

RESEARCH ARTICLE

J Res Vet Med. 2021; 40 (2) 120-124

DOI:10.30782/jrv.991436

Arı Spermasının Dondurma-Çözdürme Sonrası Spermatolojik Parametreleri Üzerine Metiyonin ve Sisteaminin Etkileri

 Selim Alçay^{1*},  Selvinar Çakmak²,  Ahmet Aktar¹,  İbrahim Çakmak²

¹ Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama A.D., Görükle Kampüsü, Bursa

² Bursa Uludağ Üniversitesi, Arıcılık Geliştirme-Uygulama ve Araştırma Merkezi-AGAM, Görükle Kampüsü, Bursa

Received 05-09-2020 Accepted 11-11-2020

Özet

Bu çalışmada arı spermasının (*Apis mellifera*) dondurulmasında metiyonin ve sisteaminin etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Sperma olgun erkek arılardan toplandı ve pooling yapıldı. Pooling yapılan sperma beş eşit hacme bölündü ve farklı konsantrasyonlarda metiyonin (2.5 and 5 mM) ve sisteamin (2.5 and 5 mM) içeren ve içermeyen (kontrol) sulandırıcılar ile sulandırıldı. Eritme sonrası motilite değerleri; Metiyonin5, Sisteamin2,5 ve Sisteamin5 gruplarında kontrol grubuna göre daha üstün bulundu ($P<0.05$). Antioksidan gruplarının plazma membran bütünlüğü kontrol grubuna göre daha iyi koruduğu görüldü ($P<0.05$). Akrozomal bütünlük oranları metiyonin gruplarında kontrol grubuna göre daha üstün bulundu ($P<0.05$). Membran lipid peroksidasyonu eritme sonrası malondialdehit (MDA) konsantrasyonu ölçülerek analiz edildi. Antioksidan içeren sulandırıcıların bal arısı spermatolojik parametreler üzerinde faydalı etkilere sahip olduğu görüldü. Değerlendirilen spermatolojik parametreler göz önüne alındığında; Metiyonin5 grubu arı spermasının dondurulmasında en etkili grup olduğu görüldü.

Anahtar sözcükler: Bal Arısı, Sperma Dondurma, Metiyonin, Sisteamin

Abstract

In this study, it was aimed to determine the effects of methionine and cysteamine in the cryopreservation process of drone semen (*Apis mellifera*). Semen samples were collected from sexually mature drones and pooled. The pooled semen was then divided into five equal volumes and diluted with different concentrations of methionine (2.5 and 5 mM), cysteamine (2.5 and 5 mM) and control. Post-thawed motility values; Methionine5, Cysteamine2,5 and Cysteamine5 groups had a positive effect on compared to the the control group ($P<0.05$). It was observed that the antioxidant groups protected the plasma membrane integrity better than the control group ($P<0.05$). Acrosomal integrity rates was better in the methionine groups compared to the control group ($P<0.05$). Membrane lipid peroxidation was analyzed by measuring malondialdehyde (MDA) concentration post-thawed. It was observed that antioxidant-containing extenders had beneficial effects on drone semen parameters. Considering the semen parameters; The Methionine5 group was found to be the most effective group for freezing drone semen.

Keywords: Honey Bee, Semen Cryopreservation, Methionine, Cysteamine

Giriş

Arıcılık, hayvansal ve bitkisel üretim modellerinin entegrasyonunun sağlanmasında vazgeçilmez öneme sahiptir.¹ Balın ve diğer arı ürünlerinin insan sağlığına olan katkılarının son yıllarda daha iyi anlaşılması, gerek gıda ve

gerekse tedavi ve kozmetik amacıyla kullanım alanlarının yaygınlaşmasına neden olmuştur.²

Arı yetiştiriciliğinde koloni verimliliği arıcılığın sürdürülebilirliği için önemlidir. Koloni verimliliğinde genetik potansiyel yönünden ana arının etkisi kadar erkek arılar

