

## ERBRO IRKI HOROZ SPERMALARININ FARKLI SULANDIRICI VE KRYOPROTEKTANLARLA DONDURULMASI

(Freezing of Erbro Cock's Semen With Different  
Diluents and Cryoprotectants.)

Ongun KESKİN \*

Necmettin TEKİN \*\*

Ergun AKÇAY \*\*\*

### SUMMARY

In this experiment, the effects of different semen diluents were assessed on freezing of semen and post-thawing spermatological characteristics via invitro datas in Erbro cocks.

In the study, 44 ejaculates collected from two cocks, three times in a week by massage method were treated with regard to principal spermatological characteristics. These are as follows: (1) Ejaculate volume averaged  $0.5 \pm 0.1$  ml., (2) sperm motility  $87.7 \pm 0.9$  %, (3) sperm concentration  $2.2 \times 10^9 \pm 0.1$ , pH  $7.4 \pm 0.1$ .

Mixed ejaculates were diluted with the two different semen diluents and frozen in liquid nitrogen vapour. Frozen thawed semen was assessed by means of thermoresistance test ( $40$  °C). Post-thawing motility and percentage of abnormal sperm were  $36.7 \pm 2.6$  % and  $17.4 \pm 2.1$  % respectively for semen diluted with BPSV-1 containing 5 % Glycerol 5 % DMSO as cryoprotectants;  $41.7 \pm 2.1$  and  $21.7 \pm 2.8$  with BPSV-2 containing 8 % Glycerol and 4 % DMSO. The same factures were recorded as  $46.7 \pm 1.9$  %,  $18.2 \pm 1.1$  % and  $44.2 \pm 1.9$  %,  $23.8 \pm 2.9$  % respectively for semen diluted with Ringer -1 and Ringer -2.

---

\*: Dr. A Ü. Vet. Fak. Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, ANKARA

\*\* : Prof. Dr. A Ü. Vet. Fak., Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, ANKARA.

\*\*\*: Arařt. Gör. A Ü. Vet. Fak., Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, ANKARA

During the thermoresistance tests, it was observed that sperm motility ceased at 2. and 2.5 hours in semen diluted with BPSV-1 and BPSV-2; at 4. hours with Ringer-1 and Ringer-2; and at 6. hours in control group.

## ÖZET

Çalışmada Erbro ırkı horoz ejakülatlarında spermanın dondurulması ve çözüm sonrası spermatolojik özellikler üzerine farklı sperma sulandırıcılarının etkileri invitro bulgulara dayanarak değerlendirilmiştir.

Araştırmada, masaj yöntemiyle haftada 3 kez alınan toplam 44 ejakülatta saptanan başlıca spermatolojik özellikler (1) ejakülat miktarında  $0.5 \pm 0.1$  ml., (2) spermatozoa motilitesi %  $87.7 \pm 0.9$ , (3) spermatozoa yoğunluğunda  $2.2 \times 10^9 \pm 0.1/\text{ml.}$ , (4) anormal spermatozoa oranında %  $5.0 \pm 0.6$  ve spermanın pH degerinde  $7.4 \pm 0.1$  olmuştur.

Her iki ejakülatın birleştirilmesiyle elde edilen mix ejakülat iki farklı solusyonla sulandırılarak sıvı azot buharında dondurulmuştur. Dondurulmuş spermalar  $40^\circ\text{C}$ ' de uygulanan termorezistens testle değerlendirilmiştir. % 5 glyserol ve % 5 DMSO içeren BPSV -1 sulandırıcısı için çözüm motilitesi ve anormal spermatozoa oranı %  $36.7 \pm 2.6$  ve %  $17.4 \pm 2.1$  olurken, benzer değerler % 8 glyserol ve % 4 DMSO bulunduran BPSV-2 solusyonuyla %  $41.7 \pm 2.1$  ve %  $21.7 \pm 2.8$  olmuştur. Aynı oranlarda glyserol ve DMSO bulunduran Ringer -1 ve 2 sulandırıcısıyla ise çözüm motilitesi ve anormal spermatozoa oranları %  $46.7 \pm 1.9$ , %  $18.2 \pm 1.1$  ve %  $44.2 \pm 1.9$ , %  $23.8 \pm 2.9$  bulunmuştur.

Termorezistens test uygulamasında spermatozoa motilitesi sınırlaması BPSV-1 ve BPSV-2 sulandırıcılarında 2. ve 2.5. saatlerde gözlenmesine karşın, Ringer-1 ve Ringer-2 solusyonlarında 4. saatte olmuştur. Termorezistens testte kontrol olarak yer alan nativ spermada ise spermatozoonların motiliteleri 6. saatte sona ermiştir.

