

Balıklarda Sperm ve Yumurta Kalitesini Değerlendirme Kriterleri

Halil Yavuz*

Kent Alabalık Üretim Çiftliği, Bahçecik Barajı Alabalık Üretim Tesisi
38700 Pınarbaşı Kayseri

*Sorumlu yazar: h.yavuz78@hotmail.com

Özet:

Balık üretimini etkileyen en önemli faktörlerin başında sperm ve yumurtanın kalitesi gelmektedir. Bu nedenle, üretimde kullanılacak damızlıkların sperm ve yumurtalarının kalitelerinin değerlendirilme kriterlerinin bilinmesi büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada, dölleme öncesi kalite değerlendirme kriterleri; spermanın makroskopik ve mikroskopik muayenesi, spermanın kitle hareketi, motilitesi, yoğunluğu, ölü-canlı spermatozoon oranı; spermanın fiziksel ve kimyasal özelliklerinin muayenesi; dölleme ve dölleme başarısı; embriyo yaşama oranının belirlenmesi konularında bilgiler derlenilmiştir.

Anahtar kelimeler: Balık, sperm, yumurta, kalite, değerlendirme

The Quality of Sperm and Eggs and Their Evaluation Criteria in Fish

Abstract:

One of the most important factors affecting reproduction in fish is the quality of sperm and eggs. Therefore, getting information on the quality of sperm and eggs of broodstocks, and their evaluation criteria has a great importance. This review includes information on quality evaluation criteria before fertilization; macroscopic and microscopic examination of sperm, mass movement of sperm, sperm motility, sperm density, dead spermatozoon ratio to alive spermatozoon; examination of physical and chemical characteristics of sperm; fertilization and being inseminated success; determination of alive embryo rates.

Key words: Fish, sperm, egg, quality, evaluation

GİRİŞ

Hızla artan dünya nüfusu ve teknolojik gelişmelerdeki artışa paralel olarak çevre kirliliği ve ekolojik sorunların artması hayvansal protein kaynakların azalmasına neden olmaktadır. Bu sorunlar birim alandan daha fazla hayvansal protein elde edilmesini zorunlu hale getirmiştir. Bu noktada su ürünleri yetiştiriciliği ön plana çıkmaktadır. Yetiştiricilikte verimi artırmaya yönelik çalışmalar son yıllarda oldukça önem kazanmıştır. Bu yönde yapılan özellikle biyoteknolojik çalışmalar büyük potansiyele sahiptir (Dreanno ve ark., 1999a; Okumuş, 2003; Yavuz, 2012).

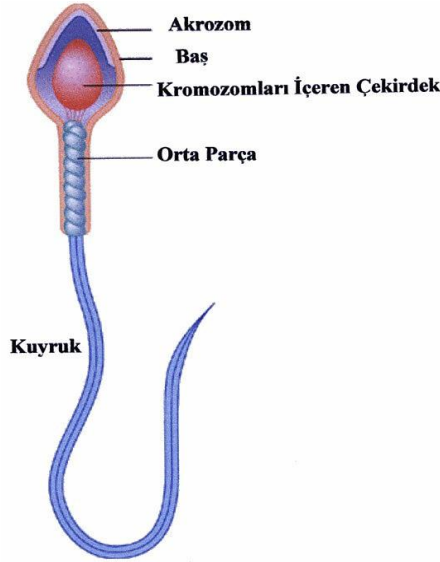
Dünyada balık üretimi ve yetiştiriciliği konularındaki biyoteknolojik çalışmaların yakından takip edilip ülkemizde de uygulanması ve yurdumuzun su potansiyelinin değerlendirilmesiyle birlikte tatlı sularda gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), denizlerde ise çipura (*Sparus aurata*) ve deniz levreği (*Dicentrarchus labrax*) yetiştiriciliği her geçen yıl artarak sürdürülmektedir. Bunun sonucunda, ülkemizdeki su ürünleri üretimi yapan kuluçkahane sayısı günümüzde giderek artmaktadır.

Yurdumuzda balık üretim ve yetiştiriciliği yapan işletmelerin genel eğilimi arasında daha fazla yavru üretmek bulunmaktadır. Dolayısıyla, üretimde kullanılacak damızlıkların verim özellikleri (sperm ve yumurta kalitesi) ve verim özelliklerinin değerlendirme kriterlerinin bilinmesi büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada; balıklarda sperm ve yumurta kalitesini değerlendirme kriterleri başlığı altında; sperm ve yumurtanın

morfolojisi; dölleme öncesi kalite değerlendirme kriterleri; spermanın makroskopik ve mikroskopik muayenesi, spermanın kitle hareketi, motilitesi, yoğunluğu, ölü-canlı spermatozoon oranı; spermanın fiziksel ve kimyasal özelliklerinin muayenesi; dölleme ve dölleme başarısı; embriyo yaşama oranının belirlenmesi konularında bilgiler derlenilmiştir.

Sperm Morfolojisi

Spermium adı verilen erkek germ hücresi ilk defa 1677 yılında *Johann Ham* tarafından görülmüştür. Spermium baş, orta parça ve kuyruk olmak üzere üç kısımdan oluşur ve canlı iken çok hareketli bir cisimdir (Şekil 1) (Kayalı ve ark., 1992).



Şekil 1. Gökkuşaağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'na ait olgun bir spermium (Kayalı ve ark., 1992).

Baş: Karşıdan bakıldığında oval, yandan bakıldığında armut biçimindedir. Taze preparatlarda ışığı çok kırıcıdır. Bu nedenle parlak olarak görünür. Boyanmış preparatlarda ise, başın arka kısmı nüve boyaları ile çok koyu olarak boyanır çünkü başın bu kısmında çok miktarda DNA bulunmaktadır. Başın bu kısmının, spermium epitelinde olgunlaşırken ortaya çıkan enzimleri taşıdığı ve bu nedenle fertilizasyonda önemli bir rol oynadığı kabul edilmektedir (Holtz ve ark., 1984).

Orta parça: Boyun ve birleştirici kısım olmak üzere iki bölümden oluşmuştur.

Boyun çok kısadır ve baş plağı (*Noduli anteriores*) ile ara kitle (*Massa intermedia*)'den yapılmıştır. Işık mikroskopunda baş plağı; başın hemen altında yerleşmiş iki cisimcik ile onları birbirine birleştiren, enine diske bağlayan homojen bir kitle görünümündedir. Boyun, bir oynak görevi yapmaktadır. Baş bu sayede spermiumun geri kalan kısımlarına karşı hareket yeteneği kazanmaktadır. Birleştirici kısımda şu oluşumlar vardır (Holtz ve ark., 1984):

1. Enine disk (*Discus transversalis*): Ara kitlenin (*Massa intermedia*) hemen altında bir plaktan yapılmıştır.

2. Son halka: Dip çemberi veya kapatıcı halka da denir. Arka sentriolden oluştuğu kabul edilen bir plâktır.

3. Eksen ipliği: Bu iplik enine diskten başlayarak kuyrukta da devam eden bir lifçikten oluşmuştur.

4. Spiral iplik: Eksen ipliğinin etrafında bulunan, ince plasmatik kılıfı saran, mitokondrilerden yapılmış, 8-9 kıvrımlı bir ipliktir.

5. Sitoplasmik kılıf: En dışta bulunan ince bir zardır.

Kuyruk: Spermium'un en uzun fakat aynı zamanda en ince kısmıdır. Bir uzun esas parça (*Pars principalis*) ile bir de kısa son parçadan (*Pars terminalis*) oluşmuştur. Bütün kuyruk boyunca eksen iplikliği uzanır. Kuyruk, yilankavi hareketler ile spermiumun ileriye doğru hareket etmesini sağlar (Holtz ve ark., 1984; Munkittrick ve ark., 1987).

