



Balık Spermalarının Dondurulması

Dr. İlker YAVAŞ

Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim dalı

Özet

Hayvancılık, insanlığın gıda maddeleri talebini karşılayan, bu yüzden de yaşamını doğrudan ilgilendiren ve vazgeçemeyeceği ekonomik bir faaliyettir. Bu nedenle, gelişmişlik düzeyi ne olursa olsun, bütün insan topluluklarında hayvansal üretim sektörü önemini korumuştur. Hayvansal üretim faaliyetleri içerisinde değerlendirilen balık yetiştiriciliği son yıllarda önemli derecede gelişme kaydetmektedir. Ancak özellikle ıslah konusunda henüz istenilen düzeye ulaşamamıştır. Bu kapsamda ele alınması gereken konulardan birisi de diğer çiftlik hayvanlarının yetiştiriciliğinde olduğu gibi, dondurulmuş spermaların kuluçkahanelerde fertilizasyon amacıyla kullanılmasıdır. Bu derlemede, ülkemizde balık yetiştiriciliği alanında yeni bir konu olan balık spermalarının dondurulması konusu üzerinde durulmuştur.

1. Giriş

FAO verilerine göre dünya yıllık su ürünleri üretimi 140 392 858 ton olup, bu üretimin %64'ü avcılık, %36'sı yetiştiricilik yoluyla elde edilmektedir (1). Ülkemizde ise 2007 yılı verilerine göre toplam 772 323 ton olan üretimin % 82'si avcılık, % 18'i yetiştiricilik yoluyla elde edilmiştir (2). Su ürünlerine olan talebinin artması ve deniz ile iç sularda avcılık yoluyla yapılan üretimin azalması sonucu kültür balıkçılığının önemi giderek bir artış göstermektedir. Balık yetiştiriciliğinde ileri ve yüksek üretim kapasitesi olan birçok ülkede balık üretiminde yeni biyoteknolojik yöntemler özellikle de sperma kriyoprezervasyonu giderek yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Sperma, yumurta ve embriyonun dondurularak saklanması

sı ve kullanılması birçok canlı türünde uygulanmaktadır. Akuakültürde bu biyoteknolojinin kullanımı özellikle son yıllarda giderek artmaktadır. Balık spermasının dondurulması ilk başarılı çalışma ise Holtz (1993) (3) tarafından yapılmıştır. Araştırmacı dondurulmuş ve çözündürülmüş sperma ile Ringa balığı yumurtalarını dölemiştir. Günümüzde alabalık, sazan gibi tatlı su balıklarının yanı sıra çok sayıda deniz balığı türünün de sperması başarılı bir şekilde dondurulabilmektedir (4).

Spermanın dondurulmuş olarak kullanılmasının balık kültüründe birçok avantajı bulunmaktadır. Enfeksiyonların yayılma riskini azaltılması, hibrid (melez) yavru elde edilmesi ve istenen karakterlerde seleksiyon yaparak bir örneğin oluşturulması gibi avantajlara sahiptir (5). Balıklarda dondurulmuş sperma ile fertilizasyon işlemi ülkemizde henüz geniş bir şekilde kullanılmamaktadır.

2. Spermanın Alınması ve Değerlendirilmesi

Balıklarda spermanın sağılarak alınması diğer sperma elde etme yöntemlerine göre daha iyi sonuç vermektedir. Bu metotla, hem spermatozoanın aktive edildikten sonraki motilite oranının yüksek olması, hem de motilitenin korunması açısından daha başarılı sonuçlar elde edilmektedir (4).

Üreme sezonu başında, sonuna göre daha uzun süre spermatozoon aktivitesi korunmaktadır. İntratestiküler maturasyon, idrar kontaminasyonu ve spermatozoon yaşlanması sperma kalitesini etkileyen önemli faktörlerdendir. Testis içi gamet yaşlanması birçok balık türünde gözlenmekte ve özellikle üreme sezonunun sonunda sperma kalitesini olumsuz etkilemektedir. Dondurulacak spermada intratestiküler yaşlanma, üre karışması ve spermatazoaların yaşlanması hususlarına dikkat edilmesi gerekmektedir (4).

