



Farklı Tuz Solüsyonlarının Gökkuşaağı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Spermlerinin Dölleme Kabiliyeti Üzerine Etkisi

Mehmet ŞİMŞİR Süleyman AKHAN*
Akdeniz Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Bölümü, Antalya

Geliş/Received: 05.06.2020

Kabul/Accepted: 07.07.2020

Atıf yapmak için: Şimşir, M. & Akhan, S. (2020). Farklı Tuz Solüsyonlarının Gökkuşaağı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Spermlerinin Dölleme Kabiliyeti Üzerine Etkisi. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 5(3), 309-312.

How to cite: Şimşir, M. & Akhan, S. (2020). Effect of Different Salt Solutions on the Fertilization Ability of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Sperm. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 5(3), 309-312.

<https://orcid.org/0000-0002-6640-816X>
 <https://orcid.org/0000-0002-9122-1495>

*Sorumlu yazarın:
Süleyman AKHAN
Akdeniz Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi,
Yetiştiricilik Bölümü, Antalya.
✉: akhan@akdeniz.edu.tr
Cep telefonu : +90 (533) 549 73 70

Öz: Bu çalışmada farklı tuz (NaCl) konsantrasyonlarına (%3, %6 ve %12) sahip dölleme eriyiklerini gökkuşaağı alabalığı (*O. mykiss*) sperm hareket süreleri ve dölleme kabiliyetlerine etkisi belirlenmiştir. Kontrol için kullanılan distile saf suda en kısa hareket süresi belirlenirken %3 ile %12 tuzluluğa sahip solüsyon ile aktive edilen spermelerde sırasıyla sperm hareket süreleri $65 \pm 10,01$ ve $50,2 \pm 3,12$ sn olarak belirlenmiştir. En uzun süreli hareket süresi $75 \pm 5,17$ sn olarak %6 tuzluluğa sahip solüsyonla elde edilmiştir. Saf su ile ortalama dölleme oranı $83,76 \pm 0,36$ olarak belirlenmiştir. Denemelerde kullanılan %3, %6 ve %12 aktivasyon solüsyonlarında ise en iyi dölleme oranı %6 konsantrasyona sahip tuz solüsyonu kullanılan grupta $92,96 \pm 0,83$ olarak gerçekleşmiştir. Dölleme oranları açısından kontrol grubu ve tuzlu dölleme eriyiği kullanılan tüm grupların ortalamaları arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$).

Anahtar kelimeler: Aktivasyon solüsyonu, dölleme kabiliyeti, gökkuşaağı alabalığı, hareket süresi, sperm.

Effect of Different Salt Solutions on the Fertilization Ability of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Sperm

*Corresponding author's:
Süleyman AKHAN
Akdeniz University, Faculty of Fisheries,
Aquaculture Department, Antalya.
✉: akhan@akdeniz.edu.tr
Mobile telephone : +90 (533) 549 73 70

Abstract: In this study, the effects of activating solutions prepared with different salt (NaCl) concentrations (3%, 6% and 12%) on rainbow trout (*O. mykiss*) sperm motility durations and fertilization abilities were determined. While determining the shortest movement time in distilled pure water used for control, sperm movement times were determined as 65 ± 10.01 and 50.2 ± 3.12 sec, respectively, in the sperm activated with 3% to 12% saline solution. The longest motility duration was obtained with 6% saline solution as 75 ± 5.17 s. The average fertilization rate (%) with pure water is determined as 83.76 ± 0.36 . Among experimental activation solution groups containing 3%, 6% and 12% NaCl, the best fertilization rate was obtained as $92.96 \pm 0.83\%$ with 6% saline group. In terms of insemination rates, the difference between the averages of all the saline fertilization solution groups was found statistically significant ($p < 0.05$).

Keywords: Activation solution, fertilization ability, rainbow trout, motility duration sperm.

