

Gökkuşığı Alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) Ovaryum Sıvısının Sperm Motilite Parametreleri ve Döllenme Üzerindeki Etkisi

Güneş YAMANER^{ID}

İstanbul Üniversitesi Su Bilimleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği ve Hastalıkları Bölümü, İstanbul, Türkiye

* Sorumlu Yazar: gyamaner@istanbul.edu.tr

Araştırma Makalesi

Geliş 16 Aralık 2019; Kabul 27 Nisan 2020; Basım 01 Haziran 2020.

Alıntılama: Yamaner, G. (2020). Gökkuşığı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) ovaryum sıvısının sperm motilite parametreleri ve döllenme üzerindeki etkisi. *Acta Aquatica Turcica*, 16(2), 266-274. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.660155>

Özet

Bu çalışmada, Gökkuşığı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) sperm aktivasyonunda aktivasyon solüsyonu olarak kuluçkahane suyuna ilaveten ovaryum sıvısının kullanılmasının motilite (%) ve eğrisel hız (VCl, µm/saniye) üzerindeki etkisi ve ovaryum sıvısı uzaklaştırılmış yumurta örneklerinde döllenme yüzdesi araştırılmıştır. Çalışmada üreme döneminde 3⁺ yaş grubuna ait üç adet dişi ve altı adet erkek balık kullanılmıştır. Her bir dişe bireye ait yumurta örneklerinde, analizi yapılan sperm örnekleri ile hem ovaryum sıvısı muhafaza edilerek hem de uzaklaştırılarak dölleme gerçekleştirilmiştir. Sperm örneklerine ait motilite (%) değerlerinde kuluçka suyu kullanılarak aktive edilmiş örnekler ile ovaryum sıvısı kullanılarak elde edilmiş örnekler arasındaki sonuçlar istatistiksel olarak farklı bulunmuşken (p<0.05); motiliteye ait kinematik parametreler arasındaki fark önemsiz bulunmuştur (p>0.05). Dölleme grupları arasında ise döllenme yüzdesinde herhangi bir fark bulunmamıştır.

Anahtar Kelimeler: Ovaryum sıvısı, Motilite parametreleri, Gökkuşığı Alabalığı, Döllenme Yüzdesi

The Effect of Ovarian Fluid on Motility Characteristics and Fertilization Ratio of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Sperm

Abstract

In this study, the effect of ovarian fluid and hatchery water as activation solutions for sperm activation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on motility (%) curvilinear velocity (VCl, µm / sec) and fertilization rate were analyzed. Three female and six male fish belonging to the 3⁺ age group were used in the study. Each females' egg was fertilized with analyzed sperm samples both either removing ovarian fluid or not. Between results of the motility (%) values of sperm samples that activated with hatchery water and ovarian fluid were found statistically different (p <0.05); the difference between the kinematic parameters of motility was insignificant (p>0.05) among group. There was no difference between the fertilization rate in the groups.

Keywords: Ovarian fluid, Motility Characteristics, Rainbow trout, fertilization rate

GİRİŞ

Spermatozoa motilitesi ve spermatozoaya ait hız parametreleri, erkek bireylerin sahip olduğu üreme başarısının belirlenmesinde ve bu bireylerin gamet kalitesinin ortaya konmasında kullanılan iki önemli parametredir. Yüksek motiliteye ve hıza sahip olan spermatozoa'nın mikrofil deliğine daha kısa zamanda ulaşması, bu sperm hücrelerinin, "Dölleme Yeteneği Yüksek" başka bir deyişle "Kaliteli Sperm" olarak sınıflandırılmasını sağlamaktadır. Sperm motilitesinin analizi dış döllenme özelliğine sahip, gametlerini su ya da benzeri solüsyon içerisine bırakan türlerde özellikle önem arz etmektedir (Kime vd., 2001; Cosson, 2004) ve spermatozoonların bu su içerisinde mikrofil açıklığına doğru hareketini belirlemede kullanılan bu analiz, döllenme sürecinde kritiktir (Cosson vd., 2008; 2010).

Birçok Teleost balık türünde olduğu gibi Salmonid balık türlerinde de spermatozoa testiste ve seminal plazma içerisinde hareketsiz bir haldedir. Salmonid balıklarda spermatozoa'nın immotile halde kalmasının ilk nedeni seminal plazmanın ihtiva ettiği Potasyum (K⁺) iyonudur. Su ya da yapay olarak hazırlanmış aktivasyon solüsyonunun içerisine bırakılan spermatozoa, seminal plazma'nın K⁺ iyonundaki değişim ile motil hale geçerler başka bir deyişle hareketlilik kazanırlar. Salmonid balıklarda K⁺ iyonunun spermatozoa motilitesini inhibe edici bu özelliğine ilaveten, dişi balıklarda

ovaryum sıvısının ihtiva ettiği Sodyum (Na^+) ve Kalsiyum gibi (Ca^{2+}) katyonlarının konsantrasyonlarında sperm motilitesini etkiyebilemektedir (Stoss, 1983; Billard ve Cosson, 1992).