Balıklarda genital kanal ile üriner kanalın yakınlığından dolayı sperma, sıklıkla idrar ile kontamine olmaktadır. Kalkan balığında yapılan bir çalışmada üre kontaminasyonunun %15.3 olduğu gözlenmiştir. Spermaya idrar karışması spermatozoanın motilitesini, hızını, döleme kapasitesini ve donma kabiliyetini olumsuz etkilemektedir. Spermanın idrar veya mukusla karışması ozmolaritenin ve pH' sının düşmesine neden olmaktadır. Üre kontaminasyonunu önlemek için katater uygulaması yapılabilmektedir (6,7).

3. Spermanın Dondurularak Saklanması

Balık spermasının dondurularak saklanmasında başlıca iki teknik kullanılmaktadır. Bu tekniklerden birincisi, spermanın kuru buz üzerinde dondurulmasıdır. İkinci teknik ise değişik hacimlerdeki payetlere çekilen spermanın sıvı azot buharında dondurulmasıdır. Bu tekniklerden gerek laboratuvar ve gerekse işletme koşullarında en yaygın olarak kullanılanı spermanın sıvı azot buha-

rında dondurulmasıdır (8).

Sperm hücrelerinin dondurularak saklanmasında standart bir işlem haline gelen kriyoprezervasyon, spermatozoanın yaşayabilmesi için gerekli olan ideal koşulların sağlanmasını gerektirmektedir (8). Kriyoprezervasyonun ilk aşaması, dondurma işleminden önce kriyoprotektanların hücre içerisine penetre olmalarını sağlamak amacıyla kriyoprotektan içeren sulandırıcılar ile sulandırılmasıdır. Bu amaçla sulandırıcı kompozisyonunun geliştirilmesinde iki yaklaşım bulunmaktadır. İlk yaklaşım, balığın seminal plazma kompozisyonuna benzer kompleks sulandırıcı formülasyonlarının kullanılması, ikinci yaklaşım ise basit sulandırıcı formülasyonlarının kullanılmasıdır (9).

Birçok tatlı su ve deniz balığı spermasının dondurulmasında Mounib sulandırıcısı (10,01 mg/ml $KHCO_3$, 1,99 mg/ml glutatyon, 42,78 mg/ml sukroz, 10 mg/ml BSA, %10 DMSO, pH 7.8, osmolarite 310) (10) başarıyla uygulanmaktadır. Pratik olarak 300 mM glukoz ve %10 yumurta sarısı içeren sulandırıcı özellikle gökkuşuğu alabalığı spermasının dondurulmasında başarılı olarak kullanılmaktadır (11). Genellikle sulandırma oranı 1:1 ve 1:20 arasında değişmektedir. Bir çok çalışmada ise sulandırma oranı 1:3 olarak uygulanmaktadır.



Sulandırma ve dondurma sonrası spermatozoanın maruz kaldığı değişikliklerin incelendiği bir çalışmada spermatozoanın özellikle ozmotik basınç değişimlerine ve donmaya karşı oldukça duyarlı olduğu bildirilmektedir (12). Dondurma ve çözündürme sırasında oluşan hücre hasarı özellikle plazma membranı, buz kristallerinin oluşumundan olumsuz etkilenmektedir. Bu etkiyi en aza indirmek için kriyoprotektanlar kullanılmaktadır. Genellikle türe özel kriyoprotektan içeren sulandırıcı formülasyonları hazırlanmaktadır (13). Değişik kriyoprotektanların etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda, ör-

neğin etilen glikol, propilen glikol, gliserol, DMSO, DMA ve metanol araştırılmış ve genellikle DMSO'nun çözüm sonu motilite üzerinde en iyi sonucu verdiği görülmüştür (14, 4). Fabbrocini ve ark. (2000) (13) yine kriyoprotektanların etkililiğini araştırdıkları bir çalışmada, etilen glikol, propilen glikol, gliserol, DMSO ve metanol gibi kriyoprotektanlar arasında en iyi motiliteyi %5 DMSO (Me₂SO)'de gözlediklerini bildirmişlerdir. Yine Akçay ve ark. (2004) (14) kullandıkları sulandırıcılarda %15'er oranda DMSO, DMA ve gliserol ilave ettikleri çalışmalarında en iyi motiliteyi %55 oranında aynalı sazan (*Cyprinus carpio*)'da tespit etmişlerdir.