GİRİŞ

Kemikli balıklarda spermier sağım öncesi ve sonrasında isotonik seminal plazma içerisinde yüksek K^+ konsantrasyonu ile bloke edilerek hareketsiz halde bulunurlar (Woolsey et al., 2006). Spermatazoolar buldukları seminal plazma dışına çıkarak hipo osmotik plazma içerisinde süspanse olduklarında hareket etmeye başlamaktadır (Lahnsteiner et al., 1998). Sperm kalitesi suni döllemede başarıyı etkileyen en önemli unsurdur. Sperm kalitesini oluşturan sperm konsantrasyonu, motilite ve motilite süresi gibi unsurlar balıklarda dölleme başarısını doğrudan etkilemektedir (Alavi & Cosson, 2005; Cosson et al., 1985).

Sperm motilitesi ve hareket süresi pH, iyonlar, ozmotik basınç, sperm-media sulandırma oranı, sucul çevre gibi faktörler tarafında etkilenmektedir (Goodall et al., 1989; Khara et al., 2014). Suni dölleme solüsyonu spermatazooların limit dışı osmotik basınçla yüzleşmesi yerine iyi aktivasyon şartları sağlayarak sperm hareket süresini uzatmaktadır (Cosson, 1985). Böylece daha az spermatazoolla daha fazla yumurta başarılı bir şekilde döllenebilmektedir.

Gökkuşığı alabalığı ülkemizde kültürü en fazla yapılan tür durumundadır ve başta yavru üretimi Türkiye genelinde kaynak suları ve akarsular üzerinde yaygınlaşmış durumdadır (Akhan vd., 2016). Genellikle çiftlik şartlarında üretimde kullanılan kaynak suları, dere suları ve göl suları alabalık spermierinin aktivasyonu ve dölleme için yeterli hareketlilik üretmektedir (Woolsey et al., 2006). Bununla birlikte de-iyonize su balık spermierinin aktivasyonu için oldukça zayıf aktivatördür. Su kaynakları bulunduğu bölgedeki jeolojik yapı ve aldığı yağış nedeniyle farklı sertliğe sahip olabilmektedir. Düşük sertliğe sahip sularda yavru üreten alabalık üreticileri (Örneğin: Doğu Karadeniz) üretim sırasında döllemede ve kuluçka başarısında olumsuzluklar yaşayabilmektedir. Bu nedenle sperm aktivasyonunu en iyi sağlayan dölleme eriyiğinin kullanılması üretim başarısını arttırmaktadır (Canyurt vd., 2003). Alabalıklarda aktivasyon solüsyonunda ve yetiştirme suyundaki iyon konsantrasyonunun döllemedeki etkisi Billard (1978), Stoss (1983) ve Billard et al., (1995) tarafından kapsamlı olarak araştırılmış ve tartışılmıştır. Ancak bu dölleme eriyiklerinin çoğu karmaşık ve farklı tuzların karışımından oluşmaktadır. Oysa üreticiler tarafından kolay temin edilebilen NaCl gibi sodyum tuzu ile yapılmış kapsamlı bir çalışmanın sonuçlandırılması ve elde edilen verilerin üretici ve bilim camiası ile paylaşılması sektör ve üreticiler için önemli katkı sunacağı düşünülmüştür. Bu çalışmada gökkuşığı alabalıklarında farklı tuz (NaCl) konsantrasyonuna sahip dölleme eriyiklerinin spermatazooların motilite süresine ve dölleme başarısına etkisi araştırılmıştır.