Salmonid balıklarda ovaryum sıvısı toplam yumurta hacminin %10-30 oranında bir hacime sahiptir ve yumurtaların bırakılması ile su ortamına bırakılmaktadır. Ovaryum sıvısı kan plazmasının filtrasyonu ve ovaryuma ait epitel dokunun salgı aktivitesi sonucu oluşmaktadır ve çeşitli yapı maddelerini, metabolitleri ve hormonları içermektedir (Hirano vd., 1978; Lahnsteiner vd., 1995; Zadmajid vd., 2019). Ovaryum sıvısının sperm motilitesini başlatmak ve arttırmak başta olmak üzere, dölleme yüzdesini arttırmak, feromon özellikler, cinsiyet steroidlerini arttırmak ve yumurtaları korumak gibi özellikleri vardır (Lahnsteiner, 2002; Johnson vd., 2004). Bununla birlikte ovaryum sıvısının spermatozoa yaşam süresini arttırdığı (Lahnsteiner vd., 1995; Dietrich vd., 2008) ve spermatozoa kinematik parametrelerinden hız, yön ve hareket şekli gibi parametreleri etkilediği de bilinmektedir (Lahnsteiner vd., 1995). Yapılan çalışmalar ile ovaryum sıvısının dölleme ortamında bulunmasının spermatozoonların yaşam süresini arttırdığı Tatlı su balıklarından Dere iskorpit balığı (*Cottus gobio*) (Lahnsteiner vd., 1997) ve Kahverengi alabalık (*Salmo trutta f.fario*) gibi türlerde ortaya konmuştur (Lahnsteiner, 2002). *Salvelinus alpinus* (Turner ve Montgomeria, 2002; Dietrich vd., 2008); Atlantik morinası (*Gadus morhua*) (Litvak ve Trippel, 1998) gibi türlerde spermatozoa aktivasyonu için ovaryum sıvısının kullanılmasının; tatlı su, deniz suyu ya da yapay aktivasyon solüsyonlarının kullanıldığı durumlar ile karşılaştırılmasında, spermatozoa hız parametrelerinde ve motilite süresinde artış ile sonuçlandığı bulunmuştur. Bu çalışmaların aksine *Spinachia spinachia* (Elofsson vd., 2003) ve Kızıl Somon Balığı (*Oncorhynchus nerka*) (Macfarlane, 2002) gibi türlerde ovaryum sıvısının sperm yaşam süresi üzerinde arttırıcı bir etkisinin olmadığını ifade eden çalışmalarda mevcuttur. Ovaryum sıvısının kimyasal ve fiziksel yapısı balık türleri arasında olduğu gibi tür içerisinde de farklılık göstermektedir ve dölleme esnasında her bir dişi balık üreme dönemi sürecinde kendine özgü bir dölleme ortamı yaratır (Lahnsteiner, 2002). Ovaryum sıvısının, spermin ortama bırakılmasından sonra, yumurta ve spermatozoa arasındaki etkileşimi başlattığı, dispersiyonu düşürdüğü ve dölleme için gerekli olan mikro-çevre ortamını sağlayan iyon konsantrasyonunu koruduğu bilinmektedir (Lahnsteiner, 2002; Rosengrave vd., 2009). Tüm bu aşamalarda, ovaryum sıvısının tür içerisinde her bir dişide farklı kimyasal ve fiziksel özellikte olması, spermatozoa üzerindeki farklı etkilerini de açıklamaktadır. Aynı zamanda bu kimyasal ve fiziksel özellikler, spermatozoa'da motilite başlar başlamaz, ortamdaki yumurta ve ovaryum sıvısının varlığı ile sperm hücrelerinin yumurtaya doğru hareket etmeye başlamasını sağlamaktadır ve bu "Kemotaksi" olarak bilinmektedir (Morisawa ve Yoshida, 2005). Litvak (Litvak ve Trippel, 1998) ve Rakitin (Rakitin vd., 1999a,b) yapmış olduğu çalışmada erkek bireyin dölleme başarısının farklılığını; farklı dişilere ait ovaryum sıvılarının farklı kimyasal özelliklerinden kaynaklandığı ifade etmektedir.

Dölleme esnasında kullanılan su ya da benzeri aktivasyon solüsyonları spermatozoaaktivasyonunu sağlamanın yanı sıra yumurtanın dölleme sonrasında mikrofil açıklığının kapanmasını da sağlamaktadır (Lahnsteiner, 2002). Döllemeyi ve gamet fizyolojisini büyük oranda etkileyen bu solüsyon bu güne kadar birçok balık türünde çalışılmış ve günümüze kadar yapılan çalışmalar ile her bir tür için optimal aktivasyon solüsyonu ortaya konmuştur (Zadmajid vd., 2019). Bu çalışmada ise, yapay bir aktivasyon solüsyonu kullanılmamış; ovaryum sıvısı ve kuluçkahane suyu ile sperm motilite analizleri yapılarak, analizi yapılan örnekler ile dölleme çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmanın amacını Gökkuşluğu alabalığında ovaryum sıvısının motilite ve dölleme üzerindeki etkisini ortaya koymak oluşturmaktadır. Ovaryum sıvısının spermatozoa motilitesi üzerindeki etkisinin incelenmesine ilaveten; bu etkinin dölleme ile ilişkisinin ortaya konması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Çalışmada kullanılan balıklar

Çalışmada İstanbul Üniversitesi Su Bilimleri Fakültesi Sapanca İçsu Ürünleri Araştırma ve Uygulama Biriminde bulunan, birimin Rutin üretim çalışmalarında kullandığı Gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) anaç balıkları kullanılmıştır. 3⁺ yaş grubunda üç adet dişi Gökkuşluğu alabalığı ve 3⁺ yaş grubunda altı adet erkek Gökkuşluğu alabalığı üreme dönemi olan Aralık ayında sağım işlemine tabii tutulmuşlardır.

Balıkların sağım işlemi

Buldukları tanklardan Anestezi tankına alınan balıklar, bayıldıktan sonra sağım işlemi gerçekleştirilmiştir. Anestezi maddesi olarak Phenoxyethanol (385 mg/l) kullanılmıştır (Steinum ve

Candan, 2010). Abdomen bölgesi kurulan dişi balıklar kuru sağımlarına; erkek balıklar ise kuru cam beherlere sağılmıştır. Örnekler analiz çalışmasına kadar +4 °C'de strafor kutu içerisinde muhafaza edilmişlerdir.