## GİRİŞ

Son elli yıl içinde dünyada hayvan ıslahındaki ilerlemeler ve tavukçuluk alanındaki bilimsel ve teknik gelişmeler sonucu üstün verimli ticari tavuk tipleri üretilmiştir. Bu alanda 20. yüzyılın ortalarında başlatılan sun'i tohumlama çalışmaları ve

horoz spermasının kısa süreli saklanması ya da dondurulması gibi biyoteknolojik uygulamalardan da yararlanılarak önemli ilerlemeler sağlanmıştır.

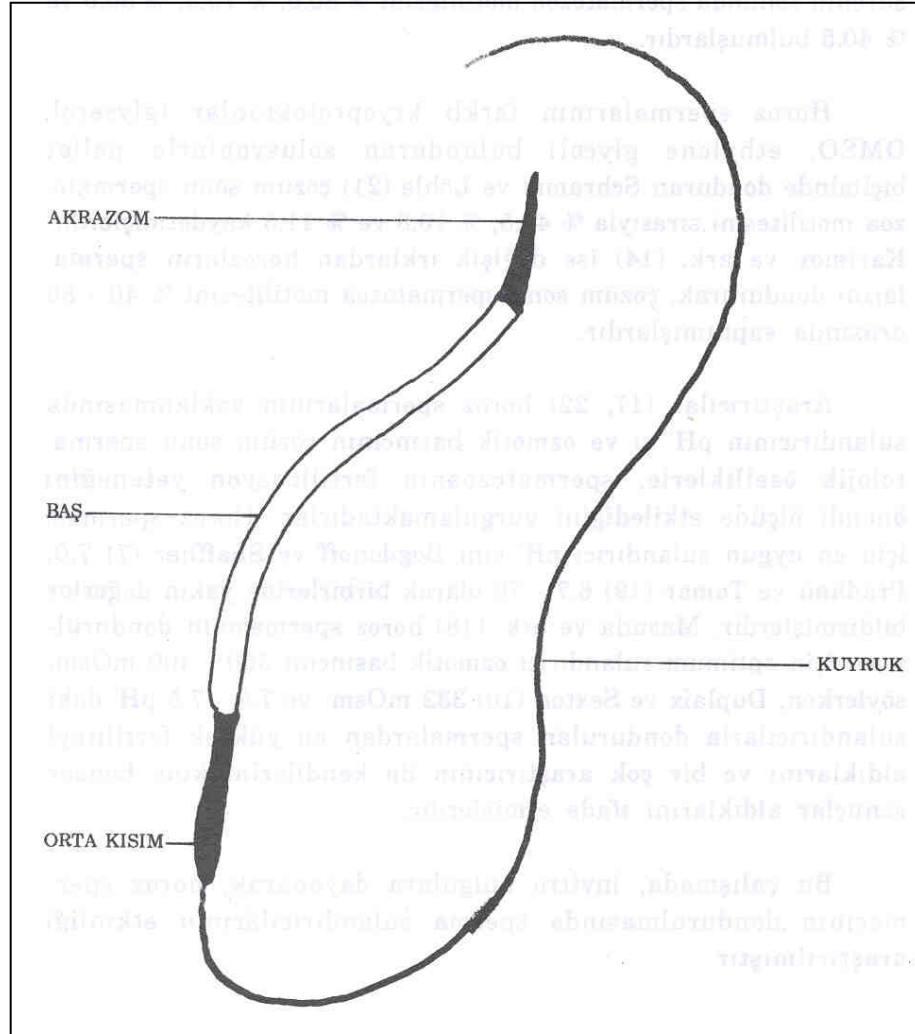
Ülkemizde ise 1960' lı yıllardan itibaren endüstriyel tavukçuluğun başlamasıyla devlet çiftliklerine yüksek verimli ırklar getirilmiş, Marmara ve Ege bölgesinde yetiştiricilere dağıtılarak tavukçuluk özendirilmiştir. Türkiye' de ilk yerli hibrit elde etme çalışmaları 1968 de başlamış olup, 1980' li yılların başlarında tavukçuluk alanında önemli gelişmeler gözlenmiştir. Ancak tavukçuluk kurumlarında fertilité ve kuluçka çıkışıyla ilgili kayıtlar düzenli olarak tutulmadığı gibi, ülkemiz koşullarında tavukçuluk alanında elde edilen gelişmelere rağmen, henüz horoz ve tavukların reproduktif özelliklerine ilişkin bilgiler de istenen düzeyde değildir. Ayrıca horoz spermalarının dondurulması, dondurulmuş spermalarla yapılan tohumlamalardan elde edilen dölverimleri de ortaya konmamıştır.