MATERYAL VE METOT

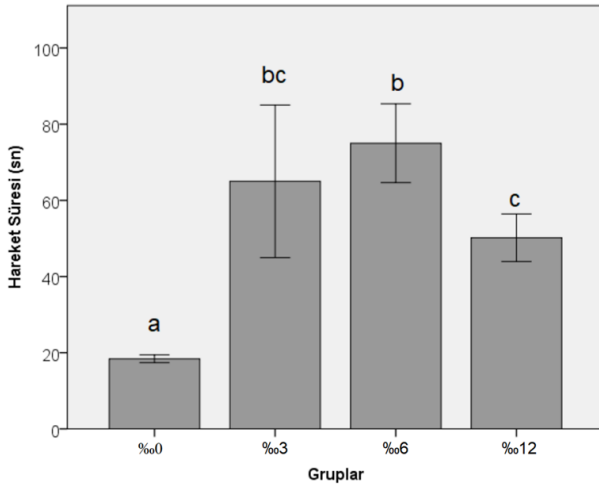
Çalışmalar için T.C. Akdeniz Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığından gerekli izinler alınmıştır (Tarih: 25.12.219 ve Karar No:023). Çalışmada materyal olarak kullanılan yumurtalar ve spermier özel bir alabalık işletmeden temin edilmiştir. Araştırma için her bir dölleme eriyiği (%3- %6 ve %12 NaCl) kontrol (Distile saf su) grubu için 3 tekerrürlü olmak üzere $3 \times 4 = 12$ deney grubu oluşturulmuştur. Çalışmalarda 6 erkek bireyden (2+ yaş ve 1,5-2 kg ağırlık) sağılmış süt karışımı kullanılmıştır. Denemelerde kullanılan süt karışımının spermatazoa konsantrasyonu belirlemek için, süt karışımı 1/200 oranında %6 NaCl (Merck, Almanya) solüsyon ile sulandırıldıktan sonra $\times 200$ büyütmede ışık mikroskobunda (Nikon Eclipse Ci-L Tokyo Japonya) Thoma lamı kullanılarak standart sayım protokolüne göre sayılmıştır. Bu sperm karışımından alınan spermatazooların her bir dölleme eriyiği ile aktivasyon sonrası hareket süreleri belirlenmiştir. Bunun için her aktivasyon solüsyonundan ve saf sudan (kontrol) lam üzerinde 1 damla damlatıldıktan sonra objektif altına yerleştirilmiş ve mikropipet yardımı ile üzerine 2 mikrolitre süt eklenerek aktive edilmiştir. Aktivasyon sonrası spermier duruncaya kadar geçen hareket süresi kronometre ile ölçülmüştür. Her solüsyon için bu işlem 6 tekerrürlü olarak yapılarak hareket süreleri belirlenmiştir.

Üç farklı dişiden (3+ yaş ve 2,5-3 kg ağırlık) sağılan yumurta karışımından üç tekerrürlü olarak her grup için 1154 ± 26 adet yumurta kullanılmıştır. Yumurtaların döllemede yumurta başına $7,9 \pm 0,17 \times 10^6$ adet/ml spermatazoa olacak şekilde 1 ml süt kullanılmıştır. Standart protokole göre döllenen yumurtalar, su alıp sertleştikten sonra temizlenmiştir. Kontrol ve deneme gruplarına ait döllemiş yumurtalar, su sıcaklığı $10 \pm 0,5^\circ\text{C}$ 'ye ayarlanmış kapalı devre dikey kuluçka dolabında (Fet Elektronik-Konya Türkiye) 3 bölmeli tavalara yerleştirilmiş ve gözleninceye kadar inkübe edilmiştir. Dölleme öncesinde ve yumurtaların gözlenmesi sonrasında yumurta sayıları sayılarak ölü yumurtalara oranlanarak dölleme başarısı hesaplanmıştır.

Elde edilen verilerin istatistiki hesaplamaları ve analizleri için SPSS (ver 23) paket programı kullanılmıştır. Yumurta sayıları ve sperm sayısı için paket programında ortalamalar hesaplanarak veriler $\bar{X} \pm SS$ olarak verilmiştir. Sperm hareket süresi ve dölleme kabiliyeti açısından gruplar arası karşılaştırmada tekyönlü varyans analizine tabi tutularak Duncan çoklu karşılaştırma testi yapılmıştır. Veriler $\bar{X} \pm SH$ olarak verilmiştir.