Fekonditenin belirlenmesi

Dişi balıklardan alınan yumurtalarda her bir dişi balık için alt örnekleme yöntemi ile fekondite belirlenmiştir. Her bir dişiden alınan yumurta örneği tartılarak, tartılan gramajdaki yumurta sayısı hesaplanmıştır. Fekondite hesabında aşağıdaki formül kullanılmıştır.

Σ Fekondite (adet/ Σ kg)=Alt örnek yumurta sayısı (adet)* Σ Yumurta ağırlığı (gr)/Alt örnek ağırlık (gr) (Hunter vd., 1985).

Spermatolojik özelliklerin belirlenmesi

Her bir erkek balıktan alınan sperm örneklerinde spermatolojik özelliklerden spermatozoa motilitesi (%) ve spermatozoaya ait hareket özelliklerinden eğrisel hız (VCL, μ m/sn), Bilgisayarlı Otomatik Sperm analiz Sistemi ile ölçülmüştür. Bahsi geçen sistemde normal lam kullanılmayıp, özel bölmeli ve hacimli lam kullanıldığından, mikropipet yardımı ile alınan sperm örnekleri ependorf tüpe aktarılmış ve üzerine aktivasyon solüsyonu eklenmiştir. Sulandırma oranı olarak 1:500 (sperm: sulandırıcı) oranı kullanılmıştır. Çalışmada aktivasyon solüsyonu olarak iki farklı solüsyon kullanılmıştır. Anaç balıkların bakımının yapıldığı su kaynağı ilk aktivasyon solüsyonu olarak; dişi balıkların sağımlarında temin edilen her bir dişiye ait ovaryum sıvısı ise ikinci aktivasyon solüsyonu olarak belirlenmiştir. Aktivasyon solüsyonunun eklenmesinden hemen ardından, karışımdan alınan sulandırılmış örnek lama ait özel bölmeye konulmuştur. Analiz için hazırlanmış lam örneği sistemin parçalarından biri olan mikroskoba yerleştirilmiştir. Mikroskoba bağlı bulunan kamera sistemi ile spermatozoonların hareketinin 10.saniyesinde motilite ve motiliteye bağlı kinematik parametreler kaydedilmiştir. Her bir sperm örneği için 3 video analizi 3 tekerrürlü olarak yapılmıştır. CASA sistemi kaydedilen video görüntülerini kayıttan sonra analiz yapmaya olanak verdiği için; tüm örneklerin hareketliliğinin mikroskop altında kaydedilmesinden sonra, depolanan veriler yine sistem parçalarından birini oluşturan, motilite ve motiliteye ait kinematik hız parametrelerinin analizini otomatik olarak yapan yazılım sistemi (Hamilton) ile belirlenmiştir (Boryshpolets vd., 2013; Özgür vd., 2019).

Deneme grupları ve dölleme çalışması

Her bir dişi balıktan alınan toplam yumurta gramajı hesaplandıktan sonra, yumurtalar ile birlikte bulunan ovaryum sıvısı temiz bir süzgeç yardımı ile uzaklaştırılarak temiz başka bir kaba aktarılmıştır. Ovaryum sıvısız kalan toplam yumurtalar, eşit gramajda iki kısma ayrılmıştır. Bir kısım yumurtanın üzerine, daha önce ayrılmış ovaryum sıvısı eklenirken; diğer kısım yumurta ovaryum sıvısız halde bırakılmıştır. Her bir dişiden ovaryum sıvılı ve ovaryum sıvısız olmak üzere iki kısma ayrılan yumurtalar, spermatolojik özellikleri belirlenmiş iki adet erkek bireye ait spermler ile pooling yapılarak döllelenmiştir. Dölleme esnasında biriminin rutin dölleme çalışmalarında ki prosedür izlenmiş herhangi bir modifikasyon yapılmamıştır (Çelikkale, 2002). Her bir dişi balık için iki adet olmak üzere toplam altı adet farklı erkek birey kullanılmıştır. Dölleme esnasında aktivasyon ve dölleme solüsyonu olarak, balıkların içerisinde bulunduğu tankı besleyen ve spermatolojik özelliklerin belirlenmesinde aktivasyon solüsyonu olarak kullanılan su kaynağı kullanılmıştır.

Dölleme işleminden sonra döllelenmiş yumurtalar, birim kuluçkahanesine ait işaretlenmiş basket inkübatör sistemlerine her bir grup bir baskette olacak şekilde yerleştirilmişlerdir. Günlük olarak ölü yumurtalar sifonlama yöntemi ile temizlenmiş ve gruplara ait mortalite kaydedilmiştir. Dölleme yüzdesi gözlü evre aşamasına kadar belirlenmiştir ve aşağıdaki formülasyon kullanılmıştır.

Dölleme yüzdesi (%)= Σ Döllelenmiş yumurta sayısı/ Σ Yumurta sayısı*100

İstatistiksel analizler

Deneme sonunda elde edilen veriler ortalama değerleri ve standart sapmaları ile birlikte sunulmuştur. Elde edilen veriler STATISTICA v.8 programı yardımı ile bağımsız t-testi kullanılarak değerlendirilmiştir (Zar, 1996).