* Corresponding author: Selim Alçay, Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama A.D., Görükle Kampüsü, Bursa (16059) Tel: +90 224 2941356, e-posta: salcay@uludag.edu.tr

da önemli etkiye sahiptir. Yeterli sayıda ve kaliteli erkek arı ile çiftleşemeyen ana arıların, istenilen miktarda sperma depolayamadıkları için bazen bir arıcılık sezonunu dahi çıkaramamaktadır ve bu nedenle ekonomik kullanım süreleri de kısa olmaktadır.^{3,4} Ayrıca, yetersiz ana arılı koloniler yeterli işçi arı kadrosuna sahip olamadıkları için bu kovanlarda istenilen bal miktarına ulaşamaz.² Bu sebeple ana arı yetiştiriciliği yapan işletmelerde öncelikli olarak yüksek genetik özelliğe sahip fertil arı spermalarının kullanımına önem arz etmektedir.⁵

Arı spermasının fertilizasyon yeteneğini kaybetmeden uzun süre saklanabilmesi, üstün genetik özellikteki gen hatlarının seçimi ve korunmasına katkı sağlar.² Ayrıca, sıklıkla karşılaşılan varroasis ve koloni çöküş sendromu gibi kitlesel arı ölümlerine yol açan hastalıklar sonucu kaybolan gen kaynaklarının muhafaza edilmesi ve tekrar canlandırılması için arı spermasının dondurularak saklanması önem arz etmektedir.⁶ Arı spermasının dondurulmasıyla ilgili birçok çalışma yapılmıştır.^{15,18} Fakat henüz donmuş sperma kullanılarak yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar istenilen düzeye ulaşamamıştır.²

Dondurma eritme uygulamaları esnasında soğuk şoku,⁷ buz kristalleri oluşumu ve oksidatif stres⁸ spermanın membran yapısını değiştirerek membran fonksiyonel bütünlüğünü⁷ ve DNA bütünlüğünü⁹ olumsuz etkilemektedir. Ayrıca, hücre içi enzim ve lipid salınımının artışı sonucu reaktif oksijen türleri (ROS) aktivitesi ile lipid peroksidasyonuna sebep olarak, spermatozoon üzerinde fiziksel, biyokimyasal ve fonksiyonel hasarlar oluşturmaktadır.¹⁰ Bu olumsuz değişikliklerin motilitenin düşmesine ve fertilizasyon yeteneğinin azalmasına neden olduğu bildirilmektedir.⁹

Sulandırıcılara ilave edilen antioksidanlar dondurmadan kaynaklanan lipid peroksidasyonunu kontrol altına almakta ve ROS oluşumunu engelleyerek spermatozoanın fertilizasyon yeteneğini korumaktadır.^{11,12} Bu nedenlerden dolayı arı spermasının dondurulması sırasında sulandırıcılara ilave edilen antioksidan maddelerin dondurma-eritme sonrası spermatolojik parametreler üzerine olumlu etkileri olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada; Metiyonin ve Sisteamin'in arı spermasının dondurma-eritme işlemleri sonrası motilite, plazma membran ve akrozomal bütünlük üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Erkek arıların üretimi

1000 adet erkek arının üretilmesi amacıyla güçlü, sağlıklı ve en az 6 ay süre ile ilaç kullanılmayan uygun kolonilerden faydalanıldı. Seçilen kovanlara erkek arılar için üretilmiş hücre çapı geniş olan erkek arı petekleri yerleştirildi. Bu

kolonilere arı keki (yaş arı poleni, bal ve pudra şekeri karışımı) verilerek gıda desteği sağlandı.¹³

Spermanın Alınması

Arılarda üreme içgüdüsünün en fazla olduğu Nisan - Haziran aylarında sperma toplama işlemi gerçekleştirildi. Spermanın alınacağı gün, 14 günlük ve daha büyük yaşta ki olgun erkek arılar toplanarak laboratuvara getirildi ve sperma toplama zamanına kadar uygun sıcaklık ve besin ortamında bekletildi.

Sperma toplamak amacıyla, suni tohumlama amacıyla geliştirilmiş Schley Tohumlama aleti (Schley Enstrumental Tohumlama Ekipmanı 12.01, Lich, Almanya) kullanıldı. Bu amaçla 0,8 µL fizyolojik tuzlu su çekilerek enjektör hazır hale getirildi. Daha sonra laboratuvara getirilen erkek arı baş ve thoraks kısmından sabitlenerek abdemenin nazikçe sıkılması ile sperma kesesi dışarı çıkarıldı.¹⁴ Stereo mikroskop altında her erkek arıdan yaklaşık 0,8-1 µL hacimde sperma enjektöre çekildi.