BULGULAR

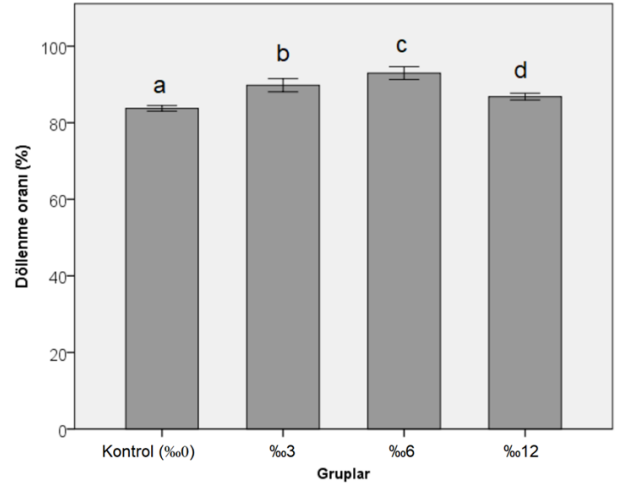
Denemelerde kullanılan ve 6 farklı erkekte sağılan 1 ml sperm karışımında spermatozoit sayısı $9,13 \times 10^9$ adet/ml olarak hesaplanmıştır. Kuluçkaya bırakılan yumurtalar gözleninceye kadar geçen kuluçka döneminde günlük kaydedilen su sıcaklığı ortalama $10,11 \pm 0,26^\circ\text{C}$ olarak belirlenmiştir. Yumurtalar 16-17. günde gözlenmiştir. Dölemelerde kullanılan sperm karışımının distile saf su, %3, %6 ve %12 tuzlu eriyik ile aktivasyonundan sonra belirlenen ortalama hareket süreleri Şekil 1'de görülmektedir. Saf su ile aktive edilen spermatozoaların ortalama hareket süresi $18,4 \pm 0,51$ saniye olarak belirlenmiştir. Tuzlu aktivasyon solüsyonlarında ise %3, %6 ve %12 için sırasıyla spermatozoaların ortalama hareket süresi $65 \pm 10,01$, $75 \pm 5,17$ ve $50,2 \pm 3,12$ sn olarak belirlenmiştir. En uzun süreli hareket süresi %6 tuzluluğa sahip solüsyonla elde edilmiştir.



Şekil 1. Saf su (Kontrol) ve farklı tuzluluktaki (%3, %6 ve %12) döleme eriyikleri ile aktive edilen spermelerde ölçülen hareket süreleri. Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemlidir. ($p < 0,05$).

Figure 1. Determined motility durations in sperm activated by pure water (Control) and fertilization solutions of different salinity (3‰, 6‰ and 12‰). The difference between the averages shown in different letters is statistically significant ($p < 0.05$).

Distile su ve %3, %6 ve %12 NaCl solüsyonları ile aktivasyon sonucu gruplarda belirlenen döleme oranları Şekil 2'de görülmektedir. Saf su ile ortalama döleme oranı $83,76 \pm 0,36$ olarak belirlenmiştir. Tuzlu aktivasyon solüsyonlarında ise %3, %6 ve %12 için sırasıyla ortalama döleme oranları $89,79 \pm 0,86$, $92,96 \pm 0,83$ ve $86,82 \pm 0,45$ olarak belirlenmiştir. En iyi döleme oranı %6 tuzluluğa sahip aktivasyon solüsyonu ile elde edilmiştir. Tüm gruplara ait ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$).



Şekil 2. Saf su (Kontrol) ve farklı tuzluluktaki (%3, %6 ve %12) döleme eriyikleri ile aktive edilen spermeler ile dölenen gruplarda belirlenen döleme oranları. Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistik olarak önemlidir. ($p < 0,05$).

Figure 2. Fertilization success determined in the groups fertilized with pure water (Control) and sperms activated with different salinity (3‰, 6‰ and 12‰). The difference between the averages shown in different letters is statistically significant ($p < 0.05$).