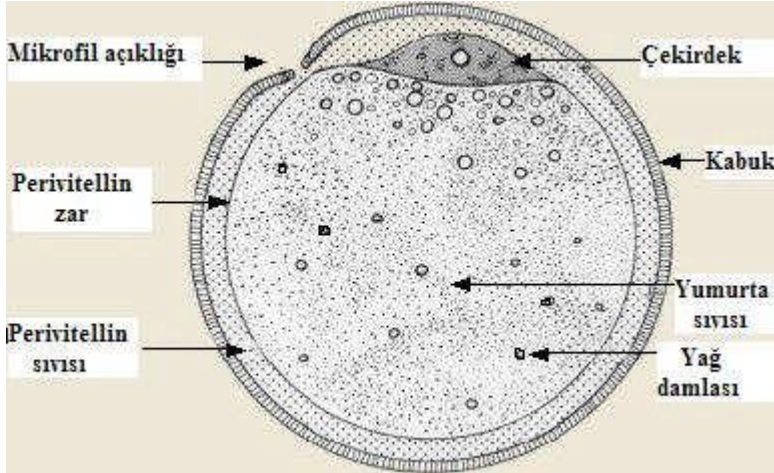
Spermium bir hücre olarak incelendiğinde; baş, nüveye, bütün diğer kısımlar da hücre gövdesine uyar. Genlerin bulunması nedeniyle fekondasyon esnasında asıl önemli rolü oynayan baştır, enine disk ise sadece bir motor durumundadır. Bu plağın sağlam olması spermiumun hareket edebilmesi için şarttır. Kuyruk, geminin pervanesi gibi sadece hareketi sağlayan bir kısımdır. Baş bulunmayan bir spermium, eğer enine plağı sağlam ise hareket edebilir. Bundan anlaşılacağı üzere hareket yeteneği ile dölleme yeteneği farklı şeylerdir. Bir spermiumun yaşama süresi, içinde bulunduğu ortamın pH'ına bağlıdır. Spermiumlar asit ortamlarda çok çabuk hareket niteliklerini çok çabuk kaybeder ve ölürlere (Munkittrick ve Moccia, 1987; Kayalı ve ark., 1992).

Yumurta Morfolojisi

Döllenmemiş yumurta ya da dişi gamet, ikinci mayotik bölünmenin metafazında yer alan sabit ovosittir. Bu metafaz 2 ovosit, oogenetik sürecin son ürünü olup, oogenetik boyunca ovaryum ile birlikte meydana gelir (Tata, 1986). Yumurtanın koordineli birleşimi bazı türlerde yıllara varan çok uzun bir süre devam edebilir. Bu yüzden, oogenetiğin sürecinde meydana gelen birleşim, sentez ve yumurta bileşenleri (Şekil 2); bir defa döllendiğinde normal bir embriyoya dönüşecek iyi kaliteli bir ovositin düzenli oluşmasında anahtar rol oynamaktadır. Vitellojen süresince yumurta hacminin artması ile sonuçlanan yumurta sarısı (besin kesesi) proteinlerinin birleşmesini de içeren yumurta oluşumunun ana özellikleri üzerinde çalışılmıştır (Wallece ve Selman; 1985; Brooks ve ark., 1997; Patino ve Sullivan, 2002; Mommsen ve Korsgaard, 2008).

Yumurta sarısı proteinleri ve ovosit (döllenmemiş yumurta), maternal mRNA, protein, vitamin ve hormonlar gibi birçok bileşen içerir. Günümüzde, döllenmemiş yumurtaların hormonal bileşikleri hakkındaki bilgiler sınırlıdır. Çeşitli cinsiyet steroidleri (Feist ve ark., 1990), tiroid hormonları (Tagawa ve Hirano, 1987) ve kortizol (Hwang ve ark., 1992) konularında birçok çalışma yapılmıştır. Yumurta içeriğinin hormonal durumunu kontrol etme amaçlı birçok çalışma yapılmasına rağmen, günümüze kadar yumurta içi hormon fonksiyonları üzerine yeterli düzeyde araştırma yapılmamıştır. Maternal olarak aktarılan mRNA'lar ve proteinler oogenetik boyunca ovositte birleşirler (Tata, 1986; Pelegri, 2003). Zigotik transkripsiyonun başlangıcı "maternal embriyo değişimi (MET)" esnasında meydana gelir. Balıklar ve diğer omurgalılarda da olduğu üzere, MET orta-blastula safhasında meydana gelir bu durum ayrıca "orta blastula değişimi (MBT)" adıyla anılır. Son model genetik anaçların kullanılması ile yapılan çalışmalarda moleküler analizler, bazı maternal mRNA'ların değişken kalitedeki yumurtalarda farklı miktarlar sergilediklerini göstermiştir (Aegerter ve ark., 2005; Bonnet ve ark., 2007a,b). Bu yüzden yumurtalarda bulunan maternal mRNA'ların yapısı ve miktarı, okositin tam gelişimi için

önemlidir. Aynı şekilde, özel maternal mRNA'ların okosit içerisinde bulunduğu yer itibari ile embriyonun ön ve arka eksenlerinin tanımı için önemlidir (Bally-Cuif ve ark., 1998).



Şekil 2. Olgun bir gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yumurtası (Tata, 1986).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, balık yumurtasının kalitesinin düzenlenmesi kapsamına giren moleküler mekanizmalar üzerinde yeni ipuçları sağlamıştır. Örneğin; gökkuşağı alabalığının yumurtasında ovulatör sonrası yaşlandırma sürecinde çekirdek plazmasının mRNA seviyelerinde hızlı bir düşüş gözlemlenmiştir ki bu süreçte yumurta kalitesi de sürekli bir düşüş halindedir (Aegerter ve ark., 2005). Çekirdek plazmasının nükleer yapılanmada ve embriyonik gelişmede önemli rol aldığı bilinmektedir (Burns ve ark., 2003). Aynı şekilde, gökkuşağı alabalığının değişik kalitelere sahip yumurtaları arasında değişken miktar gösteren prohibitin 2 mRNA'da gözlemlenmiştir (Bonnet ve ark., 2007b). Prohibitin 2 (Phb2) yüksek korumalı bir protein olup, aslında koruyucu protein olarak bilinir ve hücre fonksiyonlarının geniş kapsamına yayılmıştır (Aegerter ve ark., 2005).

Maternal mRNA'lara ilaveten, ovosit oogenesis sürecinde sentezlenen proteinleri de içerir. Son yıllarda geliştirilen ovositin proteomik analizi, ergin zebra (*Danio rerio*) ve çipura (*Sparus aurata*) balıklarında proteinlerin tanımlanmasına öncülük etmiştir (Zilli, 2003). Bu çalışmalar, döllenmemiş yumurtaların protein içeriğini göstermektedir. Bununla birlikte, yumurta kalitesinin düzenlenmesine katkı sağlayan proteinler konusunda daha çok çalışma yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Döllenme Öncesi Kalite Değerlendirme Kriterleri

Sperma

Aktif olan spermatozoanın yüzdesi, hareketlilik süresi, sperm konsantrasyonu ve spermatokrit ve seminal plazma kompozisyonu, sperm kalitesini ölçmede kullanılmaktadır (Billard ve Gillert, 1981; Köprücü ve Gür, 1999; Aegerter ve ark., 2005). Sperm kompozisyonu üzerine yapılan araştırmalar, spermatozoa konsantrasyonu ve seminal plazma kompozisyonunda büyük intraspesifik ve interspesifik değişimler olduğunu göstermektedir. Bu değişimler, genetik değişkenlik, spermatozoanın intratestiküler yaşı,

mevsimler (Benau ve Turner, 1980), yumurtlama durumu ve stratejisine (Aegerter ve ark., 2005) göre gerçekleşmektedir.