Bu kapsamda, tavuklarda sun 'i tohumlamanın yer alması gerekliliği, popülasyondaki horoz sayısının düşürülmesi (17 tavuğa 1 horoz), üstün verimli horozlardan daha fazla yararlanılabilmesi, hayvan ıslahı ve seleksiyon çalışmalarını kolaylaştırması, üretim maliyetini düşürmesi, düşük ısılarda kısa süre ve dondurularak uzun süre saklanabilen horoz spermalarının gerektiği zaman kullanılabilmesi, bir yerden başka bir yere kolayca gönderilebilmesi ve kafes tavukçuluğunda döllü yumurta elde edilmesi gibi faydalarından dolayı kaçınılmaz olmuştur.

İyi kalitede, yoğunluğu yüksek bir horoz sperması pembe-beyaz renkte, kıvamlı bir yapı gösterir. Irk, yaş, birey, mevsim, ışık ve diğer bir çok çevre faktörlerinden etkilenebilen ejakülat miktarı ortalama olarak 0.7 rnl., spermatozoa yoğunluğu  $3 \times 10^9$ /rnl., pH' sı 7.5 dur. Kanatlı spermatozoonlarının şekli genel olarak birbirine benzerse de, türler arasında genişlik ve uzunlukları değişir. Horoz spermatozoonunda akrozom yaklaşık 2 µm, baş 12.5 µm, orta kısım 4 µm, kuyruk 80 µm uzunlukta ve 0.5 µm genişliktedir (1 µm: milimetrenin binde biri, Şekil 1 (16)).

Bugüne kadar sun'i tohumlama ya da biyoteknolojik araştırmalar için deneysel olarak zaman zaman sun'i vajen (12) ve elektroejakülasyon (15) yöntemiyle sperma alınmışsa da günümüzde masaj yöntemi yaygın biçimde uygulanmaktadır (3, 6).

Horoz sperması kısa ya da uzun süreli olarak pellet, payet ve ampul biçiminde başarıyla saklanabilmektedir.



Şekil 1. Horoz spermatozoonunun Őematik g3r3n3m3.

Horoz spermalarını BPSV ile 1:5 oranında sulandırarak farklı ısı ve sürelerde kısa süreli saklayan Clarke ve ark. (9) en yüksek spermatozoa motilitesini (% 80) 41 °C da saptarlarken, bir başka çalışmalarında (8) inkubasyon ısısının artmasıyla ölü spermatozoa oranı ve anormal spermatozoa oranının yükseldiğini ortaya kuymuşlardır. Balashov ve ark. (5) dört farklı sulandırıncıyla horoz spermalarını 2 - 5 °C da 30 saat bekleterek bu sürenin sonunda spermatozoa motilitesini %80.6, %70.3, %60.6 ve % 40.5 bulmuşlardır.

Horoz spermalarının farklı kryoprotektanlar (glyserol, DMSO, ethylene glycol) bulunduran solusyonlarla pellet biçiminde donduran Schramm ve Löhle (21) çözüm sonu spermatozoa motilitesini sırasıyla %41.5, %10.8 ve %11.3 kaydetmişlerdir. Karimov ve ark. (14) ise değişik ırklardan horozların spermalarını dondurarak, çözüm sonu spermatozoa motilitesini % 40 -80 arasında saptamışlardır.

Araştırmacılar (17, 22) horoz spermalarının saklanması sulandırıcının pH' sı ve ozmotik basıncının çözüm sonu spermatojistik özelliklerle, spermatozoanın fertilizasyon yeteneğini önemli ölçüde etkilediğini vurgulamaktadırlar. Horoz sperması için en uygun sulandırıcı pH' sını Bogdonoff ve Shaffner (7) 7.0, Pradhan ve Tomar (19). 6.7-7.0 olarak birbirlerine yakın değerler bildirmişlerdir. Masuda ve ark. (18) horoz spermasının dondurulması için optimum sulandırıcı ozmotik basıncını 300-400 mOsm. söylerken, Duplaix ve Sexton (10) 332 mOsm. ve 7.0 -7.5 pH' daki sulandırıcılarla dondurulan spermalardan en yüksek fertilitayı aldıklarını ve bir çok araştırmacının da kendilerinininkine benzer sonuçlar aldıklarını ifade etmişlerdir.

Bu çalışmada, invitro bulgulara dayanarak, horoz spermasının dondurulmasında sperma sulandırıcılarının etkinliği araştırılmıştır.

## MATERYAL ve METOD

Çalışmada erbro ırkı 2 horozun spermaları kullanılmıştır. Araştırmanın başlangıcında horozlar 1 hafta süreyle sperma vermeye alıştırmışlardır. Araştırma süresince spermalar masaj yöntemiyle haftada 3 kez alınmıştır. Her iki horozun ejakülat miktarları ayrı ayrı kaydedildikten sonra, aynı sperma toplama kadehinde birleştirilerek, karışık ejakülat (rnix ejakülat) elde edilmiş ve sperma alma yerinde hazırlanan laboratuvarında başlıca spermatolojik özellikler yönüyle incelenmiştir.

