



## Alabalık Spermasının Kriyobiyolojik Muhafazasının Mekanizması

Yusuf BOZKURT

Mustafa Kemal Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Hatay

### Sorumlu Yazar

e-posta: yfbozkurt@yahoo.com

### Özet

Günümüzde genetik kaynakların saklanarak gelecek yıllara aktarılması önemli bir konudur. Balık spermasının dondurularak muhafaza edilmesi (kriyoprezervasyon) özellikle gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yetiştiriciliğinde büyük bir potansiyele sahiptir. Sperm hücrelerinin dondurulmasında kriyoprotektanlar, soğuk şoku ve donma esnasında gelişen hasarlara karşı sperm hücrelerine koruma sağlamaktadır. Dondurulan-çözdürülen sperm hücrelerinin fizyolojik ve fonksiyonel özelliklerinin anlaşılması ile kriyobiyolojik araştırmalarda gelişmeler sağlanmıştır. Bu makalede, kriyoprezervasyon işleminin sperm hücreleri üzerine olan etki mekanizmaları üzerinde durulmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Kriyoprezervasyon, genetik kaynak, kriyoprotektan, alabalık

## Mechanism of Cryobiological Preservation of Trout Sperm

### Abstract

Today, preservation of genetic resources is an important issue to be transferred to the next years. Preservation of fish sperm by freezing (cryopreservation) has great potential especially in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) culture. Cryoprotectants used in cryopreservation of sperm cells protect them against damages that occurring during cold shock and freezing. Understanding of the physiological and functional properties of the frozen-solving sperm cells were provided developments in cryobiological researches. In this article, the effects cryopreservation process on sperm cells have been focussed.

**Key Words:** Cryopreservation, genetic resource, cryoprotectant, trout.

## GİRİŞ

Balık spermasının muhafaza edilmesi balık yetiştiriciliğinde uygulanan seleksiyon programlarında büyük önem taşımaktadır. Çünkü aynı tür balıkların generasyonlar boyunca aynı ortam ve koşullarda yetiştirilmesi mevcut popülasyonda az bulunan genlerin kaybolmasına ve heterozigotluğun azalmasına neden olmaktadır. Genetik varyasyondaki bu azalma, mevcut balık stoğunun ileri dönemlerdeki seleksiyon programlarında kullanılma potansiyelini sınırlamakta olup bu durum düşük yaşama oranı, düşük büyüme oranı, yem dönüşüm etkinliğinde azalma, hastalıklara yakalanma riskinde artış ve yavru balıklarda ölüm oranının artması şeklinde kendini göstermektedir.

Bu nedenle arzu edilen gen havuzlarının oluşturulmasını sağlamak amacıyla gametlerin muhafaza edilmesi giderek büyük ilgi görmektedir. Günümüzde gametlerin muhafaza edilmesinde yaygın olarak kullanılan metot dondurarak (kriyoprezervasyon) muhafazadır. Nitekim balık spermalarının dondurulmalarıyla

oluşturulan sperm bankaları sayesinde arzu edilen özelliklere sahip damızlık balıklardan elde edilen genler yetiştiricilikte seleksiyon programlarında sperma formunda kullanılmaktadır.

### Kriyoprezervasyon

Doku ve hücrelerin kriyoprezervasyonu 1700'li yıllardan itibaren uygulanmakta olan bir tekniktir. Bilimsel ve modern anlamda canlı hücre dondurma çalışmaları, 1949 yılında Polge ve arkadaşlarının gliserolün kriyoprotektan (soğuk şokuna karşı koruma sağlayıcı) özelliğini bulmasından sonra başlamış olup ilk dondurulan hücre spermatozoa olmuştur. Bu anlamda kriyobiyoloji hücre, doku, organ ve organizmaların dondurulmasını inceleyen bilim dalı olarak önemini artırmış ve dondurulan çözdürülen hücrelerin fonksiyonel özelliklerinin daha iyi anlaşılması, kriyobiyolojinin gelişmesine neden olmuştur [1]. Günümüzde kriyoprezervasyon tekniği sperma, embryo, doku ve hücrelerin muhafaza edilmesinde rutin olarak uygulanmakta olup akuakültür alanında uzmanlaşan araştırmacılar özellikle balık

spermasının dondurulması üzerinde üzerinde çalışmaktadır.