Yumurtlama sezonu süresince levrek ve salmón balıklarının sperm kalitesinin arttığı belirlenmiştir. Diğer yandan, üreme mevsimi sonrası gökkuşuğu alabalığı spermalarının yoğunluğu düşmektedir (Büyükhatipoğlu ve Holtz, 1984).

Oncorhynchus mykiss, *Salmo trutta*, *Salvelinus fontinalis* ve *Salmo salar* üzerine yapılan araştırmalar, bu balıklarda sperm hareketlilik süresinin mevsimlere göre değiştiğini göstermektedir. Yumurtlama mevsiminde aktif olan gökkuşuğu alabalığı spermatozoaları 30-35 saniye hareketlidirler. Yumurtlama sezonu sonuna doğru hareketlilik süresi 15 saniye gibi bir süreye düşer (Benau ve Turner, 1980). Ayrıca, gökkuşuğu alabalıklarında yumurtlama sezonunda aktif olan spermatozoa oranı yumurtlama dönemi sonrası büyük oranda azalır (Büyükhatipoğlu ve Holtz, 1984).

Seminal plazmanın inorganik ve organik kompozisyonundaki değişimler aynı zamanda spermanın korunmasını da etkileyebilir (Benau ve Turner, 1980; Munkittrick ve Moccia, 1987). Sperm hareketliliği ile yakından ilgili olan K^+ ve Na^+ gibi iyonların oranı ve konsantrasyonu mevsim sonunda düşer (Munkittrick ve Moccia, 1987).

Abdominal masaj ile toplanan sperm örneklerinde üre kontaminasyonu (sperm kanalı ve üriner kanalın yakınlığından dolayı) kaçınılmazdır. Bundan dolayı sperm yoğunluğu ve seminal plazma kompozisyonundaki değişim yanlış yorumlanabilir (Bromage ve ark., 1992; Dreanno ve ark., 1999a). Bu konuda yapılan araştırmalar, üre kontaminasyonunun spermanın konsantrasyonunu %80'lere varan oranda seyreltebildiğini ve ozmotik basıncını azalttığını ortaya çıkarmıştır. Bu tür kontaminasyonlar seminal plazmanın iyonik konsantrasyonunu değiştirmektedir. Örneğin; üre kontaminasyonu sonucunda *Salmo salar*'ın seminal plazmasındaki K^+ konsantrasyonu 1382 mg/L'den 792 mg/L'ye düşmüştür (Bromage ve ark., 1992).

Spermanın Makroskopik Muayenesi

Sperma miktarı

Spermanın miktarı; bir gonadta dışarı verilen spermanın tamamının hacmidir. Sperm alma işleminden hemen sonra, genellikle derecelendirilmiş sperm toplama kadehlerinden okunarak, gerektiğinde ise ölçüm pipetleri veya silindirleri yardımıyla saptanır ve "ml" olarak belirtilir. Spermanın hacmi spermatozoa ve eklenti bezlerinin salgılarından oluşur. Balık türüne, ırkına, yaşına, çevre koşullarına ve sperm alma yöntemine bağlı değişiklik gösterebilir (Büyükhatipoğlu ve ark., 1984; Munkittrick ve Moccia., 1987; Alaçam ve ark., 1994).

Sperma rengi

Balık türüne ve ırkına göre farklılıklar göstermekle beraber, normal sperm genellikle açık kremden koyu krem rengine kadar değişir. Rengin oluşmasında sperm içinde bulunan spermatozoa sayısının etkisi fazladır. Patolojik durumlar dışında sperm renginin oluşmasında hayvan türüne ve beslenmeye bağlı, normal sayılabilecek farklılıklar izlenebilir (Alaçam ve ark., 1994).

Spermada normalin dışında renklere de rastlanabilir. Bu durumlar, genital organlarda anormal bir durumun olduğunu veya spermaya yabancı maddelerin karıştığını belirtisidir. Spermanın sarı-yeşilimsi renkte gözükmesi, spermada irin bulunduğunu (pyospermie), sarı renkte olması idrar karıştığını, kırmızı-kahverengi olması kan karıştığını (hemospermie)

gösterir, partikül veya benzeri tortuların gözükmesi ise dışkı veya diğer yabancı maddelerin bulunduğu belirtisi olabilmektedir (Holtz ve ark., 1984; Alaçam ve ark., 1994).

Sperma kıvamı

Spermanın kıvamı; spermanın akışkanlığını ve viskozitesini gösterir. Sperma sulu kıvamdan krem kıvamına kadar değişen viskozite gösterebilir. Spermanın kıvamı, büyük ölçüde içerdiği spermatozoa sayısı ile ilişkilidir. Örneğin; az yoğun bir sperma, açık krem renginde, sulu kıvamda ve akışkan olduğu halde, daha yoğun sperma ($\times 10^9$ /ml) krem renginde, koyu süt kıvamındadır ve bunun akışkanlığı daha azdır (Büyükhatipoğlu ve ark., 1984; Munkittrick ve Moccia., 1987).

Spermanın mikroskopik muayenesi

Taze spermada muayeneler sperma alımından hemen sonra ve spermatozoonların çevre koşullarından en az etkileneyeceği bir laboratuvarda gerçekleştirilir. Muayene sırasında spermanın temas edeceği lam, lamel, pipet gibi tüm malzemeler temiz, steril ve ortam sıcaklığında olmalıdır (Alaçam ve ark., 1994). Bu nedenle, balık çiftliklerinde laboratuvar şeklinde tam teşekküllü çalışma alanlarının kurulması gerekmektedir.

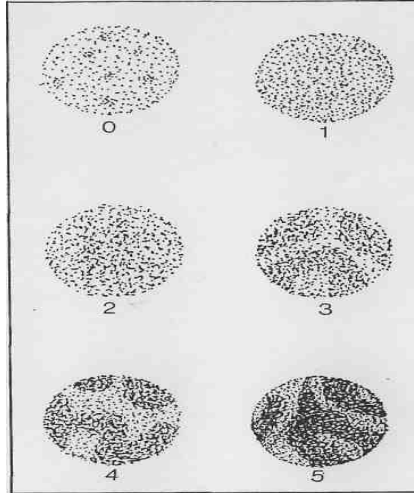
Spermanın kitle hareketi

Spermatozoa yoğunluğu fazla olan spermalarda gözlemlenebilen bir hareket çeşididir. Kitle hareketi, spermada bulunan ileri yönlü, güçlü harekete sahip spermatozoonların yoğunluğuna bağlı olarak oluşur. Spermada ileri yönde ve hızlı hareket eden spermatozoa sayısı çok fazla ise, kitle hareketi koyu hatlar halinde kaynama veya dalgalanma şeklinde görülür (Büyükhatipoğlu ve ark., 1984).

Kitle hareketi 0-5 arasında puanlama ile değerlendirilir. Eğer spermada hiçbir kitle hareketi gözlenmiyorsa; 0 (sıfır), kitle hareketi çok hızlı, kalın hatlarla kaynama veya dalgalanma şeklinde ise 5 (beş) ile değerlendirilir. Değerlendirmeler türe özgü özellikler dikkate alınarak yapılır (Şekil 3). Muayene için yaklaşık bir damla sperma, kapiller pipet veya bagele lam üzerine konur. Hareketler mikroskopun küçük büyütme objektifiyle ($\times 400$), lamel kapatılmaksızın, doğrudan değerlendirilir. Muayene kısa sürede yapılmalı, gerektiğinde tekrarlanmalıdır (Alaçam ve ark., 1994).