Spermaların dondurulması için BPSV ve Ringer solusyonları olmak üzere iki ayrı sperma sulandırıcısı kullanılmıştır. Kryoprotektan olarak her sulandırıcı için iki farklı Glycerol (% 5 ve % 8) ve DMSO (% 5 ve % 4) oranları kullanılarak BPSV-1, BPSV-2 ve Ringer-1, Ringer-2 olmak üzere dört ayrı sulandırma grubu oluşturulmuştur. Spermatolojik özellikleri saptandıktan sonra dört eşit kısma bölünerek elde edilen split ejakülatlar yukarıda kryoprotektan oranları verilen sperma sulandırıcılarıyla bir tohumlama dozunda (0.25 ml.)  $300 \times 10^6$  motil spermatozoa bulunduracak biçimde payetlere çekilerek dozlanmış, buzdolabında + 4 °C' de 1 saat alışma (Ekilibrasyon) bırakılmıştır. Alışmadan sonra spermalar yaklaşık -120 °C' deki sıvı azot buharında 10 dakika bekletilerek dondurulmuş ve sıvı azot içinde -196 °C' de saklanmıştır.

Sulandırılmış spermalarda spermatozoa motilitesinin değerlendirilmesi yanında, her sulandırıcı ve kryoprotektan oranı için 40 °C' de 15 saniyede çözülen dondurulmuş spermalarda ise anormal spermatozoa tipleri ve toplam oranları ile 40 °C , deki su banyosunda tutularak uygulanan termorezistens test süresince toplam 12 karışık nativ spermalarda 60 dakikada bir, çözülmüş spermalarda ise 30 dakikada bir spermatozoa motilitele-ri saptanmıştır.

## BULGULAR

Araştırmada kullanılan 2 erbro horozun toplam 22 karışık ejakülatında saptanan spermatojik özelliklerin genel ortalama değerleri, ejakülat miktarı  $0.5 \pm 0.1$  ml. (1 nolu horozda),  $0.7 \pm 0.1$  ml. (2 nolu horozda), spermatozoa motilitesi %  $87.7 \pm 0.9$ , spermatozoa yoğunluğu  $2.201 \pm 0.1 \times 10^9/\text{ml}$ ., anormal spermatozoa oranı %  $5.0 \pm 0.6$  ve spermanın pH' sı  $7.4 \pm 0.1$  bulunmuştur (Tablo 1).

Tablo 1. Taze horoz spermalarında başlıca spermatojik özelliklerin ortalama değerleri.

Horoz	Ejakülat miktarı (ml)		Spermat. Motilitesi (%)	Spermat. Yoğunluğu (x 10/ml)	Anormal spermat. oranı (%)	pH
	1	2				
Genel Ort. X ± Sx n=44	0.5±0.1	0.7±0.1	87.7±0.9	2.2±0.1	5.0±0.6	7.4±0.1
Toplam	0.6±0.1					

Nativ spermada anormal spermatozoon tiplerinden akrozom, baş, orta kısım ve kuyruğa ait ortalama değerler ( $x \pm s$ ) Tablo 2' de verilmiştir. Bu değerler sırasıyla %  $0.4 \pm 0.2$ , %  $2.2 \pm 0.4$ , %  $2.3 \pm 0.5$  ve %  $0 \pm 0$ , genel ortalama anormal spermatozoa oranı ise %  $4.9 \pm 0.2$  kaydedilmiştir.

Dondurulmuş spermalarda çözüm sonu spermatozoa motilitesi BPSV-1 ve BPSV-2 ile sırasıyla % $36.7 \pm 2.6$  ve % $41.7 \pm 2.1$ , Ringer-1 ve Ringer-2 ile % $46.7 \pm 1.4$  ve % $44.2 \pm 1.9$  saptanmıştır.(Tablo 3).

Tablo 2' den de izleneceği gibi ortalama değerler üzerinden ( $X \pm S$ ) çözümden sonra anormal spermatozoa oranı BPSV-1 ve BPSV-2 ile %  $17.4 \pm 2.1$  ve %  $21.7 \pm 2.8$ , Ringer-1 ve 2 ile % $18.2 \pm 1.1$  ve %  $23.8 \pm 2.9$  olmuştur.

Tablo 2. Taze ve çözülmüş horoz spermalarında anormal spermatozoon Tipleri ve genel ortalamaları (%).