Balık spermasının uzun süreli muhafazasında başlıca üç metod kullanılmaktadır. Bu metotlardan birincisi, değişik hacimdeki payetlere çekilen spermanın sıvı azot buharında dondurulmasıdır. İkinci metot, pelet metodu olarak adlandırılan spermanın kuru buz üzerinde açılan küçük hacimdeki delikler içerisine yerleştirilerek dondurulmasıdır. Üçüncü metot ise, spermanın sıcaklığı bilgisayar tarafından devamlı olarak kontrol edilebilen ve istenilen sıcaklığa ayarlanabilen bir dondurucu yardımıyla dondurulmasıdır. Bu metotlardan gerek laboratuvar ve gerekse işletme koşullarında en yaygın olarak kullanılan spermanın sıvı azot buharında payet yöntemine göre dondurulmasıdır [2].

#### **Sperm Dondurma Prosedürü**

Balık spermasının sıvı azot buharında dondurulması suretiyle uzun süreli muhafaza edilmesinde uygulanan prosedürü şu şekilde özetlemek mümkündür:

#### **Spermanın Alınması ve Spermatolojik Özelliklerin Belirlenmesi**

Damızlık alabalıklardan sperma abdominal masaj yoluyla dereceli tüplere alınmaktadır. Damızlık alabalıklardan alınan spermanın makroskopik ve mikroskopik olarak incelemesi yapılmalıdır. Bu bağlamda spermanın miktarı, rengi, kıvamı, motilitesi, yoğunluğu ve pH'sı belirlenmektedir [3].

#### **Spermanın Kriyoprotektan İçeren Sulandırıcılar ile Sulandırılması**

Spermanın kriyoprezervasyon işleminin ilk aşaması dondurma işleminden önce kriyoprotektanların hücre içerisine penetre olmalarını sağlamak amacıyla kriyoprotektan içeren sulandırıcılar ile sulandırılmasıdır. Başarılı bir kriyoprezervasyon işleminde spermatozoa aktivitesinin önlenmesi oldukça önemlidir. Bu amaçla sulandırıcı kompozisyonunun geliştirilmesinde başlıca iki yaklaşım bulunmaktadır. İlk yaklaşım balığın seminal plazma kompozisyonuna benzer sulandırıcıların kullanılmasıdır. İkinci yaklaşım ise hazırlaması kolay olan sulandırıcıların kullanılmasıdır [4].

Sulandırıcılar muhafaza süresi ile sperma hacminin artırılmasını sağlayarak sperma ile çalışılmasını kolaylaştırmaktadır.

Sulandırıcıların taşınması gereken özellikleri şu şekilde sıralamak mümkündür [2].

1) Sulandırıcıda spermatozoa'ların yaşaması için gerekli olan kimyasal maddeler arasında denge olmalıdır.

2) Gerek aerob gerekse anaerob koşullarda spermatozoa'ların beslenmesini sağlayacak besin maddelerini içermelidir.

3) Soğuk şokuna karşı spermayı korumalıdır.

4) Spermatozoa'nın metabolizma atıklarından meydana gelen toksik etkileri ortadan kaldıracak kimyasal maddeler içermelidir.

5) Hücre içinde düzenli bir elektrolit dengesi ve ozmotik basınç sağlamalıdır.

6) Spermatozoa'nın normal metabolik aktivitesini gösterebileceği uygun bir ortam oluşturmalıdır.

#### **Kriyoprotektan Kullanımı**

Kriyoprotektanlar dondurma ve çözme uygulamaları sırasında hücrelerde oluşabilecek zararları önlemek amacıyla kullanılan kimyasal maddeler olarak tanımlanmaktadır. Genel olarak koruyucu etkilerini ortamdaki donmamış fraksiyonu artırarak ve ortamdaki iyon miktarını azaltarak gösterirler. Hücre, dondurulmadan önce kriyoprotektanlarla inkubasyona tabi tutularak, intrasellüler bakımdan dengeye gelmesi sağlanmaktadır. Kriyoprotektanların en önemli özellikleri, düşük moleküler ağırlığa sahip olmaları ve toksik etkilerinin ancak belirli oranlarda katıldıklarında oluşmasıdır [5].