BULGULAR

Çalışmada üç dişi bireyden ortalama 7115±699 adet yumurta alınmıştır. Çalışmada kullanılan her bir dişi balıkta hesaplanan toplam fekondite miktarları ve her bir dişi balığa ait dölleme çalışmasında kullanılan yumurta adetleri Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Dişi bireylere ait toplam fekondite miktarları ve dölleme çalışmasında kullanılan yumurta sayıları

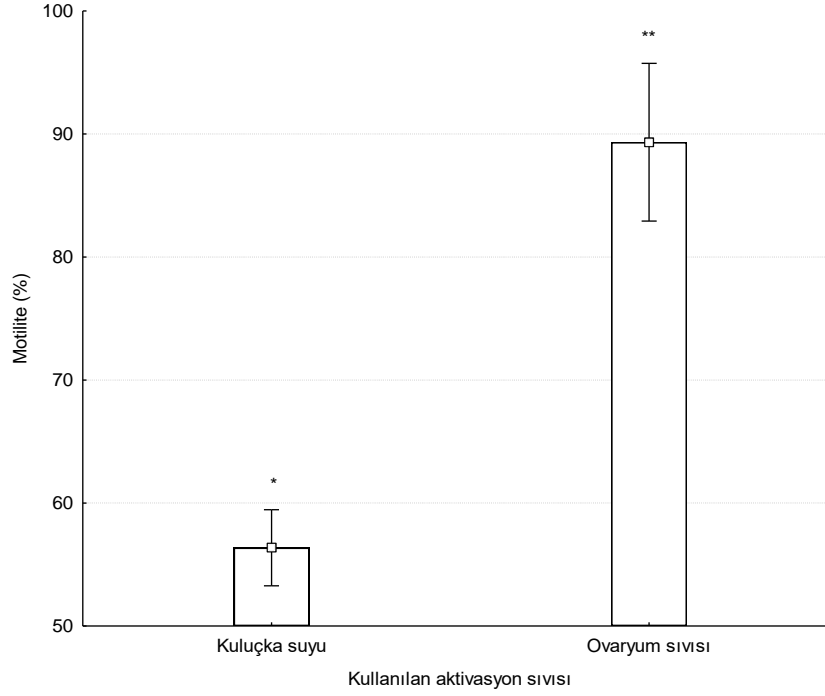
| Birey | Σ Fekondite (adet) | Ovaryum sıvılı döllenen yumurta sayısı (adet) | Ovaryum sıvısız döllenen yumurta sayısı (adet) |
|-------|---------------------------|---|--|
| 1 | 7911 | 3955 | 3956 |
| 2 | 6835 | 3417 | 3418 |
| 3 | 6600 | 3300 | 3300 |

Çalışmada kullanılan erkek balıklardan elde edilen sperm örneklerinde analiz edilen spermatolojik parametreler ve ortalama sonuçları Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2. Ovaryum sıvısı ve Kuluçkahane suyu kullanılarak aktive edilen Sperm örneklerinde motilite (%), ve VCL ($\mu\text{m/s}$) (Ort \pm sd)

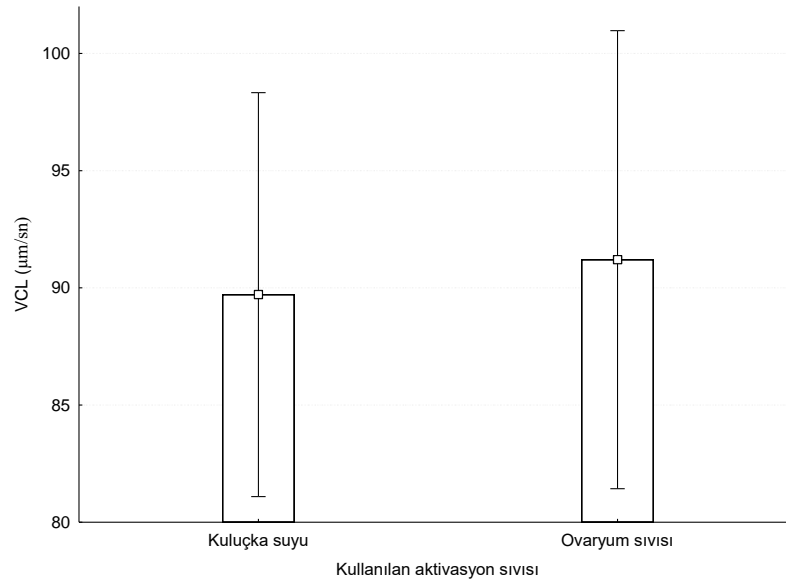
| Birey (n:2) | Aktivasyon solüsyonu | Parametreler | |
|-------------|----------------------|----------------|-------------------------|
| | | Motilite (%) | VCL ($\mu\text{m/s}$) |
| 1 | Kuluçka suyu | 56,1 \pm 1,8 | 94 \pm 1 |
| | Ovaryum sıvısı | 93,3 \pm 1,1 | 96 \pm 0,5 |
| 2 | Kuluçka suyu | 52 \pm 0,7 | 76 \pm 2,7 |
| | Ovaryum sıvısı | 78,4 \pm 0,8 | 75,1 \pm 4 |
| 3 | Kuluçka suyu | 61 \pm 0,4 | 100 \pm 4,5 |
| | Ovaryum sıvısı | 96,3 \pm 0,9 | 102,3 \pm 3 |

Kuluçka suyu ile aktivasyonda elde edilen spermatozoa motilite yüzdeleri, ovaryum sıvısı ile elde edilen yüzdelerden daha düşük bulunmuştur. Pooling yapılan spermelerde kuluçka suyu ile aktivasyonda spermatozoa motiliteleri sırası ile ilk grupta %56,1 \pm 1,8; ikinci grupta %52 \pm 0,7 ve üçüncü grupta %61 \pm 0,4 olarak hesaplanmıştır. Aynı sperm örnekleri ovaryum sıvısı ile aktive edildiğinde ise elde edilen motilite sonuçları sırası ile %93,3 \pm 1,1; 78,4 \pm 0,8 ve %96,3 \pm 0,9 olarak bulunmuştur (Tablo 2). Aktivasyon solüsyonu olarak kuluçka suyu ve ovaryum sıvısı kullanılan bu örneklerde, elde edilen motilite sonuçları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında iki aktivasyon solüsyonu ile elde edilen motilite sonuçları arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 1).