ANORMAL SPERMATOZOON TIPLERİ	NATİV X ± SX	PBSV-1 X ± SX	PBSV-2 X ± SX	RİNGER-1 X ± SX	RİNGER-2 X ± SX
AKROZOM	0.4 ± 0.2	4.9 ± 1.6	4.6 ± 1.1	3.0 ± 0.4	3.2 ± 0.5
BAŞ	2.2 ± 0.4	5.0 ± 0.8	9.4 ± 2.6	2.4 ± 0.3	6.9 ± 2.8
ORTA KESİM	2.3 ± 0.5	7.4 ± 1.0	7.2 ± 1.2	12.5 ± 1.1	13.4 ± 2.0
KUYRUK	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1
TOPLAM	4.9 ± 0.6 <sup>a</sup>	17.4 ± 2.1 <sup>b</sup>	21.7 ± 2.8 <sup>b</sup>	18.2 ± 1.1 <sup>b</sup>	23.8 ± 2.9 <sup>b</sup>
Ö.D.	***	-	-	-	-

n=22

Ö.D. : Önemlilik Derecesi

- : P>0.05, Grup ortalamaları arası fark önemsiz,

\*\*\* : P<0.05, Grup ortalamaları arası fark önemli,

a, b : Aynı satırda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arası fark önemli.



Tablo 3. Dondurulmuş horoz spermalarına uygulanan termorezistens test  
Bulguları (Spermatozoa motilitesi %).

SÜRE d	NATİV X ± SX	PBSV-1 X ± SX	PBSV-2 X ± SX	RİNGER-1 X ± SX	RİNGER-2 X ± SX	Ö.D.
0	87.7 ± 0.9	36.7 ± 2.6 <sup>a</sup>	41.7 ± 2.1 <sup>ab</sup>	46.7 ± 1.4 <sup>b</sup>	44.2 ± 1.9 <sup>b</sup>	**
30	-	13.3 ± 3.1 <sup>a</sup>	16.7 ± 3.4 <sup>a</sup>	45.8 ± 1.9 <sup>b</sup>	37.1 ± 5.2 <sup>b</sup>	***
60	87.7 ± 0.9	5.0 ± 1.7 <sup>a</sup>	7.5 ± 2.6 <sup>a</sup>	35.0 ± 2.3 <sup>b</sup>	26.7 ± 4.6 <sup>b</sup>	***
90	-	1.7 ± 1.1 <sup>a</sup>	2.5 ± 1.7 <sup>a</sup>	20.4 ± 3.7 <sup>b</sup>	17.9 ± 4.1 <sup>b</sup>	***
120	77.5 ± 1.3	0 ± 0 <sup>a</sup>	0.8 ± 0.4 <sup>a</sup>	12.1 ± 3.0 <sup>b</sup>	10.0 ± 2.9 <sup>b</sup>	***
150	-	0 ± 0 <sup>a</sup>	0 ± 0 <sup>a</sup>	6.3 ± 2.8 <sup>b</sup>	4.6 ± 1.9 <sup>b</sup>	**
180	66.7 ± 1.4	-	-	4.6 ± 2.6	1.3 ± 0.9	-
210	-	-	-	1.3 ± 0.9	0.4 ± 0.4	-
240	40.8 ± 4.0	-	-	0 ± 0	0 ± 0	-
300	12.5 ± 3.7	-	-	-	-	-
360	0 ± 0	-	-	-	-	-

n=12

Ö.D. : Önemlilik Derecesi

- : P>0.05, Grup ortalamaları arası fark önemsiz,

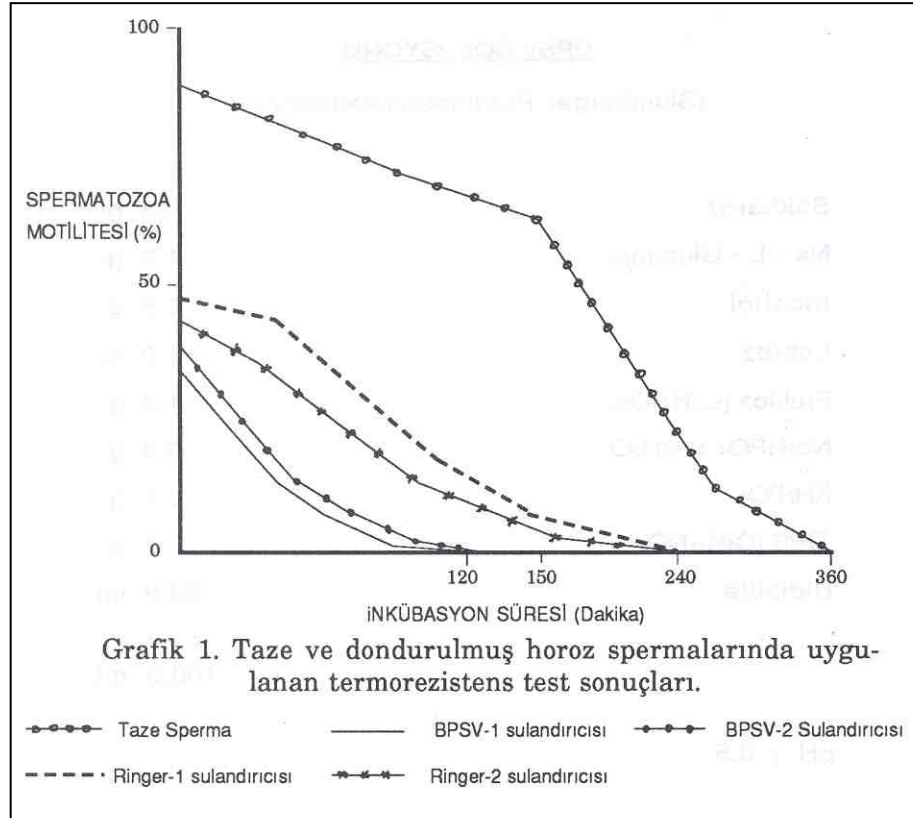
\*\* : P<0.01, Grup ortalamaları arası fark önemli,