Spermanın sulandırılarak dondurulması

Çalışmada Alçay ve ark.¹⁵ arı spermasını dondurmada kullandıkları tek aşamalı sulandırma prosedürü [100 mL distile su, Na-Sitrat 2.43g, NaHCO₃ 0.21g, KCl 0.04 g, Amoksisilin 0.03 g ve Katalaz 200 mL (PH 8.1)] kullanıldı. Gruplar; kontrol (antioksidan içermeyen), Metiyonin 2,5 mM (Met2,5), Metiyonin 5 mM (Met5), Sisteamin 2,5 mM (Sist2,5), Sisteamin 5 mM (Sist5) şeklinde oluşturuldu.

Pooling yapılan sperma (20 µL) beş eşit hacme bölündü. Sulandırıcılar ile 1:12 oranında sulandırılıp; sıcaklığı 1 saat içerisinde 50C'a düşürüldü ve ardından 50C'ta 2 saat ekilibrasyona bırakıldı. Ekilibrasyon sonrası sperma 0,25 mL'lik farklı payetlere çekildi. Payete çekme işlemi amacıyla: her bir grup için payetin bir ucuna uygun gruba ait sulandırıcı (20 µL) çekildikten sonra yaklaşık 10 µL hava boşluğu bırakıldı, ardından 50 µL sperma, sonra tekrar hava ve sulandırıcı çekilerek farklı renklerde polivinilpirolidol (PVP) kapama tozları ile kapatıldı. Payetlere çekilen sperma, programlanabilir sperma-embriyo dondurma makinesi (Nicol plus PC- Air Liquide, Marne-la-Vallée Cedex 3, France) ile donduruldu.

Spermanın Muayenesi

Motilite Muayenesi

Spermanın motilite muayenesi amacıyla; bir damla sperma (5µL), çalışmada kullanılacak baz sulandırıcı ile sulandırılıp üzerine lamel kapatıldıktan sonra, faz-kontrast mikroskop altında, x400 büyütmede sübjektif olarak incelendi ve % olarak ifade edildi.

Sperm Membran Bütünlüğünün Muayenesi

Spermanın membran fonksiyonel bütünlüğü için water test kullanıldı. 15 250 µL distile su üzerine 1.0 µL sperma eklenerek 5 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkubasyonun hemen ardından 1 damla sperma lam üzerine damlatılarak üzeri lamel ile kapatılıp ve Faz-Kontrast mikroskop (400x) altında değerlendirildi. En az 200 hücre değerlendirilerek kuyruğu kıvrılmış olan spermatozoonların oranı % olarak belirlendi.¹⁵

FITC PSA ile Akrozomal Bütünlüğün Muayenesi

5-10 µL yıkanmış sperma örneği (25-50x106 mL/spermatozoa) ile frotiler hazırlanarak havada kurutuldu. Daha sonra kurutulan frotiler 4°C sıcaklıkta aseton ile 10 dakika tespit edildikten sonra karanlıkta 30 dakika FITC PSA (50 µg/mL fosfatlı tampon solüsyonu) ile boyandı. Boyama işleminden sonra Fosfatlı Tampon solüsyonu ile yıkanıp gliserol ile kaplanarak floresan mikroskop altında incelendi. Akrozomun tamamı yeşil görünen spermatozoitler sağlam olarak değerlendirildi. Her bir preparattan en az 200 spermatozoa incelenerek sağlam akrozoma sahip spermatozoa oranı (%) belirlendi.¹⁶

Malondialdehide (MDA) Konsantrasyonu Tespiti

Lipid peroksidasyon indikatörü olan MDA konsantrasyonları tespiti için tiyobarbitürik asit reaksiyon testi kullanıldı.¹⁷ Bu amaçla 1mL sulandırılmış sperma örneği (250x106 spermatozoa/mL) proteinleri çöktürmek için 1mL soğutulmuş %20 trikloroasetik asit ile karıştırıldı. Çökelti santrifüje edilerek pellet haline getirildi (15dk. ve 960 x g) ve 1mL süpernatant, 1 mL %0.67 konsantrasyondaki tiyobarbitürik asit ile 100°C'ta 10 dakika boyunca su banyosunda inkübe edildi. Soğutulan örneklerin absorbans değerleri spektrofotometre aracılığı ile 532nm dalga boyu değerinde ölçüldü ve değerler nmol/mL olarak ifade edildi.

İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen tüm veriler SPSS (Windows için SPSS 23.0; SPSS, Chicago, IL, ABD) kullanılarak analiz edildi ve sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi. Normallik testi olarak Shapiro Wilk testi kullanıldı. Semen parametreleri tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından Tukey kullanılarak analiz edildi. P<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Çalışmada, pooling yapılan taze semen örneklerinin motilite, plazma membran fonksiyonel bütünlük ve akrozom bütünlük oranları sırasıyla 86.00±2.24, 88.80±2.17 ve 91.00±1.58 idi. Sperma kalitesi, taze sperma ile karşılaştırıldığında kriyoprezervasyon işleminden olum-

suz yönde etkilenmiştir (P<0.05). Metiyonin ve sisteamin konsantrasyonlarının eritme sonrası spermatolojik parametreleri üzerindeki etkileri tablo 1' de gösterilmektedir. Bu çalışmadan elde edilen eritme sonrası motilite değerleri; Met5, Sist2,5 ve Sist5 gruplarında kontrol grubuna göre daha üstün bulunmuştur (P<0.05). Plazma membran bütünlüğü bakımından değerlendirildiğinde antioksidan grupları kontrol grubuna göre membran bütünlüğünü daha iyi korumuştur (P<0.05). Met2.5 grubu diğer antioksidan gruplarına göre daha düşük membran bütünlüğü oranına sahiptir (P<0.05). Akrozomal bütünlük oranları metiyonin gruplarında kontrol grubuna göre daha üstün bulunmuştur (P<0.05). Sisteamin grupları ve kontrol grubu arasında istatistiksel bir fark bulunmamaktadır (P>0.05). MDA değerleri bakımından Metiyonin grupları ve Sist5 grubu kontrol grubuna göre daha üstün değerlere sahiptir (P<0.05) ve antioksidan grupları arasında bir fark bulunmamaktadır (P>0.05).

Tablo 1: Farklı sulandırıcı gruplarında çalışılan arı spermasının eritme sonrası parametrelerinin ortalaması.

Gruplar	Motilite (%)	HOST (%)	PSA (%)	MDA (nmol/mL)
Kontrol	53.46±3.68 ^a	58.46±3.15 ^a	82.26±2.08 ^a	4.93±0.96 ^a
Met2,5	55.66±4.16 ^{ac}	61.66±2.58 ^b	85.40±2.41 ^b	4.06±0.79 ^b
Met5	61.33±3.51 ^b	66.66±2.66 ^c	85.46±2.23 ^b	3.46±0.74 ^b
Sist2,5	57.66±3.71 ^c	64.73±3.71 ^c	83.73±2.43 ^{ab}	4.33±0.89 ^{ab}
Sis5	57.21±3.72 ^c	64.42±3.20 ^c	83.50±2.59 ^{ab}	3.78±0.80 ^b

Veriler, Ortalama ± S.S. olarak verilmiştir.

Aynı satır içindeki farklı harfler gruplar arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir (P< 0.05).

Tartışma ve Sonuç

Spermanın başarılı bir şekilde dondurulması, genetik materyalin uzun süre korunmasını sağlar. Ancak dondurma-eritme işleminin; soğuk şoku, buz oluşumu ve lipid peroksidasyonu nedeniyle spermanın fertilizasyon yeteneği üzerinde olumsuz etkileri olduğu bilinmektedir. Bu istenmeyen etkiler spermanın motilitesini, canlılığını, plazma membran bütünlüğünü ve akrozom bütünlüğünü azaltır.^{9,18} Çalışmamızda, Metiyonin ve Sisteamin'in arı spermasının dondurma-eritme işlemleri sonrası motilite, plazma membran ve akrozomal bütünlük üzerine etkileri belirlenmiştir.