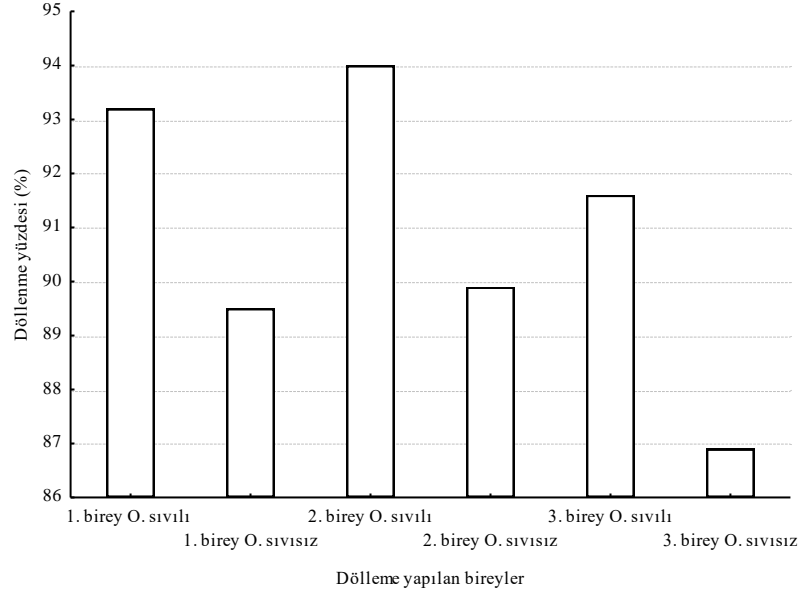
Şekil 1. Sperm örneklerinde kuluçka suyu ve ovaryum sıvısı kullanılarak elde edilen ortalama motilite (%) değerleri. Grafiklerde değerler Ortalama±SD olarak verilmiştir. * değerler arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir ($p < 0,05$).

En yüksek olarak üçüncü deneme grubunda hem kuluçka suyu ($100 \pm 4,5 \mu\text{m/sn}$) hem de ovaryum sıvısı kullanılarak elde edilen motilite VCL değeri ($102,3 \pm 3 \mu\text{m/sn}$) sırası ile birinci deneme grubunda kuluçka suyu için $94 \pm 1 \mu\text{m/sn}$; ovaryum sıvısı için ise $96 \pm 0,5 \mu\text{m/sn}$ olarak; ikinci deneme grubunda ise kuluçka suyu için $76 \pm 2,7 \mu\text{m/sn}$; ovaryum sıvısı için ise $75,1 \pm 4 \mu\text{m/sn}$ olarak tespit edilmiştir. Eğrisel hız sonuçlarında her iki parametreye ait sonuçlar her iki solüsyonda da elde edilen sonuçlar ile benzer bulunmuş ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Şekil 2).



Şekil 2. Sperm örneklerinde kuluçka suyu ve ovaryum sıvısı (OS) kullanılarak elde edilen VCL ($\mu\text{m/sn}$) değerleri. Grafiklerde değerler Ortalama±SD olarak verilmiştir.

Ovaryum sıvısı ile ve ovaryum sıvısı uzaklaştırılarak yapılan dölleme çalışması sonucunda, elde edilen dölleme yüzdeleri Şekil 3’de gösterilmiştir. Tüm yumurta gruplarında dölleme görülmüşken; ovaryum sıvısının uzaklaştırıldığı gruplarda dölleme yüzdeleri ovaryum sıvılı dölleme sonuçlarına göre daha düşük bulunmuştur.



Şekil 3. Deneme gruplarında dölleme yüzdeleri

TARTIŞMA ve SONUÇ

Ovarian epitel hücrelerinden oluşmuş ovaryum sıvısı organik (protein, serbest aminoasitler, glikoz, fosfolipitler, kolesterol ve çeşitli enzimler) ve inorganik maddeleri (Na^+ , Ca^{2+} , osmolarite ve pH) ihtiva etmektedir ve dış dölleme özelliğine sahip salmonid balıklarda yumurta ile birlikte vücuttan dışarı atılmaktadır (Lahnsteiner, 2002). Ovulasyonun son ermesi ile dölleme yeteneği kazanmış olan yumurtalar vücut boşluğuna dökülür ve vücuttan dışarı atılana kadar yarı yapışkan olan ovaryum sıvısının içinde muhafaza edilir (Lahnsteiner, 2002). Ovaryum sıvısının bu organik ve inorganik yapısı ve varlığı inseminasyon aşamasında gametlerin bulunduğu çevreyi etkilediği kadar; sperm/yumurta (kemotaksi) etkileşimi üzerinde de etkilidir (Barrannikova vd., 2002; Bayunova vd., 2003).

Sperm motilitesi sperm kalitesinin belirlenmesinde ve dölleme yüzdesinin başarısında kullanılan parametrelerden biri (Lahnsteiner vd., 1998; Golpour vd., 2013) ve ovaryum sıvısının direk olarak etkilediği, dölleme başarısını belirleyici faktörlerdendir. Ovaryum sıvısının yumurtaları ve yumurtaların dölleme yeteneğini korumasının yanı sıra, döllemedeki diğer etken olan spermatozoa motilitesi ve motilite parametreleri üzerindeki etkisi de yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur. Dil balığı (*Solea selanegansis*) ile yapılan çalışmada; ovaryum sıvısı ile aktivasyonun sağlandığı sperm örneklerinde elde edilen değerler, yapay aktivasyon solüsyonu ile elde edilen değerlerden çok daha yüksek bulunmuştur (Diogo vd., 2010). Gökkuşluğu alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) (Yoshida, 1972; Dietrich vd., 2008); Göl alabalığında (*Salvelinus namaycush*) (Galvano vd., 2013); Kafkas alabalığında (*Salmo trutta caspius*) (Hatef vd., 2009); Kral somon balığında (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Rosengrave vd., 2009) ve Alp alabalığında (*Salvelinus alpinus*) (Turner ve Montgomerie, 2002) kuluçkahane suyu ya da aktivasyon solüsyonları ile elde edilen motilite değerleri; ovaryum sıvısı ile elde edilen motilite değerlerinden çok daha düşük bulunmuş ve ovaryum sıvısının motiliteyi arttırıcı etkisi ortaya konmuştur. Hatef vd., (2009) Kafkas alabalığı ile yapmış olduğu çalışmada spermatozoa aktivasyonu için tatlı su, deniz suyu ve ovaryum sıvısını kullanmış ve sperm motilitesine ilaveten en yüksek dölleme yüzdesini deniz suyu ve ovaryum sıvısı kullandığı gruplarda bulmuştur. Yazar bir tatlı su balığı olmasına rağmen, bu türün sperm aktivasyonunda deniz suyunun daha iyi sonuç vermesini deniz suyunun ve ovaryum sıvısının benzer oranda Na^+ içermesi ve tuzun motilite süresini uzatması sebebi ile olduğunu açıklamıştır. Ovaryum sıvısının varlığı ve motilite arttırıcı etkisi deniz balıklarında da çalışılmış (Dil balığı); aktivasyon solüsyonu olarak sadece deniz suyunun kullanıldığı örneklerde motilite sağlanamamışken; ovaryum sıvısının eklenmesi ile bu