\*\*\* : P<0.001, Grup ortalamaları arası fark önemli,

a, b;ab : P<0.05, Aynı satırda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arası fark önemli.

Çözüm sonu gözlenen morfolojik bozuklukların akrozom, baş, orta kısım ve kuyruğa ait genel ortalama değerleri ise Tablo 2' de görüleceği gibi sırasıyla BPSV-1 ile  $4.9 \pm 1.6$ ,  $5.0 \pm 0.8$ ,  $7.4 \pm 1.0$  ve  $0.4 \pm 0.2$ , BPSV-2 ile  $4.6 \pm 1.1$ ,  $9.4 \pm 2.6$ ,  $7.2 \pm 1.2$  ve  $0.4 \pm 0.1$ , Ringer-1 ile  $3.0 \pm 0.4$ ,  $2.4 \pm 0.3$ ,  $12.5 \pm 1.1$  ve  $0.3 \pm 0.1$  ve Ringer-2 ile  $3.2 \pm 0.5$ ,  $6.9 \pm 2.8$ ,  $13.4 \pm 2.0$  ve  $0.4 \pm 0.1$  bulunmuştur.

Nativ ve dondurulmuş spermalarda çözüm sonu termorezistens test bulguları Tablo 3' de verilmiştir. Nativ spermada başlangıç spermatozoa motilitesi (% 90) termorezistens test uygulaması ile 6. saatte sıfırlanmıştır. Çözüm sonu ise başlangıç motilitesi ortalama değerler üzerinden PBSV-1 ve 2 ile  $36.7 \pm 2.6$  ve  $41.7 \pm 2.1$  olan ejakülatlarda spermatozoa motilitesi sıfırlaması 2. ve 2.5. saatlerde gözlenirken, Ringer-1 ve 2 ile çözüm sonu başlangıç motilitesi  $46.7 \pm 1.4$  ve  $44.2 \pm 1.9$  olan ejakülatlar motilitelerini 4. saatte kaybetmişlerdir (Grafik 1).



**RİNGER SOLUSYONU**

NaCl	9.5 g.
KCl	0.2 g.
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0.3 g.
NaHCO <sub>3</sub>	0.1 g.
Glukoz (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> H <sub>2</sub> O)	1.0 g.
Bidistile	988.9 ml
	1.000.0 ml

pH : 6.5.

**BPSV SOLUSYONU**

(Blumberger Puterspermaverdüner)

Sakkaroz	4.5 g.
Na -L -Glutamat	1.0 g.
İnositol	0.5 g.
Laktoz	1.0 g.
Fruktoz (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	1.0 g.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3H <sub>2</sub> O	0.8 g.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1 g.
TRİS (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	0.2 g.
Bidistile	90.9 ml
	100.0 ml

pH : 8.5

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu araştırmada saptanan başlıca spermatolojik özelliklere ilişkin değerler büyük ölçüde fizyolojik sınırlar içinde kalmıştır. Ortalama spermatolojik değerlerde gözlenen farklılıklar araştırmacıların değişik ırk ve genetik yapılarıdaki horozlarda (6, 20) çalışmalarından kaynaklanabildiği gibi, farklı sperma alma ve değerlendirme tekniklerinden de (2) ileri gelebilir.

Dondurma ve çözme işlemleri sırasında ani ısı değişiklikleri yanında, sulandırıcının bileşimi ve soğuk şokuna karşı spermatozoonları koruması amacıyla sulandırıcıya katılan kryoprotektan oranlarından etkilenebilen spermatozoa motilitesi, spermanın dondurulabilirliğinin değerlendirilmesinde en önemli kriterlerden biridir. Nitekim, çalışmada her iki sperma sulandırıcısının çözüm sonu spermatozoa motilitesi üzerine etkileri bakımından saptanan farklılıklar önemli ( $P < 0.001$ ) bulunmuştur.