Motilite spermanın değerlendirilmesinde temel kalite parametrelerinden biridir.^{9,19} Bu çalışmada, eritme sonrası motilite oranları Met5 grubunda diğer gruplara göre daha yüksek olduğu görüldü. (P<0.05). Farklı sulandırıcılarla dondurulan arı spermalarının eritme sonrası motilite değerleri %25 - %62 arasında değişmektedir.²⁰ Çalışmamız, antioksidan gruplarında eritme sonrası motilitenin bu çalışmaların bulgularıyla iyi bir uyum içinde olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda Met5 ve sisteamin grupları motilite üzerinde belirgin bir artış sağlasa da, eritme sonrası Met2.5 grubu kontrol grubuna göre istatistiksel fark yaratmak için yeterli etkiye sahip olmadığı görülmüştür

($P>0.05$).

Spermanın metabolizması için gerekli olan plazma membran fonksiyonel bütünlüğü, spermanın oosit füzyonunda önemli rol oynar.²² Ancak lipid peroksidasyonu ve soğuk şoku membran geçirgenliğine ve bütünlüğüne zarar verir. Soğuk şoku, plazma zarı seçici geçirgenliğini kaybettikten sonra zar lipidlerinin faz geçişine neden olur.^{23,24} Soğuk şokuna karşı membranın akışkanlığının artırılması ile koruma sağlanması mümkündür.²⁴ HOST, sperm membranının fonksiyonel bütünlüğündeki ince değişiklikleri tespit etmek için optimize edilmiş bir testtir.^{15,22} Gerçekleştirilen çalışmada, eritme sonrası antioksidan gruplarındaki plazma zarı fonksiyonel bütünlük değerleri kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur ($P<0.05$). HOST değerleri önceki araştırmalar Hopkins ve ark.²⁰ uyumludur.

Akrozomal bozukluk kriyoprezervasyon işleminin istenmeyen etkilerinden biridir.^{9,25} Yumurtlama sırasında, ana arı spermatekasından birkaç spermatozoon bırakılır ve oosite penetrasyonun şekillenebilmesi için spermada akrozom reaksiyonu şekillenmek zorundadır. Bu nedenle, akrozom bütünlüğü, dondurulup çözülmüş haldeki spermatozoonun fertilitesi için çok önemlidir. Çalışmada, akrozom bütünlük oranları için Sisteamin grupları ile kontrol grubu arasında istatistiksel bir fark bulunamamıştır ($P>0.05$). Metiyonin grupları akrozom bütünlüğü kontrol grubundan daha iyi korumuştur ($P<0.05$). Bu sonuçları önceki araştırmalarda elde edilen sonuçlarla uyum içindedir.^{9,18,26}

Oksidatif hasar, hücrelerde çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunun anahtar ürünü olan MDA seviyeleri ile değerlendirilebilir. Çalışmamızda antioksidan grupları arasında MDA düzeyleri açısından istatistiksel bir farklılık bulunmamaktadır ($P>0.05$). Her iki metiyonin ve Sist5 gruplarının kontrol grubuna göre daha düşük oksidatif hasara sahip olduğu görülmüştür ($P<0.05$).

Değerlendirilen spermatolojik parametreler göz önüne alındığında; Met5 grubu arı spermasının dondurulmasında en etkili grup olduğu görülmüştür. Gelecekteki çalışmalar, kriyoprezervasyon değerlerini iyileştirmek ve suni tohumlama uygulaması üzerine odaklanmak olacaktır.

Kaynaklar

- Seven I, Yeninar H. Elaziğ yöresindeki arıcılık işletmelerinin hastalık, parazit ve zararlılar yönünden incelenmesi. e-Journal of New World Sciences Academy. 2010; 5(2): 52-56.
- Cobey S. Comparison studies of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee queens and factors affecting their performance. *Apidologie*. 2007; 38: 390-410.