Kriyoprotektanların etkinliğinin artırılması için, dondurmadan sonra oluşan hasarın plazma membranı üzerindeki etkisinin değerlendirilmesinde hipoosmotik ve hiperosmotik solüsyonlar kullanılmaktadır (15). Düşük konsantrasyondaki DMSO) motiliteyi olumsuz etkilese de, diğer kriyoprotektanlara göre daha az toksik ve daha uzun süreli motilite oranları sağlamaktadır. Ancak motilite oranında en az düşüşün gözleendiği kriyoprotektanın ise etilen glikol olduğu belirtilmektedir (13).

Dondurulmuş spermanın taze sperma ile benzer fertilizasyon ve yakın motilite oranına sahip olduğu tespit edilmiştir (16). Dondurulmuş spermada motilite süresinin daha kısa olduğu, metabolizmasının farklılaştığı ve fertilizasyonda döllenmemiş yumurtaların kuluçkadan çıkış oranlarının düşük olduğu belirlenmiştir (10,17). Dondurulmuş spermada hem viabilite (canlılık) oranı düşmekte hemde spermatozoaların fonksiyonları azalmaktadır. Bunun nedenleri arasında, soğuk şokuna uğramaları, osmotik strese maruz kalmaları ve hücre içi kristalizasyonun meydana gelmesi gösterilmektedir (7,5,13).



Dondurulmak üzere kriyoprotektan içeren sulandırıcılar ile muamele edilen sperma, payetlere (0,25-0,5 ml), dondurma tüplerine (1,5 ml) veya makro tüplere (5 ml) çekilebilmektedir. Kullanılan hacme göre dondurma süresi ve sıcaklığı değişmektedir. Payetler sıvı nitrojen buharında (-120 °C), nitrojen seviyesinin 6,5 cm üzerinde 15 dakikada dondurulmaktadır. Dondurulan sperma daha sonra sıvı azota aktarılmaktadır. Balık spermatozoaları küçük yapısından dolayı sulandırma sonrasında penetrasyon hızlıca meydana geldiğinden ekilibrasyon (alışım) safhasına gerek bulunmamaktadır. Nitekim çipura üzerinde yapılan bir çalışmada, DMSO katılan sulandırıcı ile muamele edilen spermanın 2 dakikadan fazla ekilibrasyona bırakıldığında, dölleme oranının daha düşük olduğu gözlenmiştir (10,4).

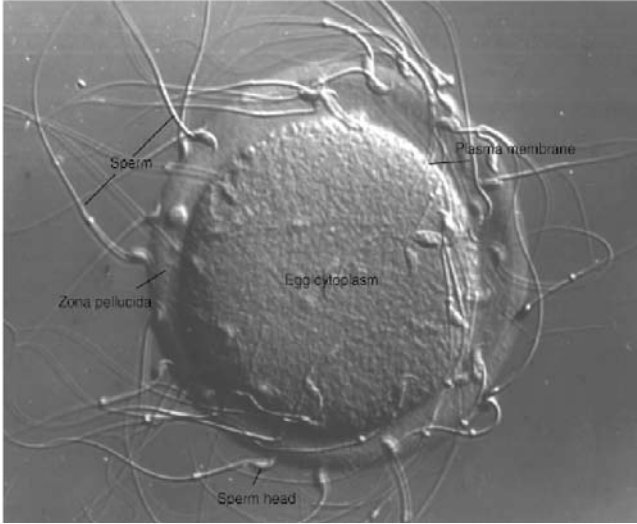
Yapılan araştırmalarda, deniz balıklarının spermalarının dondurmaya karşı daha dayanıklı olduğu, bunun da nedeninin spermatozoon membranındaki kolesterol/ fosfolipit oranının yüksek olması düşünülmektedir. Yine soğuğa karşı dirençte deniz balıklarının spermatozoon membranında bulunan fosfatil kolinin etkili olabileceği vurgulanmaktadır. Levrekler üzerinde yapılan bir çalışmada, üreme sezonu sonunda alınan spermanın soğuğa karşı direncinin düşük olması, hücre içi ATP miktarının düşük olması ile ilişkilendirilmiştir (4).