örneklerde motilite görülmüştür (Alonzo vd., 2016; Diogo vd., 2010; Litvak vd., 1998). Döllemede etkin rol oynayan spermatozoa hızı da, sperm motilitesine benzer bir şekilde ovaryum sıvısının kullanılması durumunda diğer aktivasyon solüsyonlarına göre artış göstermiş ve bu durum göl alabalığında (Butts vd., 2012), gökkuşağı alabalığında (Dietrich vd., 2008) kral somon balığı (Rosengrave vd., 2009; 2016) ve Alp alabalığında (Turner ve Montgomerie, 2002) yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur. Yine kral somon balığında yapılan bir çalışmada spermatozoa aktivasyonunun ovaryum sıvısı ile yapıldığı her durumda spermatozoaya ait tüm kinematik parametrelerin arttığı bildirilmiştir (Butts vd., 2017). Bu çalışmada sperm motilitesinin ovaryum sıvısı ile artış gösterdiği bulunmuştur. Sperm örneklerinde ovaryum sıvısı ile aktivasyon sonrasında elde edilen motilite değeri 78-96% arasında değişiklik göstermiş ve bu sonuçlar kuluçka suyu ile aktive edilerek elde edilen değerlerden (%52-61) daha yüksek bulunmuştur.

Ovaryum sıvısının inorganik ve organik yapısı motilite kadar döllemede diğer bir sperm kalitesi parametresi olan spermatozoa hızları üzerinde de etkilidir. Atlantik morinası (*Gadus morhua*) (Litvak ve Trippel, 1998), Gökkuşağı alabalığı (Wojtczak vd., 2007; Dietrich vd., 2008) ve Alp alabalığında (Turner ve Montgomerie, 2002; Urbach vd., 2005) yapılan çalışmalarda yapay olarak hazırlanmış aktivasyon solüsyonlarında elde edilen sperm motilitesine ait hız değerleri; ovaryum sıvısı ilave edilen aktivasyon solüsyonlarında elde edilen sonuçlardan çok daha düşük bulunmuş ve ovaryum sıvısının hızı arttırıcı etkisi ortaya konmuştur. Son zamanlarda kral somon balığında in vitro olarak yapılan bir çalışmada, ovaryum sıvısı içerisinde en yüksek hıza sahip olan spermatozoa dölleme yüzdesinin diğerlerine göre çok daha yüksek olduğu ve ovaryum sıvısının varlığı ile hazırlanmış bu rekabetçi ortamın spermatozoa hızını arttırması ile sonuçlanmasına ilaveten, spermatozoa hızı ile embriyonun hayatta kalma yüzdesi arasında da bir ilişki olduğu ifade edilmiştir (Lewis ve Pitcher, 2017; Rosengrave vd., 2016). Kral somon balığı ile yapılan başka bir çalışmada ise su ile aktivasyonun sağlanmasında sperm hızı daha düşük olmasına rağmen; dölleme yüzdesinin daha yüksek olduğu bulunmuştur (Lehnert vd., 2017). Aynı çalışmada ovaryum sıvısında aktive olan spermatozoa hızları, aktivasyon solüsyonu olarak sadece suyun kullanıldığı deneme gruplarından %23.7 oranında daha yüksek olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada spermatozoaya ait VCL değerlerinde, aktivasyon solüsyonu olarak kuluçkahane suyu ya da ovaryum sıvısı kullanılmasının bir fark yaratmadığı; her iki aktivasyon solüsyonunda sperm hücrelerinin benzer hız değerlere sahip olduğu bulunmuştur.

Ovaryum sıvısı ve spermatozoa motilitesi arasındaki ilişki hakkında yapılan ve ovaryum sıvısının aktivasyon solüsyonu olarak kullanılması esnasında sulandırılması gerektiğini ifade eden çalışmalarda mevcuttur. Wojtczak vd., (2007) salmonid balıklarda ovaryum sıvısının % 50 oranında sulandırılması ile daha yüksek motilite değerinin elde edildiğini bildirmişken; Dil balığında yapılan bir çalışmada %25 oranında sulandırmanın en iyi değerleri verdiği ortaya konmuştur (Diogo vd., 2010). Bu çalışmada ovaryum sıvısı herhangi bir sulandırmaya tabii tutulmamıştır (% 100) ve elde edilen motilite değerleri değerlendirildiğinde ovaryum sıvısının %100 kullanılmasının uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

Birçok deniz ve tatlı su balığında ovaryum sıvısı dölleme kapasitesi ve sperm motilitesi üzerinde etkilidir (Koya vd., 1993; Lahnsteiner vd., 1995; Rosengrave vd., 2008; İnanan ve Öğretmen, 2015; Özgür, 2018). Ovaryum sıvısının dölleme üzerindeki bu etkisi bilinmesine rağmen bu etkinin nasıl olduğu ile ilgili çalışmalar halen devam etmektedir. Yapılan çalışmalar ovaryum sıvısının uzaklaştırılmasının dölleme yüzdesinde düşüklük ile sonuçlandığını ancak yine de döllemenin gerçekleştiğini ortaya koymuştur (Stoddard vd., 2006). Bu çalışmalara ilaveten Dil balığı ile yapılan bir çalışmada ovaryum sıvısının dölleme üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Jia vd., 2015).