Spermatozoa motilitesi

Spermatozoa motilitesi; bir yönde ve güçlü hareket eden spermatozoonların, hareketsiz veya diğer hareket biçimi gösterenlere oranıdır. Bir yönde ve güçlü hareket niteliği gösteren tek hücreye ise motil spermatozoon denir. Motil spermatozoonların spermadaki sayıları, toplam spermatozoa içindeki yüzde oranlarıyla hesaplanabilir. Yalnızca motil spermatozoonların dölleme (fertilizasyon) güçleri olduğu kabul edildiğinden, yapılacak muayenelerde motilite saptanması önemli yer tutar. Motilite oranının belirlenmesiyle, hem erkek balıkların dölleme güçleri büyük ölçüde belirlenir hem de spermanın değişik amaçlarla kullanılması ve değerlendirilmesi olanağı sağlanır. Bu nedenle, spermatozoa motilitesinin saptanmasında çok dikkatli olmak gerekir. Motilitenin düşük saptanması halinde spermadan daha az veya hiç yararlanılamayacağı, yüksek saptanması halinde ise infertilite veya steriliteye yol açabileceği bilinmelidir (Alaçam ve ark., 1994; Dreanno ve ark., 1999b).



Şekil 3. Mikroskop altında sperm hareketlerinin değerlendirilmesi: (0) Yok, (1) çok zayıf, (2) zayıf, (3) orta, (4) iyi, (5) çok iyi (Alaçam ve ark., 1994).

Spermatozoa motilitesinin saptanmasında lam, lamel, ve pipet gibi malzemelerin temiz ve ortam sıcaklığında olmasına dikkat edilmelidir. Spermatozoa motilitesinin saptanması taze ve sulandırılmış spermada yapılır. Bunun için spermadan küçük bir damla alınarak lam üzerine konur ve bu damla üzerine lamel kapatılmadan ışık mikroskopunda genellikle orta büyütmede (x400), spermatozoonlar tek tek izlenerek bunların hareketlerinin değerlendirilmesi yapılır. Çoğunlukla, taze balık spermalarında yüksek motilite (%90) ve hareket hızına rastlanılır. Spermanın motil spermatozoa yönüyle değerlendirilmesi, toplam motil spermatozoa sayısı göz önünde bulundurularak yapılmalıdır. Spermada düşük motilite (%60) durumunda bu gibi spermalar dölleme için tercih edilmez. Kullanılması halinde dölleme oranı düşük olur (Büyükhatipoğlu ve ark., 1984; Munkittrick ve Moccia, 1987).

Spermatozoa yoğunluğu

Birim hacim spermada bulunan spermatozoa sayısı olarak tanımlanabilir. Spermanın bir mm^3 veya cm^3 ünde bulunan toplam spermatozoa sayısının bilinmesiyle ancak, motil spermatozoon oranı veya diğer spermatolojik özellikler sayısal olarak ifade edilebilir. Özellikle spermanın kullanılmasında ve değerlendirilmesinde sperm miktarı ve motilitesi yanında çok önemli bir spermatolojik özelliği oluşturur. Spermatozoa yoğunluğu çok değişik yöntemlerle belirlenebilir (Alaçam ve ark., 1994; Dreanno ve ark., 1999b).

Ölü-canlı spermatozoon oranı

Spermada yer alan ölü ve canlı spermatozoa oranını saptamak amacıyla araştırılır. Bu saptama, boyama testleriyle ölü spermatozoonların boyayı alma, canlı olanların ise, boyayı almama özelliğine dayandırılarak yapılır. Boyama işleminde genellikle eosin kullanılmakla beraber, eosin-nigrosin, opalblue ve fast green gibi boyalardan da yararlanılabilir. Ölü spermatozoon oranının saptanması spermatolojik özellikler bakımından ancak tamamlayıcı bilgi verir. Eğer spermada ölü spermatozoa oranı düşükse, bu durum değerlendirmeye alınmaz. Çünkü yerinde sallanan, çember hareketliler de canlı

spermatozoon özelliği gösterebilirler. Spermada yüksek miktarda bulunan ölüm oranı ise olumsuzluk işaretidir. Bu durumda diğer spermatolojik özellikler tekrar gözden geçirilmelidir. Spermada genellikle %20-25'in üzerinde ölü spermatozoa bulunması istenmeyen bir özelliktir (Labbe ve ark., 2001).

Spermanın fiziksel ve kimyasal özelliklerinin muayenesi

Spermanın fiziksel ve kimyasal özelliklerinin muayenesi kapsamında spermanın pH değeri ve dayanıklılığı (direnci) incelenmektedir (Büyükhatipoğlu ve ark., 1984; Munkittrick ve Moccia, 1987; Alaçam ve ark., 1994).

pH değeri

Spermanın pH değeri, taze spermada ve sulandırma işlemi sonrasında indikatör kağıtları veya pH ölçüm aletleriyle saptanır. pH ölçümü sırasında kullanılan ölçüm tekniğine kesinlikle uyulmalıdır. Spermada saptanan pH değeri değişimleri, spermaya dışarıdan herhangi bir maddenin karışığının göstergesi olabilir. Ayrıca, spermatozoonların metabolik faaliyetler sonucu ortama verdikleri artık maddeler de (laktik asit gibi) pH değişimine yol açabilmektedir. Bilimsel çalışmalarda ve spermanın değişik amaçlı kullanımlarında spermatozoon metabolizmasına bağlı olarak belirli süre içinde pH değerinin değişmesi, spermanın değerlendirilmesinde kriter olarak kullanılabilir (Büyükhatipoğlu ve ark., 1984; Munkittrick ve Moccia, 1987; Alaçam ve ark., 1994).

Dayanıklılık testi

Bu amaçla, "tuzlu su testi", "termorezistens testi" ve "soğuk şok testi" kullanılmaktadır.

Tuzlu Su Testi: bu testte %1'lik tuzlu su ortamında tutulan spermatozoonların aktivitelerini koruma süreleri araştırılır (Holtz ve ark., 1984; Munkittrick ve Moccia, 1987).

Termorezistens Testi: bu deneyde, değişik sıcaklık ortamlarında belirli süre tutulan spermalarda spermatozoa motilitesi ya da hareket biçimleri değerlendirilir. Spermatozoa hareketlerinin yanı sıra morfolojik yapının da (özellikle akrozom yapısı) incelendiği testtir (Holtz ve ark., 1984).

Soguk Şok Testi: gerek doğal, gerekse dondurulmuş spermaların değerlendirilmesinde kullanılan testte spermanın soğuk ortamdan etkilenişi araştırılır. Bunun için sperma 0 °C'ye kadar soğutulur ve 10 dakika bekletildikten sonra sıcaklık tekrar +15 °C'ye çıkarılır. Spermatozoonlar eosin ya da eosin-nigrosin gibi boyalarla boyama ile ölü-canlı oranına göre değerlendirilir (Büyükhatipoğlu ve Holtz ve ark., 1984; Munkittrick ve Moccia, 1987; Alaçam ve ark., 1994).

