez-Páramo, S., Beirão, J. and Herráez, M. P. (2010). Fertilization capacity with rainbow trout DNA-damaged sperm and embryo developmental success. *Reproduction*, 139 (6): 989–997.
<https://doi.org/10.1530/REP-10-0037>

- Pérez-Cereales, S., Martínez-Páramo, S., Beirão, J. and Herráez, M., P. (2011). Evaluation of DNA damage as a quality marker for rainbow trout sperm cryopreservation and use of LDL as cryoprotectant. *Theriogenology* 74(2):282–289, <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2010.02.012>
- Person-Le Ruyet, J. (2002). Turbot (*Scophthalmus maximus*) Grow-Out in Europe: Practices, Results and Prospects. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2: 29-39.
- Polat, H. (2011). *Farklı sıcaklık ve tuzluluğun karadeniz kalkan balığı (Psetta maxima) yumurtalarının embriyonik gelişimi üzerine etkisi*. Yüksek Lisans Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, 74s.
- Polat, H., Aydın, İ., Küçük, E., Özel, O. T. ve Alp, E. (2014). Kalkan Balığında (*Psetta maxima*) Fotoperiyod Yöntemiyle Erken Dönemde Elde Edilen Spermin Özellikleri. 31/05-02/06, V Doğu Anadolu Su Ürünleri Sempozyumu, Elazığ.
- Polat, H., Ozturk, R. C., Terzi, Y., Aydın, I. and Kucuk, E. (2021). Effect of photoperiod manipulation on spawning time and performance of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture Studies*, 21(3): 109-115. https://doi.org/10.4194/2618-6381-v21_3_03
- Polat, H., Özen, M. R. and Keskin, Y. S. (2018). The embryonic development of Black Sea turbot (*Psetta maxima* Linnaeus, 1758) eggs in different incubation temperatures and salinities. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18(3): 475-482, https://doi.org/10.4194/1303-2712-v18_3_13
- Qi, W., S., Jiang, J. and Tian, Y., S. (2014). Sperm cryopreservation of kelp grouper *Epinephelus moara*. *Progress Fish Sciences* 35(1):26–33. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1000-7075.2014.01.004>
- Rainis, S., Gasco, L. and Ballestrazzi, R. (2005). Comparative study on milt quality features of different finfish species. *Italian Journal of Animal Science*, 4: 355–363. <https://doi.org/10.4081/ijas.2005.355>
- Rideout, R., M., Trippel, E., A. and Litvak, M., K. (2004). The development of haddock and Atlantic cod sperm cryopreservation techniques and the effect of sperm age on cryopreservation success. *Journal of Fish Biology*, 65:299–311. <https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2004.00449.x>
- Risopatrón, J., Merino, O., Cheuquemán, C., Figueroa, E., Sánchez R., Farías, J.G. and Valdebenito, I. (2018). Effect of the age of broodstock males on sperm function during cold storage in the trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Andrologia* 50(2):e12857. <https://doi.org/10.1111/and.12857>
- Rocha, S., Streit Jr, D. P., Marques, L. S., Varela Jr, A. S., Corcini, C. D. and Hoshiba, M. A. (2018). Toxic effects of mercury chloride on silver catfish (*Rhamdia quelen*) spermatozoa. *Aquaculture Research*, 49(2): 963-968. <https://doi.org/10.1111/are.13543>

- Rurangwa, E., Kime, D.E., Ollevier, F. and Nash, J. (2004). The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, 234, 1, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.12.006>
- Sahin, T., Erdinc, G., İ., Aydın. and İ.Z. Kurtoğlu. (2012). Sperm Characteristics of Wild European Flounder (*Platichthys flesus luscus*). *The Israeli Journal of Aquaculture*, 64: 1-6.
- Samsun, N. (2004). *Sinop yöresinde avlanan kalkan (Scophthalmus maeoticus Pallas,) 1811) balıklarının, bazı biyolojik özelliklerinin belirlenmesi üzerine bir araştırma*. Doktora Tezi, Ondokuzmayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, 171s.
- Shaliutina-Kolešová, A., Gazo, I., Cosson, J. and Linhart, O. (2013). Comparison of oxidant and antioxidant status of seminal plasma and spermatozoa of several fish species. *Czech Journal of Animal Science*, 58(7): 313-320. <https://doi.org/10.17221/6861-CJAS>
- Shiva, M., Gautam, A., K., Verma, Y., Shivgotra, V., Doshi, H. and Kumar, S. (2011). Association between sperm quality, oxidative stress, and seminal antioxidant activity, *Clinical Biochemistry*, 44:319–324. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.11.009>
- Shui, G., Wong, S.P. and Leong, L. P. (2004) . Characterization of Antioxidants and Change of Antioxidant Levels During Storage of *Manilkara Zapota* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26): 7834-7841. <https://doi.org/10.1021/jf0488357>
- Stoss, J. Gerles, L. and Holtz W. (1987). The role of sample depth in storing chilled rainbow trout (*Salmo gairdneri*) semen under oxygen. *Aquaculture*, 61:275-279. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(87\)90155-4](https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90155-4)
- Suquet, M. (1998). The ageing phenomenon of turbot spermatozoa: Effects on morphology, motility and concentration, intracellular ATP content, fertilization, and storage capacities. *Journal of Fish Biology*, 52(1): 31–41. <https://doi.org/10.1006/jfbi.1997.0556>
- Suquet, M., Billard, R., Cosson, J., Dorange, G., Chauvaud, L., Mugnier, C. and Fauvel, C. (1994). Sperm features in turbot (*Scophthalmus maximus*): a comparison with other freshwater and marine fish species. *Aquatic Living Resources*, 7(4): 283-294. <https://doi.org/10.1051/alr:1994031>
- Suquet, M., Dreanno, C., Fauvel, C., Cosson, J. and Billard, R. (2000). Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research*, 31(3), 231-243. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2000.00445.x>
- Suquet, M., Omnes, M. H., Normant, Y. and Fauvel, C. (1992). Assessment of sperm concentration and motility in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 101(1–2): 177–185. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(92\)90241-C](https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90241-C)