Hücrelerin başarıyla dondurulması, plazma membranından suyun ve kriyoprotektanların basit difüzyonunu ve hızlı transportunu gerektirir. Son yıllarda membranda transport işlevli protein yapısında olan su kanalları (aquaporin) saptanmıştır. Bu proteinlerin dondurma sıvısına katılmasıyla hücrenin yaşam gücü artırılmaktadır [6].

Kriyoprotektan maddeler, hücre membranından nüfuz edebilme özelliklerine göre; hücre membranından geçebilen (Permeabl-internal) ve hücre membranından geçemeyenler (Permeabl olmayan-eksternal) olarak iki ayrı grupta incelenmektedir. Hücrelerin kriyoprotektan maddelere maruz kalması hücrelerden H<sub>2</sub>O atılmasına neden olmaktadır. Bu dehidrasyon işleminin çok hızlı bir şekilde gerçekleşmesi, hücrelerin ölümüne neden olabileceğinden kriyoprotektan içeren solüsyonların artan konsantrasyonlarda ilave

edilmesi gerekmektedir. Doza bağlı olarak çoğu kriyoprotektan madde hücreler için toksik özellik gösterebileceğinden bu toksik etkiyi minimize etmek için kriyoprotektan yavaş bir şekilde ilave edilmeli, sulandırıcılar ile dilüe edilmeli, sulandırıcı ve kriyoprotektan karışımı spermaya ilave edilmeden önce düşük sıcaklıkta muhafaza edilmelidir [7].

#### **Permeabl (İnternal) Kriyoprotektanlar**

Hücre içerisine nüfuz edebilen kriyoprotektanlar düşük molekül ağırlığına sahip olup DMSO, gliserol, etilen glikol, 1,2 propanediol, 2,3 bütanediol, propilen glikol ve diğer bazı alkoller kapsamaktadır. Donmanın gerçekleşmesinden önce, ozmotik basınç farkından dolayı sperm hücreleri içerisindeki sıvı, kriyoprotektan maddeler ile yer değiştirir. Böylece hem hücre hacmindeki değişiklikler azaltılır hemde sperm hücreleri içerisindeki buz kristallerinin oluşumu minimum düzeye indirilerek dondurma işlemi sırasında hücrelerin zarar görmesi minimize edilmiş olur [8].

Hücre içerisine nüfuz edebilen kriyoprotektanlar,  $H_2O$ 'ya bağlanabilme özellikleri ve diğer bileşenlerin yüksek konsantrasyonlarından kaynaklanan toksik etkileri azaltarak koruyucu etkilerini göstermektedir. Bu gruptaki kriyoprotektanların çoğu yüksek oranda  $H_2O$ 'da çözünebilir yeteneğine sahiptir. Bu nedenle bu niteliklere sahip kriyoprotektanlar  $H_2O$ 'nun hidrojen bağlarını kopararak  $H_2O$ 'nun yapısını değiştirir. Aynı zamanda bu grupta yer alan kriyoprotektanlar  $H_2O$  molekülleri ile hidrojen bağları oluşturabilmektedir [8].

#### **a) DMSO (Dimetil Sülfoksit)**

DMSO, kimyasal olarak bir polar kök etrafında iki apolar baştan oluşan amfipatik bir bileşiktir. Bu özellik DMSO'ya hem sıvı hem de organik medyumlarda çözünme imkanı sağlamaktadır. Yapılan bir çalışmada alabalık spermasında çözüm sonu en yüksek motilite oranı, sulandırıcıya %10-15 oranında ilave edilen DMSO'te belirlenmiştir [9].

#### **b) Gliserol**

Gliserol yüksek oranda hidrofilik yapı gösteren bir poliol bileşiktir. Kimyasal yapısındaki C/OH oranının eşit olması gliserol'un spermatozoa üzerine olan etkisini

artırmaktadır. Gliserolün toksisitesi, metabolik dönüşümünde oluşan methlglycosal tarafından oluşturulmaktadır.