Kanatlı spermatozoasında orta kısım bozuklukları tipiktir ve kıvrık boyun olarak ortaya çıkar (1, 4). Bununla beraber, kanatlılarda spermatozoa morfolojisi üzerinde çalışan bir çok araştırmacı (13, 23) fertilitiyi etkilemesi yönüyle plazmalemma-daki (plazma membranı) bozuklukların birinci derecede önem taşıdığını bildirmişlerdir. Sulandırma, dondurma ve çözme işlemlerine karşı çok duyarlı olan kanatlı spermatozoasının değişik bölgelerine, sulandırıcı ve kullanılan kryoprotektanların farklı derecelerde koruyucu etki gösterdiği düşünülmektedir (6, 11). Sunulan çalışmada Ringer-1 ve 2 ile sulandırılan spermalarda orta kısım bozukluklarının ( $\% 12.5 \pm 1.1$  ve  $\% 13.4 \pm 2.0$ ) BPSV-1 ve 2' nin kullanıldığı ejakülatlarda ( $\% 7.4 \pm 1.0$  ve  $\% 7.2 \pm 1.2$ ) kinden daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

Benzer şekilde, glyserol oranı yüksek olan sulandırıcılarla sulandırılan spermalarda (BPSV-2 ve Ringer-2 ile  $\% 9.4 \pm 2.6$  ve  $\% 6.9 \pm 2.8$ ) başa bağlı bozukluklar diğerlerine göre (BPSV-1 ve Ringer-1 ile  $\% 5.0 \pm 0.8$  ve  $\% 2.4 \pm 0.3$ ) yüksek bulunmuştur.

Toplam anormal spermatozoa oranı genel olarak fertilitiyi etkileyecek sınırları (% 20) geçmezken, glyserolün yüksek oranlarda (% 8) katıldığı solusyonlarla sulandırılan ejakülatlarda daha yüksek belirlenmiştir. Ancak dondurulmuş spermalarda sulandırıcıların çözüm sonu anormal spermatozoa oranı üzerine etkileri yönüyle gözlenen farklılıklar önemsiz ( $P>0.05$ ) olurken, nativ spermaya göre önemli ölçüde ( $P<0.05$ ) farklı bulunmuştur.

Sulandırılmış ya da dondurulmuş horoz spermasının invitro yaşam süresi ve dolayısıyla fertilizasyon yeteneği kullanılan sulandırıcı ve sulandırma oranıyla yakından ilgilidir. Düşük sulandırma oranlarında uygulanan termorezistens test sonuçları, spermatozoa motilitesinin daha uzun süre korunduğunu göstermiştir. Benzer şekilde araştırmamızda nativ ve 1:2 oranında sulandırılarak dondurulmuş spermaların 40 °C' de inkübasyonu (termorezistens test) nativ spermada spermatozoa motilitesi 6. saatte sıfırlanırken, dondurulmuş spermalarda Ringer-1 ve Ringer-2 sulandırıcılarının diğerlerine üstün olduğu gözlenmiş ve sulandırıcılar arasındaki farklılıklar ilk 2.5 saatte önemli ( $P<0.01<0.001$ ) bulunmuştur (Tablo 3). Dondurulmuş spermalarda çözüm sonu başlangıç motilitelerinin düşük olması spermatozoonların canlılığını kısa sürede kaybetmesine neden olurken, her iki sulandırıcıda bulunan farklı kryoprotektan oranları sonuçları etkilememiştir.

Ayrıca sunulan çalışmada sulandırıcı pH' sı spermatozoa motilitesi ve spermatozoanın yaşam süresini olumsuz etkilemiştir. Çözüm sonu spermatozoa motilitesi BPSV ile dondurulan ejakülatlarda daha düşük bulunması yanında, pH' sı yüksek olan PBSV (8.5) sulandırıcısı ile dondurulan ejakülatlara uygulanan termorezistens test sonucu spermatozoa motilitesi sıfırlaması, pH' sı normal sınırlar içerisinde olan Ringer'e (6.5) göre daha önce gerçekleşmiştir.

Sonuç olarak, spermaların dondurulmasında kullanılan iki değişik sulandırıcıdan Ringer'in çözüm sonrası spermatolojik özellikler üzerine (spermatozoa motilitesi, anormal spermato-

zoa oranı ve spermatozoa canlılığı) BPSV sulandırıcısından daha olumlu etki yaptığı invitro çalışmalarla ortaya konulmuştur. Bunun yanında, kullanılan sulandırıcının niteliği kadar kryoprotektan oranlarında spermanın dondurulabilirliğinde önem taşıdığı gösterilmiştir.