- Suzuki, N., Nishida, M., Yoseda, K., Üstündağ, C., Şahin, T. and Amaoka, K. (2004). Phylogeographic relationships within the Mediterranean turbot inferred by mitochondrial DNA haplotype variation. *Journal of Fish Biology*, 65(2): 580-585. <https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2004.00433.x>
- Şahin, T. (2003). Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Biyoteknoloji. *Yunus Arastırma Bülteni*, cilt.1, 2-3.
- Şahin, T., (2001). Larval rearing of the black sea turbot, *Scophthalmus maximus* (Linnaeus, 1758), under laboratory conditions, *Turkish Journal of Zoology*, 25: 447 – 452.
- Tian, Y. S., Chen, S. L., Ji, X. S., Zhai, J. M., Sun, L. J., Chen, C. and Su, P. Z. (2008). Cryopreservation of spotted halibut (*Verasper variegatus*) sperm. *Aquaculture*, 284(1-4): 268-271. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.07.047>
- Tian, Y., S., Chen, Z., F. and Duan, H., M. (2017). The family line establishment of the hybrid Epinephelusmoara *E. lanceolatus* by using cryopreserved sperm and the related genetic effect analysis. *Journal Fish China*, 41(10):1–12. <https://doi.org/10.11964/jfc.20161210630>
- Tian, Y., S., Jiang, J. and Wang, N. (2015). Sperm of the giant grouper: cryopreservation, physiological and morphological analysis and application in hybridizations with red-spotted grouper. *Journal of Reproduction*, 61(4):333–339. <https://doi.org/10.1262/jrd.2014>
- Truscott, B., Idler, D. R., Hoyle, R. J. and Freeman, H. C. (1968). Sub-zero preservation of Atlantic salmon sperm, *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 25(2): 363-372. <https://doi.org/10.1139/f68-028>
- Tvedt, H. B., Benfey, T. J., Martin-Robichaud, D. J. and Power, J. (2001). The relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. *Aquaculture*, 194(1-2). [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00516-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00516-0).
- URL-1. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü. <https://www.fao.org/3/ca5299en/ca5299en.pdf> (03.01.2022, 15:30)
- URL-2. <https://www.tarimorman.gov.tr/BSGM/Belgeler/Icerikler/Su%20%C3%9Cr%C3%BCnleri%20Veri%20ve%20D%C3%B6k%C3%BCmleri%20ve%20Bilgi%20Kaynakları%20Bölümü/Bsgm-istatistik.pdf> (29.09.2022, 10:20)
- URL-3. Türkiye İstatistik kurumu. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Su-Urunleri-2021-45745> (04.12.2022, 13:30)
- URL-4. Tarım ve Orman Bakanlığı <https://www.tarimorman.gov.tr/BSGM/Menu/32/Bilgi-Dokumanlari> (03.01.2022, 16:30)