Spermanın bileşimi

Spermanın bileşimi, spermatozoa ve sperma plazmasından oluşur. Gerek spermatozoa, gerekse sperma plazmasını oluşturan maddeler, balık türüne, ırkına hatta yaşa ve çevre koşullarına bağlı bir takım değişiklikler gösterir. Spermada yer alan elemanlar ve değerleri tıpkı kan ve serumunda olduğu gibi muayene edilebilmektedir. Günümüzde geliştirilmiş santrifüj ve filtrasyon teknikleriyle spermada bulunan spermatozoa ve plazma kısımları ayrılabilir, uygun biyokimyasal laboratuvar yöntemleriyle bunların analizleri yapılabilmektedir (Okumuş ve ark., 1998; Dreanno ve ark., 1999b; Zilli, 2003).

Spermada bulunan elemanlar, spermatozoonlarda ve sperma plazmasında değişik oranlarda yer alırlar. Ancak, hücre membranlarında oluşan herhangi bir bozukluk nedeniyle oranlar değişebilir. Bu durumlar plazmadan hücreye, ya da hücreden plazmaya madde geçmesine yol açar. Genellikle, hücreden sperma plazmasına magnezyum ve potasyum, plazmadan hücreye ise sodyum ve kalsiyumun geçtiği bildirilmiştir (Labbe ve ark., 2001). Spermatozoonda bulunan başlıca kimyasal bileşiklerden özellikle deoksiribonükleik asit (DNA) mukopolisakkarid, aldehidrogenik lipid (plasmalogen), keratin-protein, enzim ve koenzimler önemli yer tutarlar (Bromage ve ark., 1992; Okumuş ve ark., 1998; Dreanno ve ark., 1999b; Zilli, 2003).

4.2. Yumurta

Balık üretiminde en yüksek sayı ve kalitede yumurta ve larva elde etmek temel amaçtır. Normal şartlar altında yumurtaların döllenmesi, embriyonal gelişimi ve çıkan larvaların yaşama oranı üzerinde, yumurta özellikleri olarak tanımlanan yumurta kalite parametreleri belirleyici rol oynamaktadır (Brooks ve ark., 1997). Kültürü yapılan veya yapılmaya çalışılan birçok balık türü için kaliteli yumurta üretimi önemli bir problemdir. Levrek, çipura, kalkan ve birçok yassı balıklarına ait yumurtaların yaşama oranı oldukça düşük olup, bu oran genellikle %5'den daha azdır (Tablo 1). Salmon balıklarının yumurtaları ve dolayısıyla larvaları kaliteli olmakla birlikte, yumurtaların 2/3'si ve larvalar kuluçkalamada ilk birkaç ay içerisinde kaybedilebilir (Bromage ve ark., 1992; Okumuş ve ark., 1998; Dreanno ve ark., 1999b; Zilli, 2003).

Gökkuşluğu alabalıklarındaki fertilizasyon oranı, ya döllenmeden sonraki ilk 12 saatte ya da embriyonun gelişiminden 7 gün sonra oluşan ölü veya gelişmeyen yumurtaların belirlenmesiyle tespit edilebilir (Springate ve ark., 1984; Bromage ve ark., 1992). Sonuç olarak gözlenmiş ve döllenmiş oran arasındaki korelasyonun belirlenmesi ile kalite kontrolü yapılır. Yumurta kalitesi, çoğunlukla gözlenmiş yumurta oranı olarak kullanılır (Turner, 1980; Willers, 1981; Bromage ve ark., 1992; Zilli ve ark., 2004).

Tablo 1. Gökkuşluğu alabalığı, deniz levreği, çipura ve kalkan anaçlarının yumurta verimleri ile yumurtaların döllenme ve çıkış oranları (Okumuş ve ark., 1997).

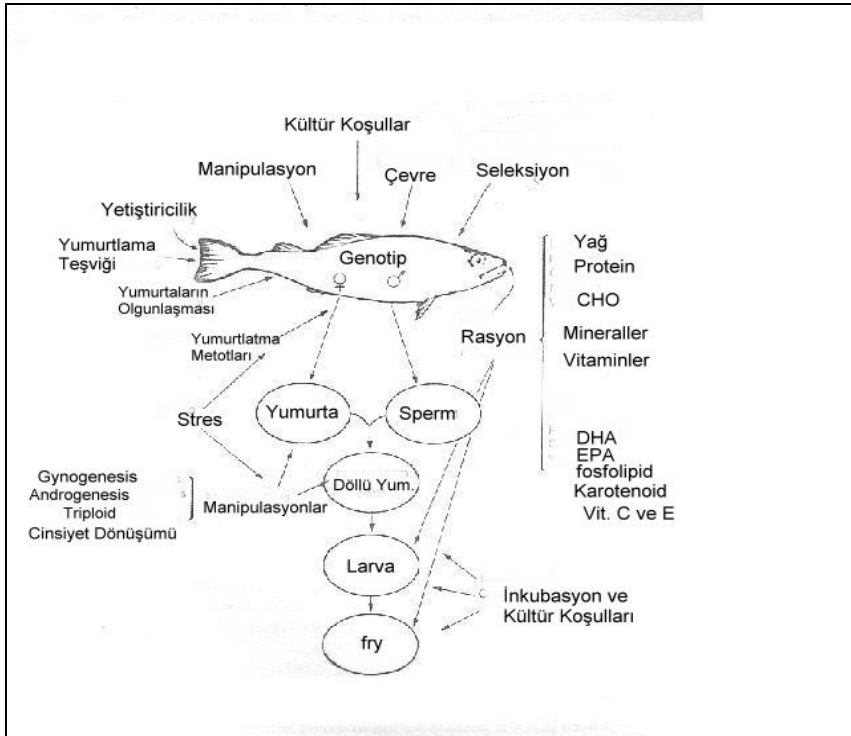
Tür	Yumurta Verimi		Döllenme Oranı (%)	Çıkış Oranı (%)	Larva (adet/kg anaç/yıl)
	Adet/kg anaç	Anaç ağırlığı (%)			
Alabalık	1.600	20 – 30	75 - 95	60 - 90	1.000
Levrek	300.000	20 - 25	90 – 95	75 - 85	220.000
Çipura	800.000	50 – 80	90 – 95	70 - 80	560.000
Kalkan	500.000	20 – 50	35 – 52	25 - 45	100.000

Diğer taraftan, deniz balıklarında yumurta kalitesini belirleme metodları açısından çok az ortak görüş vardır. Deniz balıklarına ait yumurtaların üstünlükleri genellikle deniz suyunda yüzme veya batma durumlarına göre tespit edilerek “düşük kaliteli” veya “iyi kaliteli” yumurta olarak ayrılırlar. Bununla birlikte, korion görünüşü, yumurta şekli, şeffaflığı ve yağ damlacıklarının dağılımı gibi birçok faktörün de yumurta kalitesi ile ilgili olduğu ileri sürülmektedir (Kjorsvik ve ark., 1990). Ayrıca, yassı deniz balıklarının

morfolojik karakterlerinin de kalite ile ilgili olduğu bildirilmiştir (Labbe ve ark., 1995; Okumuş ve ark.,1997). Dölleme oranı, deniz salmonlarında yumurta kalitesinin iyi bir göstergesidir (Kjorsvik ve ark., 2003).

Balıklar ve diğer evcil hayvanların arasındaki önemli bir farklılık, balıkların yüksek fekunditeye sahip olmasıdır. Balık türleri arasında da fekundite oldukça farklılık gösterebilir. Yassı deniz balıkları milyonlarca yumurta üretirken, salmonlarda bu değer binler düzeyindedir (Bromage, 1994; Caille ve ark., 2006). Ayrıca, çoğu deniz balıkları 2-3 ay sürebilen yumurtlama mevsiminde haftalık olarak yumurta üretirken, salmonlar yılda sadece bir kere yumurta üretebilirler. Anaç yönetimi ve planlaması salmonlar gibi düşük fekunditeye sahip olan balık türleri için büyük önem taşımaktadır (Bromage ve ark., 1994).