Bu çalışmada, ovaryum sıvısı ile aktive olan spermatozoa'da motilite değerleri yüksek bulunmuş ve buna ilaveten ovaryum sıvısının uzaklaştırılması ile gerçekleştirilen dölleme çalışmasındaki gruplardaki dölleme yüzdesi, ovaryum sıvısının muhafaza edildiği gruplardan daha düşük bulunmuştur. Ancak deneme grupları arasındaki dölleme yüzdesinin farkı kabul edilebilir olarak değerlendirilmiştir. Döllemenin yapıldığı sperm örneklerinde motilite arasında ki istatistiksel fark ise, kullanılan kuluçkahane suyunun sperm motilitesini sağlamak için çok efektif olmadığını ancak dölleme solüsyonu olarak kullanıldığında yumurta ve sperm etkileşimine ilaveten yumurtanın kemotaksisi üzerinde etkili olduğu ve ovaryum sıvısının uzaklaştırılmış olmasına rağmen döllemede ovaryum sıvısı kadar yumurtanın kendisinin de kemotaksi sağlayabildiği ve yumurtanın kemoatraktan yardımı ile sperm hücrelerini döllemede kullandığı sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Alonzo S.H., Stiver K.A., & Marsh-Rollo S.E. (2016). Ovarian fluid allows directional cryptic female choice despite external fertilization. *Nature Communications*, 7, 124-152.
- Barannikova I.A., Dyubin V.P., Bayunova L.V., & Semenkov T.B. (2002). Steroids in the control of reproductive function in fish. *Neuroscience and Behavioral physiology*, 32(2), 141-148.
- Bayunova L.V., Barannikova I.A., Dyubin V.P., Gruslova A.B., Semenkov T.B., & Trenkler I.V. (2003). Sex steroids concentrations in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedti*) serum and coelomic fluid at final oocyte maturation. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28(1-4), 325-326.
- Billard R., & Cosson M. (1992). Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *Journal of Experimental Biology*, 261, 122-131.
- Boryshpolets, S., Kowalski, R. K., Dietrich, G. J., Dzyuba, B., & Ciereszko, A. (2013). Different computer-assisted sperm analysis (CASA) systems highly influence sperm motility parameters. *Theriogenology*, 80(7), 758-765.
- Butts I.A., Johnson K., Wilson C.C., & Pitcher T.E. (2012). Ovarian fluid enhances sperm velocity based on relatedness in lake trout, *Salvelinus namaycush*. *Theriogenology*, 78(9), 2105-2109.
- Butts I.A., Prokopchuk G., Kašpar V., Cosson J., & Pitcher T.E. (2017). Ovarian fluid impacts flagellar beating and biomechanical metrics of sperm between alternative reproductive tactics. *Journal of Experimental Biology*, 220(12), 2210-2217.
- Cosson J. (2004). The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. *Aquaculture International*, 12, 69-85.
- Cosson J. (2008). *Methods to analyse the movements of the spermatozoa and their flagella*. In: Alavi SMH, Cosson J, Coward K, Rafiee G. editors. *Fish spermatology*. Alpha Science Ltd, Oxford, pp 63-102.
- Cosson J. (2010). Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence. *Journal of Fish Biology* 76, 240-279.
- Çelikkale, M.S. (2002). *İçcu Balıkları ve Yetiştiriciliği*. Cilt 1, 3.Baskı, Karadeniz Teknik Üniversitesi Matbaası, Genel Yayın No: 124, Fakülte Yayın No: 2, Trabzon.
- Dietrich G.J., Wojtczak M., Słowińska M., Dobosz S., Kuźmiński H., & Ciereszko A. (2008). Effects of ovarian fluid on motility characteristics of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) spermatozoa. *Journal of Applied Ichthyology*, 24, 503-507.
- Diogo P., Soares F., Dinis M.T., & Cabrita E. (2010). The influence of ovarian fluid on *Solea senegalensis* sperm motility. *Journal of Applied Ichthyology*, 26(5), 690-695.
- Elofsson H., Van Look K., Borg B., & Mayer I. (2003). Influence of salinity and ovarian fluid on sperm motility in the fifteen-spined stickleback. *Journal of Fish Biology*, 63(6), 1429-1438.
- Galvano P.M., Johnson K., Wilson C.C., Pitcher T.E., & Butts I.A. (2013). Ovarian fluid influences sperm performance in lake trout, *Salvelinus namaycush*. *Reproductive biology*, 13(2), 172-175.
- Golpour A., Akhoundian M., Khara H., Rahbar M., & Dadras H. (2013). Changes of sperm quality parameters in Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) during spawning migration. *Czech Journal of Animal Science*, 3, 117-124.
- Hatef A., Niksirat H., & Alavi S.M.H. (2009). Composition of ovarian fluid in endangered Caspian brown trout, *Salmo trutta caspius*, and its effects on spermatozoa motility and fertilizing ability compared to freshwater and a saline medium. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(4), 695-700.
- Hirano T., Morisawa M., & Suzuki K. (1978). Changes in plasma and coelomic fluid composition of the mature salmon (*Onchorhynchus keta*) during freshwater addition. *Comparative Biochemistry and Physiology*, A 61, 5-8.
- Hunter, J. R., Lo, N. C., & Leong, R. J. (1985). Batch fecundity in multiple spawning fishes (pp. 67-77). NOAA Technical Report NMFS 36.
- İnanan B.E., & Öğretmen F. (2015). Determination of differences in the biochemical properties of sperm activating and non-activating ovarian fluids and their influences on sperm motility in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 448, 539-544.
- Jia Y.D., Niu H.X., Meng Z., Liu X.F., & Lei J.L. (2015). Biochemical composition of the ovarian fluid and its effects on the fertilization capacity of turbot *Scophthalmus maximus* during the spawning season. *Journal of Fish Biology*, 86(5), 1612-1620.
- Johnson S.L., Villarroel M., Rosengrave P., Carne A., Kleffmann T., Lokman P.M., & Gemmell N.J. (2014). Proteomic analysis of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) ovarian fluid. *PLoS One*, 9(8), e104155.
- Kholodnyy V., Gadêlha H., Cosson J., & Boryshpolets S. (2019). How do freshwater fish sperm find the egg? The physicochemical factors guiding the gamete encounters of externally fertilizing freshwater fish. *Reviews in Aquaculture*, 1-28.