Gliserolün toksik etkisi türe göre değişiklik göstermekte olup, balık spermaları için fertilizasyonda kontraseptif özellik göstermektedir. Hücrelerde gliserolün toksik etkisi, membran biyoenerji dengesinde değişikliğe ve ozmotik strese yol açmasıyla kendini göstermektedir [10].

#### **c) Amid Türevi Kriyoprotektanlar**

Amid türevi kriyoprotektanlar (formamid, dimetilasetamid (DMA vb.) spermanın dondurulmasında gliserole göre daha iyi koruma sağlamakta olup daha az kontraseptif özellik göstermektedir. Sulandırıcılara %3,5-5 oranında katılması, donma zararına karşı etkili olmakta ve çözüm sonu parametrelerinde iyileşme sağlamaktadır. Amidler, alabalık gibi gliserole duyarlı türlerin spermasının dondurulmasında alternatif olarak gözükmektedir [11].

#### **Permeabl Olmayan (Eksternal) Kriyoprotektanlar**

Hücre içerisine nüfuz edemeyen eksternal kriyoprotektanlar, iki gruba ayrılmaktadır. Bunlar hücre içine nüfuz edemeyen düşük molekül ağırlıklı (glikoz, sukroz, trehaloz, rafinoz, galaktoz ve diğer bazı şekerler) ve yüksek molekül ağırlıklı (PVA, PVP ve diğer bazı polimerler) kriyoprotektanlardır [12].

Hücre içine nüfuz edemeyen düşük molekül ağırlıklı kriyoprotektanlar, donma işlemi süresince şekillenen buz kristalleri oluşumunu azaltan etkilerini hücreleri dehidre ederek göstermektedir. Hücre içine nüfuz edemeyen yüksek molekül ağırlıklı kriyoprotektanlar ise, hücrelerin dondurulması ve çözülmesi sırasında oluşan buz kristallerinin şekil ve büyüklüklerini zararsız olacak biçimde değiştirerek etkilerini göstermektedir (Mcgann 1978).

Eksternal kriyoprotektanlar, membranların sıvı ve katyonlara karşı permeabilitede artış sağlayarak ozmotik strese karşı hücre membranlarını esnek hale getirir. Ayrıca, hücrede donma/çözünme esnasında gelişen lipit peroksidasyonunu azaltmaya çalışırlar [12]. Eksternal kriyoprotektanlar, makromoleküller ve sakkaritler olmak üzere iki kısımda incelenmektedir.

**a) Makromoleküller**

Makromoleküllerinden en çok kullanılanları şunlardır: Polietilen glikol, ficoll 70, BSA, dekstran, mannitol ve polivinilprolidon'dür. BSA (bovine serum albumin)'nin lipit peroksidasyon inhibitörü olduğu düşünülmektedir [8].

**b) Sakkaritler**

Sakkaritlerden glukoz, sükroz, trehaloz ve raffinöz bu gruba girmektedir. Sakkaritler, lethal etkili intrasellüler kristalleşmeyi engellemek için hücrede dehidrasyon oluştururlar [13].

Şekerler donma ve çözüm esnasında oluşun membran zararına karşı, membrandaki fosfolipitlerle etkileşime girip yüzey artışı sağlayarak koruma sağlamakta ve çözüm işlemi sırasında sperm hücrelerinin ozmotik şoka girmesini önlemektedir [8].

**c) Yumurta sarısı**

Yumurta sarısında bulunan düşük yoğunluğa sahip fosfolipitler spermatozoa yüzeyine bağlanmakta ve hücresel adenilat siklazı aktive ederek kriyoprotektif etki göstermektedirler. Birçok araştırmada lipozomlardan elde edilen fosfolipitlerin koruyucu etkileri araştırılmış olup, türe göre koruyucu etkili fosfolipit kaynakları saptanmıştır [7].