Ayrıca, yumurta sayısı veya fekundite ile birlikte yumurta büyüklüğü de kalitenin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Gillet, 1991; Dörücü ve Türk, 2001). Anaç balığın büyüklüğü yumurta sayısını ve büyüklüğünü etkileyen en önemli faktördür. Genel olarak, balık büyüklüğü fekundite ve yumurta çapını artırır. Bu özellik salmonlarda belirgin olarak gözlenir. Bununla beraber, gökkuşağı alabalıklarında, artan balık büyüklüğüyle birlikte fekunditede bir düşüş gözlenmektedir (Gillet ve ark., 1991; Labbe ve ark., 1997). Fekundite ve yumurta büyüklüğü üzerinde; genel olarak balığın büyüklüğü ve genotipi, stoklama yoğunluğu, stres oluşturan durumlar, besin kalitesi ve miktarı ile suyun fiziksel ve kimyasal özellikleri etkili olmaktadır (Şekil 4) (Bromage vd, 1994).



Şekil 4. Yumurta, sperma ve larva kalitesini etkileyen faktörler (Bromage ve ark., 1994).

Fekundite üzerine dolaylı etkilerine ilaveten, anaç balıkların günlük ve mevsimsel beslenme oranları da fekundite ve yumurta büyüklüğünü doğrudan etkilemektedir (Springate ve ark., 1984; Bromage ve ark., 1992). Bundan dolayı, tavsiye edilen günlük yemleme oranının yarısı veya çeyreği kadar yemle beslenen anaç alabalıkların yumurta sayısı %25 oranında azalmaktadır. Mevsimsel değişimlere bağlı olarak sudaki besin maddelerinin kalitesi ve miktarındaki değişimler, düşük veya yüksek besleme oranları, balıkların olgunlaşma oranı ve fekunditesi üzerinde belirli etkilere sahiptir (Bromage ve ark., 1992; Labbe ve ark., 1997). Üreme periyotlarının ilk 4 ayı için yüksek kalitedeki rasyonlarla beslemenin fekunditeyi arttırdığını, üretim döngüsünün daha sonraki safhalarında ise yüksek kalitedeki rasyonlarla beslemenin yumurta sayısında görünür bir etki yapmadığını bildirmiştir. Balık yumurtalarının olgunlaşması ve yumurta kalitesi arasında da bir ilişki mevcuttur.

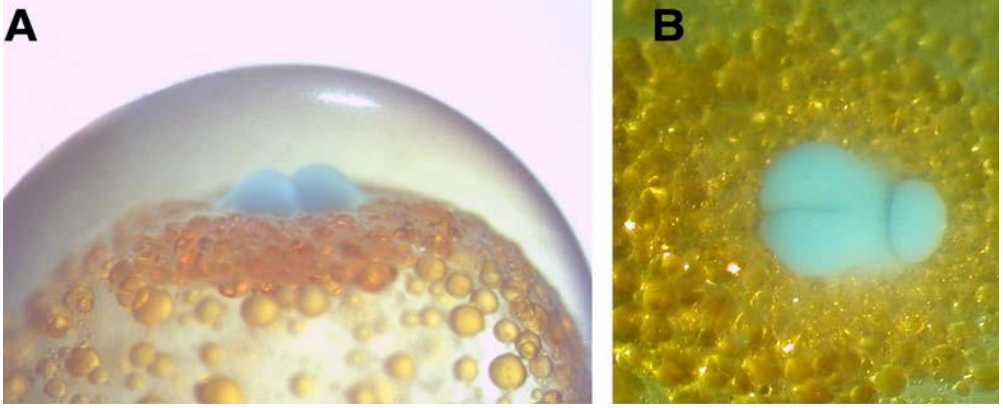
Dölleme ve Döllenme Başarısı

Döllenme başarısı, yumurta kalitesi ve bunun en belirgin değerlendirme kriteri olan sperm kalitesinin değerlendirilmesi için kullanılan erken değerlendirme kriteridir. Aslında; dölleme ve döllenebilme yeteneği gamet kalitesinin anahtar unsurlarından biridir. Bazı türlerde döllenme oranlarını kaydetmek kolaydır. Bu durum; morina (*Gadus Morua*), kalkan ve sarı kuyruklu dil balığı (*Limanda ferruginea*) gibi şeffaf yumurtalı balık türleri için geçerlidir. Bunun aksine, mat yumurtalı balık türleri için oldukça zordur. Geçmişte “döllenme oranı” tabirini kullanan birçok çalışma, çok sonraki aşamalarda görülen yaşayan embriyo durumunu tasvir etmiştir. Bu durum; spermin dölleme yeteneğinin yüzde bazında gelişen embriyolara bakılarak kaydedildiği sperm çalışmaları için geçerlidir. Böylece, dölleme oranının erken gelişim dönemi için iyi bir kriter olduğu anlaşılmaktadır. Ancak, türlere bağlı olarak bunun gözlemlenmesi zordur (Holtz ve ark., 1984; Munkittrick ve Moccia, 1987).

Ayrıca, birçok deniz balığı türünde de görüldüğü üzere ileriki gelişim durumları için, döllenme başarısı çok belirleyici bir unsur değildir (Shields ve ark., 1997). Döllenmeden sonra embriyo hücreleri bölünmeye başlar (Şekil 5). İlk embriyo hücrelerinin şekli ve anormal hücre bölünmelerinin meydana gelmesi şeffaf yumurtalı balıkların kalitesini gösteren bir kriterdir. Sarıkuyruklu dil balığında anormal klivaj erken embriyo ölümleriyle sonuçlanır (Beck ve ark., 1992; Contreras-Sanches ve ark., 1998; Avery ve Brown, 2005). Aynı zamanda sonraki aşamalarda blastomer şekli etkiler (Shields ve ark., 1997; Kjörsvik ve ark., 2003; Inaba, 2008).

Atlantik morinaları üzerinde yapılan son dönem çalışmaları; anormal klivaja uğrayan embriyoların yaşam süresinin normal embriyolarınkinden daha kısa olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, hem normal hem de anormal yumurtaların yaşama eğilimleri ve kuluçka başarıları arasında çok ciddi farklılıklara rastlanmamıştır. Bununla birlikte, anormal klivaj görünümünün embriyonik başarısızlıkla da sonuçlanmadığını ortaya koymuştur (Izguerdo ve ark., 2001; Avery ve ark., 2004).

Sonuç olarak, pelajik yumurtalarının yüzebilir olması; tüm türler (Brooks ve ark., 1997) bazında olmasa da, mercan balığı (*Pagrus major*) gibi bazı balık türlerinin (Hokanson ve ark., 1973; Takeuchi ve Watanabe, 1982; Sakai ve ark., 1985; Kjörsvik ve ark., 2003) normal olarak gelişebilen yumurtaları için daha iyi olduğu savunulmuştur.



Şekil 5. Dölllenmiş gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yumurtasının; yandan (A) ve üstten (B) görünüşü (Knoll-Gellida ve ark., 2008).

Embriyo Yaşama Oranı

Embriyonik aşamada; embriyonun hayatta kalması, başarılı bir biçimde gelişen yumurtanın döllenme ve spermatozoanın döllenme yeteneğini karakterize eden en yaygın dönemdir. Bu devrede hayatta kalma durumu; birçok balık türünde görülen gözlenme aşaması, kuluçka, besin kesesi emilimi aşaması gibi özel aşamalarda değerlendirilebilir. Ayrıca bu durum; farklı deneysel çalışmaların arasında farklılık gösteren embriyonik yaşam sürelerinin karakterize edilerek gelişim süreçlerinde hayatta kalma durumunun izlenebilmesi için çok değerli bilgiler sunmaktadır (Campbell ve ark., 1992; Kopeika ve ark., 2003; Bonnet ve ark., 2007a; Cosson., 2008).