- Kime D.E., Van Look K.J.W., McAllister B.G., Huyskens G., Rurangwa E., & Ollevier F. (2001). Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 130(4), 425-433.
- Koya Y., Munehara H., Takano K., & Takahashi H. (1993). Effects of extracellular environments on the motility of spermatozoa in several marine sculpins with internal gametic association. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 106(1), 25-29.
- Lahnsteiner F., Weisman T.R., & Patzner A. (1995). Composition of the ovarian fluid in 4 salmonid species: *Onchorhynchus mykiss*, *Salmo trutta f lacustris*, *Salvelinus lacustris*, and *Hucho hucho*. *Reproduction Nutrition Development*, 35, 465-474.
- Lahnsteiner F., Berger B., Weismann T., & Patzner R.A. (1997). Sperm structure and motility of the freshwater teleost *Cottus gobio*. *Journal of Fish Biology*, 50(3), 564-574.
- Lahnsteiner F. (2002). The influence of ovarian fluid on the gamete physiology in the Salmonidae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 27(1-2), 49-59.
- Lehnert S.J., Butts I.A., Flannery E.W., Peters K.M., Heath D.D., & Pitcher T.E. (2017). Effects of ovarian fluid and genetic differences on sperm performance and fertilization success of alternative reproductive tactics in Chinook salmon. *Journal of Evolutionary Biology*, 30(6), 1236-1245.
- Lewis J.A., & Pitcher T.E. (2017). Tactic-specific benefits of polyandry in Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Journal of Fish Biology*, 90(4), 1244-1256.
- Litvak M.K., & Trippel E.A. (1998). Sperm motility patterns of Atlantic cod (*Gadus morhua*) in relation to salinity: effects of ovarian fluid and egg presence. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 55(8), 1871-1877.
- Macfarlane C.P. (2002). *Gametic interactions in externally fertilising fishes*. Ph.D. Thesis. University of Liverpool, 118 p., UK.
- Morisawa, M., & Yoshida, M. (2005). Activation of motility and chemotaxis in the spermatozoa: From invertebrates to humans. *Reproductive Medicine and Biology*, 4(2), 101-114.
- Ozgur, M. E. (2018). The Effects of Different Sperm Activator Medias on the Velocity and Movement Style Brown Trout (*Salmo trutta* Linnaeus, 1792) Sperm Cells. *Aquaculture Studies*, 18(2), 75-78.
- Özgür, M. E., Okumuş, F., & Kocamaz, A. F. (2019). A novel computer assisted sperm analyzer for assessment of spermatozoa motility in fish; BASA-Sperm Aqua. *El-Cezeri Journal of Science and Engineering*, 6(1), 208-219.
- Rakitin A., Ferguson M.M., & Trippel E.A. (1999a). Spermatocrit and spermatozoa density in Atlantic cod (*Gadus morhua*): correlation and variation during the spawning season. *Aquaculture*, 170 (3-4), 349-358.
- Rakitin A., Ferguson M.M., & Trippel E.A. (1999b). Sperm competition and fertilization success in Atlantic cod (*Gadus morhua*): effect of sire size and condition factor on gamete quality. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 56(12), 2315-2323.
- Rosengrave P., Taylor H., Montgomerie R., Metcalf V., McBride K., & Gemmell N.J. (2009). Chemical composition of seminal and ovarian fluids of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and their effects on sperm motility traits. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 152(1), 123-129.
- Rosengrave P., Montgomerie R., & Gemmell N. (2016). Cryptic female choice enhances fertilization success and embryo survival in chinook salmon. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283 (1827), 20160001.
- Stoddard J.W., Parsons J.E., & Nagler J.J. (2006). Early onset of embryonic mortality in sub-fertile families of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Reproduction, Fertility and Development*, 17 (8), 785-790.
- Stoss J. (1983). Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. *Fish physiology*, 9B, 305-350.
- Turner E., & Montgomerie R. (2002). Ovarian fluid enhances sperm movement in Arctic charr. *Journal of Fish Biology*, 60(6), 1570-1579.
- Urbach D., Folstad I., & Rudolfson G. (2005). Effects of ovarian fluid on sperm velocity in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 57(5), 438-444.
- Wojtczak M., Dietrich G.J., Słowińska M., Dobosz S., Kuźmiński H., & Ciereszko A. (2007). Ovarian fluid pH enhances motility parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Aquaculture*, 270(1-4), 259-264.
- Zadmajid V., Myers J.N., Sørensen S.R., & Butts I.A. (2019). Ovarian fluid and its impacts on spermatozoa performance in fish: a review. *Theriogenology*. 132, 144-152.