**Spermanın Payet Yöntemine Göre Dondurulması**

Günümüzde spermanın dondurulması amacıyla kullanılan en yaygın ve pratik dondurma yöntemidir. Bu yöntemde sperma 0.25 ml veya 0.5 ml hacimli payet adı verilen plastik çubuklarda dondurulur. Sperma ile dolu olan payetler +4°C'lik ortamda taraklara dizilir. Buradaki amaç payetlerin üst üste yığılmasını önlemek ve donma esnasında bütün payetlerin sıvı azot buharı ile temas etmesini sağlamaktır. Taraklara dizilen payetler zaman geçirilmeden donma kazanına aktarılır ve özel ızgara bölümüne yerleştirilir. Kazan içerisindeki sperma sıvı azot seviyesinden yaklaşık 4 cm yukarısında 10 dk sürede dondurulur. -110°C ile -120°C arasındaki sıvı azot buharındaki bu şok dondurma sırasında azot buharının yoğunlaşması amacıyla kazanın üst kısmı kapatılır. Aynı ortamda plastik gobletlere yerleştirilen payetler kazandaki sıvı azot içerisinde -196°C'de depolanır [14].

**Spermanın Pelet Yöntemine Göre Dondurulması**

Spermanın -79°C'deki kuru buz disklerinde dondurulması esasına dayanır. CO<sub>2</sub> gazından özel bir alet yardımıyla elde edilen kuru buz (katı CO<sub>2</sub>) diski üzerine küçük çukurlar açılır. Daha sonra bu çukurlara +4°C'de ekilibrasyonu tamamlanmış 0.1 ml kadar sperma damlatılır. Birkaç dakika içerisinde donan sperma pelet tarzında elde edilir. Peletler özel yuvaları olan pelet taşıyıcılarına yerleştirildikten sonra -196°C sıcaklığındaki sıvı azot içerisinde depo edilir [14].

**Dondurulmuş Spermanın Saklanması**

Dondurulmuş spermanın depo edileceği konteynerin içindeki sıvı azot'un sıcaklığı -196°C'dir. Bu sıcaklığı sürekli tutan azotun buharlaşmasıdır. Bu nedenle konteynerler azotun asgari ölçülerde buharlaşmasına izin verecek şekilde dizayn edilmiştir. Buharlaşmanın fazla olması sıvı azotun kısa süre içerisinde tüketilmesine neden olur. Aşırı sıvı azot tüketimini önlemek için konteyner duvarı özel maddeler ile izole edilmiştir. Konteynerler içerisinde metal veya plastikten yapılmış kanisterler bulunur. Kanisterler, konteynere göre değişmekle beraber genellikle 6 adettir. Kanisterlerin içerisinde gobletler, bunların içerisinde donmuş spermalar bulunur. Konteynerler güneş ışığından uzak serin, rutubetsiz ve hava akımının olmadığı yerlerde tutulmalıdır [2].

**Sperm Çözdürme Prosedürü**

Çözdürme işlemi, sperm hücrelerinin bulunduğu payet veya pellet'lerin 5-30°C sıcaklık aralığındaki su banyosuna farklı sürelerde daldırılması suretiyle uygulanan bir işlemdir. Kriyoprezervasyon işleminden sonra spermatozoa'ların büyük çoğunluğu hasarlı membran ve mitokondriye sahiptir. Bu nedenle çözdürülmüş spermanın hemen kullanılması fertilizasyon oranını artırmaktadır [9].

-196°C'de sıvı azot içerisinde depolanan pelet formundaki spermalar kendi sulandırıcılarında çözdürme işlemine tabii tutulur. Bu işlemin ardından çözdürülen spermalar yumurtalar üzerine aktarılarak fertilizasyon işlemi yapılır. Payet yöntemine göre dondurulan spermalar konteynerden alınmasında kanister payetlerin görülebileceği seviyeye kadar yukarı kaldırılır.

Pens yardımıyla alınan payetler zaman geçirilmeden sıcaklığı ayarlanmış su banyosuna aktarılır. Kanisterin kaldırılması, payetin alınması ve kanisterin tekrar konteyner içerisindeki yerine yerleştirilmesi mümkün olduğunca kısa sürede yapılmalıdır. Su banyosunda çözdürülen payetler bez yardımıyla kurulandıktan sonra uç kısmı kesilir. Bu işlemin ardından spermalar yumurtalar üzerine aktararak fertilizasyon işlemi yapılır [14].