SONUÇ

Görüldüğü gibi, gamet kalitesinin değerlendirme kriterleri (belirteçleri) ya da tahmini değerlerinin bilinmesi balık üretiminde büyük önem taşımaktadır. Örnek olarak; yumurtaların “zayıf” ya da “iyi kaliteli” olarak ayırımlarının yapılması bu yumurtaların birbirleri ile karıştırılma riskini önlemeye yardımcı olacaktır. Benzer şekilde, sperm için; zayıf döllenme oranına sahip olan spermlerin ayırımının yapılması tüm yumurtaların kaybına neden olacak düzeyde riskin önlenmesine yardımcı olacaktır.

Diğer taraftan, günümüze kadar gamet kalitesinin tahmini belirteçleri ya da değerleri net olarak belirlenebilmiş değildir. Su üzerinde durabilme, görünüm ve hareketlilik gibi basit parametreler yoluyla bazı durumlarda yaşayabilme yeteneği olmayan gametler bu şekilde elimine edilebilirlerse de, çok düşük kaliteyi işaret eden belirteçler hariç, döllenmeden önceki gametlerin kalitesini net bir biçimde belirtmek hala oldukça zor olabilmektedir. Bu yüzden, gamet kalitesinin net bir biçimde belirlendiği tek biyolojik yol döllenmeyi sağlamak ya da embriyo ve larvanın canlı kaldığını izlemenin olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Aegerter, S., Jalabert, B., Bobe, J. 2005. Large scale Real-Time PCR Analysis of mRNA Abundance in rainbow Trout Eggs in Relationship with Egg Quality and Postovulatory Ageing. *Mol. Reprod. Dev.*, 72: 377–385.

- Alaçam, E., Tuncer, S. D., Salmanoglu, M. R., Özlüer A. 1994. The Effects of a Nutritionally Unbalanced Diet on Some Blood and Postpartum Fertility Parameters in Dairy Cows. Tr. J. Vet. Anim. Sci., 32: 99-106.
- Avery, T.S., Boyce, D., Brown, J.A. 2004. Mortality of Yellowtail Flounder, *Limanda ferruginea* (Storer), Eggs: Effects of Temperature and Hormone-Induced Ovulation. Aquacul., 230: 297-311.
- Avery, T.S., Brown, J.A. 2005. Investigating the Relationship among Abnormal Patterns of Cell Cleavage, Egg Mortality and Early Larval Condition in *Limanda ferruginea*. J. Fish Biol., 67: 890-896.
- Bally-Cuif, L., Schatz, W.J., Ho, R.K. 1998. Characterization of the Zebrafish Orb/ CPEB-Related RNA Binding Protein and Localization of Maternal Components in the Zebrafish Oocyte. Mech. Dev., 77: 31-47.
- Beck, J.C., Fulcher, K.D., Beck, C.F., Cloud, J.G. 1992. Sperm Surface Antigen Required for Fertility: Identification on Spermatozoa of Rainbow Trout by Use of Monoclonal Antibodies. Trans. Am. Fish. Soc., 121: 333-339.
- Billard, R., Gillet, C. 1981. Ageing of Eggs and Temperature Potentialization of Micropollutant Effects of the Aquaculture Medium on Trout Gametes. Cahier du Laboratoire de Montereau, 12: 35-42.
- Bonnet, E., Fostier, A., Bobe, J. 2007a. Characterization of Rainbow Trout Egg Quality: a Case Study Using Four Different Breeding Protocols, with Emphasis on the Incidence of Embryonic Malformations. Theriogenology, 67: 786-794.
- Bonnet, E., Fostier, A., Bobe, J. 2007b. Microarray-Based Analysis of Fish Egg Quality After Natural or Controlled Ovulation. BMC Genomics, 8: 55.
- Bromage, N., Jones, J., Randall, C., Thrush, M., Davies, B., Springate, J.R.C., Duston, J., Barker, G. 1992. Broodstock Management, Fecundity, Egg Quality and the Timing of Egg Production in the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquacult., 100: 141-166.
- Bromage, N., Bruce, M., Basavaraja, N., Rana, K., Shields, R., Young, C., Dye, J., Smith, P., Gillespie, M., Gamble, J. 1994. Egg Quality Determinants in Finfish: the Role of Overripening with Special Reference to the Timing of Stripping in the Atlantic Halibut *Hippoglossus hippoglossus*. J. World Aquacult. Soc., 25: 13-21.
- Brooks, S., Tyler, C.R., Sumpter, J.P. 1997. Egg Quality in Fish: What Makes a Good Egg? Revi. Fish Biol. Fish., 7: 387-416.
- Burns, K.H., Viveiros, M.M., Ren, Y., Wang, P., DeMayo, F.J., Frail, D.E., Eppig, J.J., Matzuk, M.M. 2003. Roles of NPM2 in Chromatin and Nucleolar Organization in Oocytes and Embryos. Science, 300: 633-636.
- Büyükhapıoglu, S., Holtz, W. 1984. Sperm Output in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*)-Effect of Age, Timing and Frequency of Stripping and Presence of Females. Aquacult., 37: 63-71.
- Caille, N., Rodina, M., Kocour, M., Gela, D., Flajshans, M., Linhart, O. 2006. Quantity, Motility and Fertility of Tench *Tinca tinca* (L.) Sperm in Relation to LHRH Analogue and Carp Pituitary Treatments. Aquacult. Int., 14: 75-87.
- Campbell, P.M., Pottinger, T.G., Sumpter, J.P. 1992. Stress Reduces the Quality of Gametes Produced by Rainbow Trout. Biol. Reprod., 47: 1140-1150.
- Contreras-Sanchez, W.M., Schreck, C.B., Fitzpatrick, M.S., Pereira, C.B. 1998. Effects of Stress on the Reproductive Performance of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Biol. Reprod., 58: 439-447.
- Cosson, J. 2008. The Motility Apparatus of Fish Spermatozoa. In: Alavi, S.M.H., Cosson, J.J., Coward, K., Rafiee, G. (Eds.), Fish Spermatology, Alpha Science International Ltd., Oxford, pp. 281-316.
- Dreanno, C., Cosson, J., Suquet, M., Seguin, F., Dorange, G., Billard, R. 1999a. Nucleotide Content, Oxidative Phosphorylation, Morphology and Fertilizing Capacity of Turbot (*Psetta maxima*) Spermatozoa during the Motility Period. Mol. Reprod. Dev., 53: 230-243.