- Woyke J, Jasinski. Influence of age of drones on the results of instrumental insemination of honey bee queen. *Apidologie* 1978; 9(3): 203-211.
- Genç F. Balarılarında koloni performansını etkileyen faktörler. *Teknik Arıcılık*. 1990; 27: 18-26.
- Güler A. Bal Arısı (*Apis mellifera* L.) Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Kitabı (55). Samsun. 2006.
- Stankus T. A review and bibliography of the literature of honey bee colony collapse disorder: A poorly understood epidemic that clearly threatens the successful pollination of billions of dollars of crops in America. *J Agric Food Inform*. 2008; 9: 115-143.
- Ortman K, Rodriguez-Martinez H. Membrane Damage during Dilution, Cooling and Freezing-Thawing of Boar Spermatozoa Packaged in Plastic Bags. *Journal of Veterinary Medicine Series A*. 1994; 41: 37-47.
- Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, Gagnon C. Levels of Antioxidant Defenses Are Decreased in Bovine Spermatozoa after a Cycle of Freezing and Thawing. *Mol Reprod Dev*. 2000; 55: 282-8.
- Nur Z, Zık B, Ustuner B, Sağırkaya H, Ozguden CG. Effects of different cryoprotective agents on ram sperm morphology and DNA integrity. *Theriogenology*. 2010; 73: 1267-1275.
- Watson PF. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein. *J Reprod Fertil*. 1981; 62(2): 483-92.
- Donnelly ET, McClure N, Lewis SEM. Glutathione and hypotaurine in vitro: motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. *Mutagenesis*. 2000; 15: 61-68.
- Agarwal A, Prabakaran SA, Said TM. Prevention of oxidative stress injury to sperm. *J Androl*. 2005; 26: 654-60.
- Burley LM, Fell RD, Saacke RG. Survival of honey bee (Hymenoptera: Apidae) spermatozoa incubated at room temperature from drones exposed to mitocides. *J Econ Entomol*. 2008; 101(4): 1081-1087.
- Collins AM, Donoghue AM. Viability assessment of honey bee, *Apis mellifera*, sperm using dual fluorescent staining. *Theriogenology*. 1999; 51(8): 1513-1523.
- Alçay S, Ustuner B, Çakmak İ, Çakmal S, Nur Z. Effects of various cryoprotective agents on post thaw drone semen quality. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2015; 21(1): 31-35.
- Alçay S, Toker MB, Onder NT, Gokce E. Royal jelly supplemented soybean lecithin-based extenders improve post-thaw quality and incubation resilience of goat spermatozoa. *Cryobiology*. 2017; 74: 81-85.
- Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of alde-

- hydric lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 407-421.
18. Alçay S, Cakmak S, Cakmak I, Mulkpınar E, Gokce E, Ustuner B, Sen H, Nur Z. Successful cryopreservation of honey bee drone spermatozoa with royal jelly supplemented extenders. *Cryobiology.* 2019; 87: 28-31.
 19. Alçay S, Toker MB, Gokce E, Ustuner B, Onder NT, Sagirkaya H. Successful ram semen cryopreservation with lyophilized egg yolk-based extenders. *Cryobiology.* 2015; 71: 329–333.
 20. Hopkins BK, Herr C. Factors affecting the successful cryopreservation of honey bee (*Apis mellifera*) spermatozoa. *Apidologie.* 2010; 41: 548-556.
 21. Yániz JL, Palacín I, Vicente-Fiel S, Gosálvez J, López-Fernández C, Santolaria P. Comparison of membrane-permeant fluorescent probes for sperm viability assessment in the ram. *Reprod Domest Anim.* 2013; 48: 598–603.
 22. Gokce E, Alçay S, Gul Z. Positive effect of BSA supplemented soybean lecithin based extender on liquid storage of ram semen at 5°C. *Ankara Univ Vet Fak Derg.* 2017; 64: 313-320.
 23. I. El-Kon. Testing usability of bovine serum albumin (BSA) for preservation of Egyptian Buffalo Semen. *Environ Sci.* 2011; 11: 495–502.
 24. Taylor MA, Guzmán Novoa E, Morfin N, Buhr MM. Improving viability of cryopreserved honey bee (*Apis mellifera* L.) sperm with selected diluents, cryoprotectants, and semen dilution ratios. *Theriogenology.* 2009; 72: 149–159.
 25. Ustuner B, Alçay S, Toker MB, Nur Z, Gokce E, Sonat FA, Gul Z, Duman M, Ceniz C, Uslu A, Sagirkaya H, Soylu MK. Effect of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) seminal plasma on the post-thaw quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based or egg yolk-based extender. *Animal Repro Sci.* 2016; 164: 97-104.
 26. Alçay S, Cakmak S, Cakmak I, Mulkpınar E, Toker MB, Ustuner B, Sen H, Nur Z. Drone semen cryopreservation with protein supplemented TL-hepes based extenders. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2019; 25(4): 553-557.