#### **Spermanın Kriyobiyolojik Muhafazasının Temel Prensipleri**

Spermanın kriyobiyolojik muhafazası,

**a)** Dondurularak spermaların önce kriyoprotektan maddelerle bir araya getirilerek dengelenmesi,

**b)** Belirli bir hızla soğutulması, sıvı nitrojen içerisinde depolanması,

**c)** Çözdürme aşamasında dilüsyon ile kriyoprotektanların ortamdan uzaklaştırılması ve gelişimlerine izin verecek fizyolojik solüsyonlar içerisine alınması esasına dayanır. Bütün bu işlemler yapılırken; hücre hasarı minimal olmalıdır, hücrenin yapısal bütünlüğü ve fonksiyonel özellikleri korunmalıdır [7].

#### **SONUÇ**

Hücreler soğuk şokuna maruz kaldıklarında membransel ve ozmotik değişikliklere uğramaktadır. Bu değişiklikler hücrelerin çözümünü yaşam/fonksiyonel özelliklerini olumsuz etkilemektedir. Özellikle hücrelerin uğrayacağı soğuk şoku ve ozmotik zararlarına karşı sulandırıcılara kriyoprotektanların katılması, çözümünü canlılığı ve fertilitiyi optimize etmektedir.

Son yıllarda geliştirilen bazı membransel parametreler, kriyoprotektanların ortama hangi oranda katılacağına belirlenmesinde kullanılmaktadır. Kriyobiyolojik mekanizmaların daha da iyi anlaşılması, sperm hücrelerinin dondurulmasındaki başarıyı artırarak fertilitiyi olumlu yönde etkileyecektir.

#### **KAYNAKLAR**

- [1] Leibo SP, Brandley L. 1999. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. 502-515. In: C Gagnon (Ed), The Male Gamet. Cache River Press, St Louis.
- [2] Tekin N. 1994. Spermanın muayenesi ve değerlendirilmesi. Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Suni Tohumlama, Doğum ve İnfertilite. S. 69-79.
- [3] Tekin N, Seçer S, Akçay E, Bozkurt Y, Kayam S. 2003a. The effect of age on spermatological properties in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W. 1792). Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 27(1), 37-44.
- [4] Ciereszko A, Glogowski J, Dabrowski K. 2000. Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of freshwater fishes. In: Cryopreservation in Aquatic Species. Tiersch, T.R. and Mazik, P.M. (Editors) World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. p. 20-48.
- [5] Palasz AT, Mapletopt RJ. 1996. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. Biotechnol Adv, 14, 127-149.
- [6] Edashige K, Yamaji Y, Kleinhans FW, Kasai M. 2003. Artificial expression of aquaporin-3 improves the survival of mouse oocytes after cryopreservation. Biol. Reprod, 68: 87-94.
- [7] Holt WT. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. Theriogenology, 53, 47-58.
- [8] Mcgann LE. 1978. Differing action of penetrating and nonpenetrating agents. Cryobiology, 15, 382-390.
- [9] Bozkurt Y, Akçay E, Tekin N, Seçer S. 2005. Effect of Freezing Techniques, Extenders and Cryoprotectants on the Fertilization Rate of Frozen Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Sperm. The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgah, 57 (2), 125-130 (2005).
- [10] Tekin N, Seçer S, Akçay E, Bozkurt Y, Kayam S. 2007. Effects of glycerol additions on post-thaw fertility of frozen rainbow trout sperm, with an emphasis on interaction between extender and cryoprotectant. Journal of Applied Ichthyology. 23 (1), 60-63.
- [11] Gomes GM, Jacop JCF, Medeiros ASL, Papa FO., Alvarenga MA. 2002. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the mangalarga marchador breed. Theriogenology, 58, 277-279.

- [12] Cabrita E, Anel L, Herraez MP. 2001. Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. *Theriogenology*, 52, 623-635.
- [13] Rudolph AS, Crowe JH. 1985. Membrane stabilization during: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiology*, 22, 367-377.
- [14] Tekin N, Secer S, Akçay E, Bozkurt Y. 2003b. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen. *Israeli J. Aquaculture-Bamidgeh*. 55, 208-212.