- Dreanno, C., Suquet, M., Fauvel, C., Le Coz, J.R., Dorange, G., Quemener, L., Billard, R. 1999b. Effect of the Aging Process on the Quality of Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) Semen. J. Appl. Ichthyol., 15 176–180.
- Feist, G., Yeoh, C.H., Fitzpatrick, M., Schreck, C.B. 1995. The Production of Functional Sex-Reversed Male Rainbow Trout with 17 α -Methyltestosterone and 11 β -Hydroxyandrostenedione. Aquacult., 131: 145-152,
- Gillet, C. 1991. Egg Production in an Artic Charr (*Salvelinus alpinus* L.) Brood Stock: Effects of Temperature on the Timing of Spawning and the Quality of Eggs. Aquat. Living Resour., 4: 109–116.
- Holtz, W. 1984. Sperm Output in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*)- effect of age, timing and frequency of stripping and presence of females. *Aquaculture* 37, 63–97.
- Hokanson, K.E., McCormick, J.H., Jones, B.R., Tucker, J.H. 1973. Thermal Requirements for Maturation, Spawning and Embryo Survival of the Brook Trout, *Salvelinus fontinalis*. J. Fish. Res. Board Can., 30: 975-984.
- Hwang, P.P., Wu, S.M., Lin, J.H., Wu, L.S. 1992. Cortisol Content of Eggs and Larvae of Teleosts. Gen. Comp. Endocrinol., 86: 189–196.
- Inaba, K. 2008. Molecular Mechanisms of the Activation of Flagellar Motility in Sperm. In: Alavi, S.M.H., Cosson, J.J., Coward, K., Rafiee, G. (Eds.), Fish spermatology, Alpha Science International Ltd., Oxford, pp. 267–279.
- Izquierdo, M.S., Fernandez-Palacios, H., Tacon, A.G.J. 2001. Effect of Broodstock Nutrition on Reproductive Performance of Fish. Aquacult., 197: 25-42.
- Kayalı, H., Satiroglu, G., Tasyürekli, M. 1992. The Effects of Fluctuating Seasonal and Constant Water Temperatures on The Photoperiodic Advancement of Reproduction in Female Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquacult., 205:193–204.
- Kjørsvik, E., Mangor-Jensen, A., Homefjord, I. 1990. Egg Quality in Marine Fishes. Adv. Marine Biol., 26: 71–113.
- Kjørsvik, E., Hoehne-Reitan, K., Reitan, K.I. 2003. Egg and Larval Quality Criteria as Predictive Measures for Juvenile Production in Turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Aquacult., 227: 9-20.
- Knoll-Gellida, A., Andre, M., Gattegno, T., Forgue, J., Admon, A., Babin, P.J. 2008. Molecular Phenotype of *Oncorhynchus mykiss* Ovarian Follicle by Serial Analysis of Gene Expression and Proteomic Profiling and Comparison with the Transcriptomes of Other Animals. BMC Genomics, 7: 46.
- Kopeika, J., Kopeika, E., Zhang, T., Rawson, D.M., Holt, W.V. 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.
- Köprücü, K., Gür, S., 1999. Gökkuşluğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*, W.)'nın Sperma ve Yumurta Kalitesinin Dölverimi Üzerine Etkisi. Hayvancılık Araş.Derg., 9(1-2): 81-86.
- Labbe, C., Maisse, G., Muller, K., Zachowski, A., Kaushik, S., Loir, M. 1995. Thermal Acclimation and Dietary Lipids Alter the Composition but not Fluidity of Trout Sperm Plasma Membrane. Lipids, 30: 23–33.
- Labbe, C., Crowe, L.M., Crowe, J.H. 1997. Stability of the Lipid Component of Trout Sperm Plasma Membrane during Freeze–Thawing. Cryobiology, 34: 176-182.
- Labbe, C., Martoriati, A., Devaux, A., Maisse, G. 2001. Effect of Sperm Cryopreservation on Sperm DNA Stability and Progeny Development in Rainbow Trout. Mol. Reprod. Dev., 60: 397-404.
- Mommsen, T., Korsgaard, B. 2008. Vitellogenesis. In: Rocha, M.J., Arukwe, A., Kapoor, B.G. (Eds.), Fish Reproduction Science Publishers, Enfield, pp. 1–36.
- Munkittrick, K.R., Moccia, R.D. 1987. Seasonal Changes in the Quality of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) Semen: Effect of a Delay in Stripping on Spermatocrit, Motility, Volume And Seminal Plasma Constituents. Aquacult., 64:147-156.

- Okumuş, İ., Üstündağ, C., Kurtoğlu, İ. Z., Başçınar, N. 1997. Deniz Kafesleri ve Tatlı Su Havuzlarında Stoklanan Gökkuşluğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Anaçlarının Sağım Zamanı, Yumurta Verimi ve Kalite Özellikleri. IX Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, 17-19 Eylül 1997, Isparta.
- Okumuş, İ., Başçınar, N., Ikan, M.Z., Kurtoğlu, İ. Z. 1998. Kaynak Alabalığının (*Salvelinus fontinalis*) Doğu Karadeniz Koşullarında Deniz Suyu ve Tatlı Su Ortamlarındaki Büyüme ve Kültür Potansiyeli.III Su Ürünleri Sempozyumu, 10-12 Haziran 1998, Erzurum.
- Okumuş, İ. 2003. Rainbow Trout Broodstock Management and Seed Production in Turkey: Present Practices, Constraints and the Future. Turkish J. Fisheries and Aquatic Sciences, 2: 41-56.
- Patino, R., Sullivan, C.V. 2002. Ovarian Follicle Growth, Maturation and Ovulation in Teleost Fish. Fish Physiol. Biochem., 26: 57-70.
- Pelegri, F. 2003. Maternal Factors in Zebrafish Development. Dev. Dyn., 228: 535- 554.
- Sakai, K., Nomura, M., Takashima, F. 1985. Characteristics of Naturally Spawmed Eggs of Red Sea Bream. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish, 51: 1395-1399.
- Shields, R.J., Brown, N.P., Bromage, N.R.. 1997. Blastomere Morphology as a Predictive Measure of Fish Egg Viability. Aquacult.,155: 1-12.
- Springate, J.R.C., Bromage, N.R., Elliott, J.A.K., Hudson, D.L. 1984. The Timing of Ovulation and Stripping and their Effects on the Rates of Fertilization and Survival to Eying, Hatch and Swim-up in the Rainbow Trout (*Salmo gairdneri* R.). Aquacult., 43: 313-322.
- Tagawa, M., Hirano, T. 1987. Presence of Thyroxine in Eggs and Changes in its Content during Early Development of Chum salmon, *Oncorhynchus keta*. Gen. Comp Endocrinol., 68: 129-135.
- Takeuchi, T., Watanabe, T. 1982. Effects of Various Polyunsaturated Fatty Acids on Growth and Fatty Acid Compositions of Rainbow Trout *Salmo gairdneri*, coho salmon *Onchorhynchus kisutch* and chum salmon *Onchorhynchus keta*. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 48: 1745-1752.
- Tata, J.R. 1986. Coordinated Assembly of the Developing Egg. Bioessays, 4: 197–201.
- Terner, C. 1980. Oxidative and Biosynthetic Reactions in Spermatozoa. In: Bishop D.W. (Ed.), Spermatozoan Motility, American asociation for the Advancement of Science, Washington D.C., pp. 89–98.
- Türk, C., Dörücü, M. 2001. Gökkuşluğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nın Yumurta Çapı ile Vücut Büyüklüğü Arasındaki İlişki ve Larvaların Yaşama Oranlarının Belirlenmesi. XI. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, 04-06 Eylül 2001, Hatay.
- Wallace, R.A., Selman, K. 1985. Major Protein Changes during Vitellogenesis and Maturation of Fundulus Oocytes. Dev. Biol., 110: 492-498.
- Willers, W.B. 1981. Trout Biology, an Angler's Guide the University of Wisconsin press, London, England.
- Yavuz, H. 2012. Farklı Kromozomlara (XX ve XY) Sahip Erkek Gökkuşluğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Spermlerinin Dölleme Kalitesi. Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi, Elazığ.
- Zilli, L., Schiavone, R., Zonno, V., Storelli, C., Vilella, S. 2003. Evaluation of DNA Damage in *Dicentrarchus labrax* Sperm Following Cryopreservation. Cryobiology, 47: 227–235.