Cabrita ve arkadaşları (2005b) (15) ise, sperm dondurmanın DNA üzerine olan etkisini inceledikleri çalışmada, 5 ml hacimdeki makro tüplerde 1:6-1:20 oranında sulandırılarak yapılmıştır. Çalışmada çözdürmek için makro tüpler 60 °C'de 30sn bekletilmiştir. Çıkan sonuç ise; 1:6 oranında sulandırılan spermanın DNA hasarının en az olduğu, yüksek oranda sulandırılanların ise daha fazla olduğu şeklindedir.

4. Spermanın Çözdürülmesi ve Fertilizasyonda Kullanımı

Spermayı çözdürme işlemi, dondurulmuş payet veya pellet'lerin 5-40 °C sıcaklık aralığındaki su banyosuna farklı sürelerde daldırılması suretiyle uygulanan bir işlemdir. Kriyoprezervasyon işleminden sonra spermatozoaların büyük çoğunluğu hasarlı membran ve mitokondriye sahiptir (18). Bu nedenle çözdürülmüş spermanın hemen kullanılması döllenme oranını artırmaktadır.

Spermanın aktive edilmesinden 10 saniye sonra taze sperma ile dondurulmuş spermanın motilitelerinin birbirine yakın olduğu ancak motilite süresinin taze spermada 50 saniye iken dondurulmuş spermada 40 saniye olduğu belirtilmektedir. Yine taze ve dondurulmuş spermanın yoğunluklarının aynı olmasına rağmen dölleme oranlarının farklı olduğu, aynı yoğunluktaki taze spermanın daha fazla yumurta dölleyebildiği belirtilmektedir (10).



Yapılan bir çalışmada, spermatozoa yoğunluğu ortalamaya 50×10^9 spz / ml olan levrek spermasının yaklaşık olarak 100.000 adet yumurtayı dölleyebildiği, aynı sayıdaki yumurtaları dölleyebilmek için 400 µl taze spermadan elde edilmiş 1,2 ml dondurulmuş sperma kullanılması gerektiği belirtilmektedir. (10).

Cabrera ve arkadaşları (2005a) (7) çipuralar üzerine yaptığı çalışmada natif sperma (%77) ve dondurulmuş sperma (%75) arasında fertilité farkı olmadığını ortaya koymuştur. Bozkurt ve ark. (2005) (19), gökkuşuğu alabalık (*Oncorhynchus mykiss*)'lerinde payet ve pellet yöntemlerinin fertilizasyon üzerine etkilerini inceledikleri çalışmalarında, fertilizasyon oranları payet yönteminde %52.3, pellet yönteminde ise %48.4 olarak belirlemiştir. Tekin ve ark. (2007) (20), sulandırıcı-kriyoprotektan interaksyonunun çözüm sonu fertilizasyon üzerine etkilerini inceledikleri çalışmalarında, en yüksek fertilizasyon oranını glukoz kökenli sulandırıcıya %15 DMSO ve %1 oranında gliserol ilave edilen grupta %49.3 olarak belirlemişlerdir.

Dondurulup çözdürülmüş spermatozoa progresif motilitesini yani ileri doğru kuvvetli hareketini 4-6 dk sürdürebilmektedir (13,5). Ancak dölleme oranı, progresif motil spermatozoasayısı ile değil, motile özellik gösteren spermatozoa sayısı ile orantılıdır (4).