- URL-5. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü. [https://www.fao.org/fishery/statistics- query/en/aquaculture](https://www.fao.org/fishery/statistics-query/en/aquaculture) (13.01. 2022, 11:30).
- Valcarce, D. G. and Robles, V. (2016). Effect of captivity and cryopreservation on ROS production in *Solea senegalensis* spermatozoa. *Reproduction*, 152(5): 439-446. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0270>
- Valdebenito, I. I., Gallegos, P. C. and Effer, B. R. (2015). Gamete quality in fish: evaluation parameters and determining factors. *Zygote*, 23(2): 177-197. <https://doi.org/10.1017/S0967199413000506>
- Viveiros, A. T. M., Nascimento, A. F., Orfão, L. H. and Isaú, Z. A. (2010). Motility and fertility of the subtropical freshwater fish streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) sperm cryopreserved in powdered coconut water. *Theriogenology*, 74(4): 551-556. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.03.018>
- Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60: 481-492. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00099-3](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00099-3)
- Wayman. W. R., Tiersch T. R., & Thomas R. G. (1998). Refrigerated storage and cryopreservation of sperm of red drum, *Sciaenops ocellatus* L. *Aquaculture Research*, 29:267–273. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00158-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00158-1)
- Yang, H., Hu, E., Buchanan, J. T. and Tiersch, T. R. (2018). A Strategy for Sperm Cryopreservation of Atlantic Salmon, *Salmo salar*, for Remote Commercial-scale High-throughput Processing. *Journal of the World Aquaculture Society*, 49(1): 96-112. <https://doi.org/10.1111/jwas.12431>
- Yeni, D., Inanc, ME., Avdatek, F., Tuncer, PB., Cil, B., Turkmen, R. and Tasdemir, U. (2018). Supplementation of Rosmarinic Acid Has Reduced Oxidative Stress on Bull Spermatozoa Following the Freeze Thawing Process. *Cryo Letters*, 39(2): 156-165.
- Yongsheng, T., Jingjing, Z., Zhentong, L., Ziqi, L. and Linna, W. (2020). *Cryopreservation of Marine Fish Sperm*, ISBN 978-981-15-4024-0, 352p, Springer Nature Singapore Pte Ltd., Betsy, J., Kumar, S., (Ed.), *Cryopreservation of Fish Gametes*, 187-210, https://doi.org/10.1007/978-981-15-4025-7_9
- Yusoff, M., Hassan, B., N. and Ikhwanuddin, M. (2018). Successful sperm cryopreservation of the brown-marbled grouper, *Epinephelus fuscoguttatus*, using propylene glycol as cryoprotectant. *Cryobiology*, 81:168–173. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.01.005>
- Zengin, M. (2000). *Türkiye'nin doğu Karadeniz kıyılarındaki kalkan (Scophthalmus meocticus, Pallas, 1811) balığının biyoekolojik özellikleri ve popülasyonu*

parametreleri. Doktora Tezi. Karadeniz, Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 221s.

Zengin, M., Polat, H., Kutlu, S., Gümüş, A., Gül, M., Can T., Mısır, D. S., Başçınar, S. N. ve Emiral, H. (2007). Yetiştiricilik Yoluyla Üretilen Kalkan (*Psetta maxima*) Balığı Yavrularının Doğal Stoka Katılımları ve Biyoekolojik Özelliklerinin İncelenmesi. Projesi Sonuç Raporu, No: TAGEM /HAYSÜD/2000/17/03/010, Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü, Trabzon, 181s.

Zhang, K., Mai, K., Xu, W., Liufu, Z., Zhang, Y., Peng, M. and Ai, Q. (2017). Effects of dietary arginine and glutamine on growth performance, nonspecific immunity, and disease resistance in relation to arginine catabolism in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture*, 468: 246-254, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.10.021>

Zilli, L., Schiavone, R. and Zonno, V. (2003). Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation. *Cryobiology*, 47:227–235. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2003.10.002>

Zilli, L., Schiavone, R., Zonno, V., Rossano, R., Storelli, C. and Vilella, S. (2005). Effect of cryopreservation on sea bass sperm proteins, *Biology of Reproduction*, 72(5): 1262-1267.

ETİK KURUL KARARI



T.C.
TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI
Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü
Müdürlüğü -Trabzon



Trabzon 28/01/2022

Oturum : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 2022 Yılı 1.Oturumu
Sayı : 325.04.02-10
Proje Başlığı :Karadeniz Kalkan Balığı (*Psetta maxima*) Sperminin Dondurulmasında Antioksidan Kullanımı ve DNA Hasarı Üzerine Etkileri
Proje Yürütücüsü : Hamza POLAT
Proje Ekibi : Doç. Dr. İlker Zeki KURTOĞLU, Dr. Atife Tuba BEKEN

Bu çalışmanın hiçbir bölümünde:
İnsan embriyosu ve fötüsü kullanılması
İnsan embriyosu ve fötüsü dokularının kullanılması
Diğer insan doku ve hücrelerinin kullanılması
İnsanlarda araştırma
İnsan olmayan primatların kullanılması
Hayvanlarda genetik modifikasyon öngörülmemiştir.

Bu çalışmanın yapılmasında etik açıdan bir sakınca bulunmamaktadır.

Dr. Bülal AKBULUT Başkan Balıkçılık Teknolojisi Müh.	Dr. Mustafa TÜRE Başkan Yardımcısı Veteriner Hekim	Dr. Ahmet Faruk YEŞİLSU Üye Gıda Mühendisi
Dilek FIDAN Üye Kimya Yük. Müh.	Dr. Sebahattin KUTLU Üye Balıkçılık Teknolojisi Müh.	Hamza POLAT Üye Balıkçılık Teknolojisi Müh.
Şifin FIRIDİN Üye Uzman Biyolog	Osman ÖZCAN Üye	

Bu rapor sadece Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü birimlerinde yapılacak deneyler için geçerlidir.

Adres :Vali Adil Yazar Cad., 14 Kaşüstü, 61250 Yomra, TRABZON
Santral : (0462) 341 10 53-56 Müdürlük : (0462) 341 10 54-55
Faks : (0462) 341 11 52 E-Posta : sumae@tarimorman.gov.tr

Ayrıntılı Bilgi: Cemil ALTUNTAŞ
Tel: (0462) 341 10 53 – 3120
WEB: <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/sumae>