### LİTERATÜR LİSTESİ

1. ANIS'KO, E. N., DRUKAGOV, M. A. (1974): Survival of cock spermatozoa in different semen diluent. Sbornik Nauchnykh Trudov, Belorusskaya Sel'skokhozyarstvenneya Akademiya. 130; 49 -56.
2. ASHIZAWA, K., SANO, R.(1990):Effects of temperature on the immobilization and the initiation of motility of spermatozoa in the male reproductive tract of the domestic fowl, Comparative Biochemistry and Physiology, 96: 297-301.
3. AUSTIN, A. J. S., NATARAJAN, N. (1989): A study on the physical characters of semen of New Hampshire and Leghorn breed. Indian Journal of Poultry Science, 24: 233 -239.
4. BAKST, M. R., SEXTON, T. J.(1979): Fertilizing capacity and ultrastructure of fowl and turkey spermatzoa before and after freezing. Journal of Reproduction and Fertility, 55: 1 -7.
5. BALASHOV, N G., KUZNECHIKOV. L A., OZHIN. F V., SMIRNOV, V.T (1975): Experimental media for the dilution and storage of cock semen. Trudy Gosudarstvennoga Nauchno-Kontrol'noge Institute Veterinarynykh Preparatov. 20: 321 -326.
6. BANARJEE, A.K., KATPATAL, B.G. (1975): Semen studies on White Leghorn. Rhode Island Red. cross-bred and deshi breeds.III. Initial motility, differential count and sperm abnormalities. Indian Journal of Heredity.4:32-35.
7. BOGDONOFF, P.D. Jr., SHAFFNER, C.S. (1954): The effect of pH on invitro survival, metabolic activity and fertilizing capacity of chicken semen. Poultry Science, 33: 665 -669.
8. CLARKE, R. N., BAKST, M. R., OTTINGER, M. M. (1984): Morphological changes in chicken and turkey spermatozoa incubated under various conditions. Poultry Science, 63: 801 -805.
9. CLARKE, R. N., SEXTON, T. J., OTTINGER, M. A. (1982): Effects of holding temperature and storage time on respiratory rate, motility and fertility of chicken and turkey semen, Poultry Science, 61: 1912 -1917.

10. DUPLAIX, M., SEXTON, T. J. (1984): Effects of type of freeze straw and thaw temperature on the fertilizing capacity of frozen chicken semen. *Poultry Science*, 63: 775 -780.
11. FOKINA, Z. (1975): Rearing breeding cocks. *Pitisevodstvo*, 3: 23
12. FOMİN, A., SCHERBATOV, V.(1989): Semen collected from cocks using an artificial vagina. *Pitisevodstvo*, 7: 26 -28.
13. HARRIS, G. C., THURSTON, R. J., CUNDALL, J. (1973): Changes in the ultrastructure of the fowl spermatozoa due to rapid freeze-thaw. *Journal of Reproduction and Fertility* 34 pp. 389 -394.
14. KARIMOV, K., PARONYAN, I., IVANOV, B., POPOV, I., TUR, B. (1983): Establishing a semen bank for domestic fowls-a prospective method of preserving the gene pool. *Pitisevodstvo*, 3: 17.
15. KONO, K., HIURA, Y. (1983): Semen collection by rectal electro - ejaculation in the domestic fowl. *Japanase Poultry Science*, 20: 267 -270.
16. LAKE, P. E., STEWART, J. M. (1978): *Artificial Insemination in Poultry*, ARC, Poultry Research Centre, Kings Buildings, West Meins Road, Edinburgh, Scotland.
17. MAEDA, T., TRENDA, T. (1982): Morphological observations on fowl spermatozoa stored in frozen or liquid state. *Japanase Poultry Sci.*, 19: 315-321
18. MASUDA, H., SOEJIMA, A., WAIDE, Y.(1974): Study on deep freezing preservation of the chicken spermatozoa. *Bull. Natl. Inst. Anim. Ind.* 28: 33 -40.
19. PRADHAN, P. K., TOMAR, N. S. (1987): Preservation of liquid poultry semen. *Indian Veterinary Journal*. 64: 403 -407.
20. SAEKI, Y. (1962): Crooked-necked spermatozoa in relation to low fertility in the artificial insemination of fowl. *Poultry Science*, 39 pp. 1354 -1360
21. SCHRAMM, G. P., LÖHLE, K. (1976): Effect of the cryoprotective agents glycerol, DMSO and ethylene glycol and of the glycerol equilibration of cock spermatozoa before and after deep freezing. *Archiv für Tierzuchtliche*, 19: 295 -305.
22. SEXTON, T. J., GIESEN, A. F. (1983): Beltsville poultry semen extender. 8. Factors affecting turkey semen held six hours at 15 °C. *Poultry Science*, 62: 1063 -1068.
23. TERADA, T., TSUTSUMI, Y. (1989): The role of glycerol and dimethylsulfoxide on the freezing of fowl spermatozoa. *Cryo-Letters*, 10: 393 -400.