5. Sonuç

Kültür balıkçılığı Türkiye ve Dünya'da yükselen bir değer haline almıştır. Özellikle gelişmekte olan ülkelerin en önemli geçim kaynaklarından olan Akuakültür sektörü hızla gelişmekte ve büyümektedir. Bu büyüme ve üretim artışının devamı için bir çok bilimsel çalışma yapılmış olmasına karşın, sperm kriyoprezervasyonu biyoteknolojisinin Türkiye'de oldukça yeni bir konu olduğu bilinen bir gerçektir. Bu konuda yapılacak çalışmaların artırılmasıyla ülke ekonomisine katkı sağlanabileceği gibi akuakültür sektöründe de önemli gelişmeler sağlanabilecektir.

Kaynaklar

1. Anonymous, (2007). FAO Aquaculture Production Statistics. Rome.
2. Anonim, (2007). Türkiye İstatistik Kurumu, Su Ürünleri İstatistikleri. Ankara.
3. Holtz, W. (1993). Cryopreservation of rainbow trout sperm: Practical recommendations. *Aquaculture*, 110: 97-100.
4. Suquet, M., Dreanno, C. Fauvel, C., Cosson, J., Billard R., (2000). Cryopreservation of sperm in marine fish, *Aquac. Res.* 31: 231-243.
5. Chambeyron, F. and Zohar, Y. (1990). A diluent for sperm cryopreservation of gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture* 90, 345-352.
6. Fauvel C, Savoye O, Dreanno C, Cosson J, Suquet M, (1999). Characteristics of sperm of captive seabass in relation to its fertilization potential. *J Fish Biol*; 54: 356-369.
7. Cabrera, E., Robles V., Cuñado, S. Wallace, J.C. Sarasquete, C. Herráez M.P. (2005a). Evaluation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, sperm quality after cryopreservation in 5ml macrotubes. *Cryobiology* 50 : 273-284.
8. Bozkurt, Y. ve S. Seçer (2005). Balık Spermasının Muhafazası. *Ziraat Mühendisliği Dergisi*. 345: 38-41.
9. Anonymous, (2009). Lazaron Biotechnologies. What is cryopreservation? <http://www.lazaron.com/lazaroniic.html>. Erişim Tarihi: 25.12.2009.
10. Fauvel C, Suquet M, Dreanno C, Zonno V, Menu B, (1998). Cryopreservation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa in experimental and production conditions. *Aquat Living Res*; 11:387-394.
11. Tekin N., Secer S., Akçay E. and Y. Bozkurt (2003). Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen. *Israeli J. Aquacult.-Bamidgheh*, 55: 208-212.
12. Billard, R. (1983). Effects of coelomic and seminal fluids and various saline diluents on the fertilizing ability of spermatozoa in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 68: 77-84.
13. Fabbrocini, A., Lavadera, L., Rispoli, S., Sansone, G., (2000). Cryopreservation of sea bream (*Sparus aurata*) spermatozoa, *Cryobiology*, 40:46-53.
14. Akçay, E., Y. Bozkurt, S. Seçer ve N. Tekin (2004). Cryopreservation of mirror carp semen. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 28 (5): 837-843.
15. Cabrera, E., Robles V., Cuñado, S. Wallace, J.C. Sarasquete, C. Herráez M.P. (2005b). Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology* 50 : 144-153.
16. Suquet M, Omnes M.H, Normant Y, Fauvel C. (1992). Assessment of sperm concentration and motility in turbot (*Scophthalmus-maximus*). *Aquaculture*, 101 (1-2): 177-185.
17. Zilli L, Schiavone R, Zonno V, Rossano R, Storelli C, Vilella S, (2005). Effect of cryopreservation on sea bass sperm proteins. *Biology of Reproduction* 72, 1262-1267.
18. Labbe, C., Crowe, L.M., Crowe, J.H. (1997). Stability of lipid component of trout sperm plasma membrane during freezing-thawing. *Cryobiology*, 34: 176-182.
19. Bozkurt, Y., E. Akçay, N. Tekin ve S. Seçer (2005). Effect of freezing techniques, extenders and cryoprotectants on the fertilization rate of frozen rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgheh*, 57 (2): 125-130.
20. Tekin, N., S. Seçer, E. Akçay, Y. Bozkurt ve S. Kayam (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.