SONUÇ VE TARTIŞMA

Döleme kabiliyeti, birçok hayvan türünde sperm motilitesi ve süresi ile ilişkilendirilmiştir. Dölemede motilite süresini arttıran faktörlerin kullanımı ile balık spermalarının *in vitro* döleme kapasitesini arttırmak mümkün olabilmektedir (Woolsey et al., 2006). Balıkların seminal plazmasının ozmolaritesi türlere ve buldukları habitatlara göre değişmektedir. Alabalıklarda seminal plazmanın ozmolaritesi $169,1 \text{ mOsm/kg}$ ile 322 mOsm/kg arasında değiştiği bildirilmiştir (Momin and Memis, 2018). Hiperosmolarite, inaktif haldeki spermatozoaları hareketlendirerek aktif hale getirmektedir (Morisawa & Suzuki 1980). Ancak yüksek osmolarite (Örneğin 400 mOsm/kg) salmondelerde sperm hareketini engellemektedir (Momin & Memis 2018). Bu nedenlerle alabalıklarda kullanılan döleme eriyikleri, birçok tuzun ilavesiyle osmolaritesi artırılmış solüsyonlardan oluşmaktadır. Bu amaçla çok sayıda aktivasyon solüsyonları geliştirilmiş ve bazıları önerilmiştir. Ancak bunların çoğunluğu sıradan üreticilerin kolaylıkla hazırlayıp kullanamayacağı içeriği karmaşık aktivasyon solüsyonlarıdır. Krise et al. (1995) Atlantik salmonu (*Salmo salar*) için geliştirmiş olduğu altı farklı aktivasyon solüsyonundan (Fosfat tamponu, Tris tamponu Boraks tamponu ve 3 farklı pH değerine sahip 125 mM NaCl tamponu) Fosfat tamponu hariç diğer beşinin somon balığının spermelerini aktive ettiğini ve %78 ile 86 arasında değişen döleme oranları elde edildiğini ancak aralarında istatistiksel olarak fark olmadığını bildirmiştir. Billard (1978) %7 tuzluluğa sahip aktivasyon solüsyonunun alabalıkta ve turnada hem sperm hareket süresini uzattığı

hem de dölleme kabiliyetini arttırdığını bildirmiştir. Bu çalışmada da benzerce kullanılan üç farklı konsantrasyonlardan (%03, %06 %12) en iyi hareket süresi ve dölleme kabiliyetinin %6 tuzluluğa sahip aktivasyon çözümü ile elde edilmiştir.

Distile saf suyun sperm aktivasyonu için çok yetersiz kaldığı Woolsey et al (2006) tarafından bildirilmiştir. Çalışma sonuçları da yukarıdaki araştırmacının sonuçlarını desteklemektedir. Çalışmada saf su ile aktive edilen spermelerin hareket süresi $18,4 \pm 0,51$ saniye gibi çok kısa bulunurken aktivasyon solüsyonlarına göre daha düşük dölleme oranı ($p < 0,05$) elde edilmiştir.

Kaliteli sperm üretimi, dölleme sırasında sperm hareketliliğinin uzatılması ve dölleme oranının iyileştirilmesi başarılı bir kuluçkahane yönetimi için oldukça önemlidir. Bu çalışma ile üreticiler için bilimsel temellere dayalı basit, hazırlaması ve temini kolay aktivasyon çözümü geliştirmek amaçlanmıştır. Çalışma bu amacını elde edilen sonuçlarla gerçekleştirmiştir. Üreticiler için spermelerde en uzun hareket süresi ve en iyi dölleme oranını sunan %6 NaCl çözümü rutin kullanımlar için önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Akhan, S., Sonay, F.D. & Yandi, I. (2016).** Ağ-kafeslerde kışlatılan gökkuşuğu alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) uzun süreli açlığın bazı verim özellikleri ile vücut kompozisyonu üzerine etkisi. *Yunus Araştırma Bülteni*, **16**, 265-269.
- Alavi, S.M.H. & Cosson, J. (2005).** Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review. *Cell Biology International*, **29**, 101-110.
- Billard, R. (1978).** Changes in structure and fertilizing ability of marine and freshwater fish spermatozoa diluted in media of various salinities. *Aquaculture*, **14**(3), 187-198.
- Billard, R., Cosson, J., Perchee, G. & Linhart, O. (1995).** Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture*, **129**(1-4), 95-112.
- Canyurt, M.A., Akhan, S. & Takma, Ç. (2003).** Gökkuşuğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) spermelerinin kısa süre saklanması üzerine bir araştırma. *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, **20**, 537-542.
- Cosson, M.P., Billard, R., Gatti, J. L. & Christen, R. (1985).** Rapid and quantitative assessment of trout spermatozoa motility using stroboscopy. *Aquaculture*, **46**, 71-75.
- Goodall, J.A., Blackshaw, A.W. & Capra, M.F. (1989).** Factors affecting the activation and duration of motility of the spermatozoa of the summer whiting (*Sillago ciliata*). *Aquaculture*, **77**(2-3), 243-250.
- Khara, H., Noveiri, S.B., Dadras, H., Rahbar, M., Ahmadnejad, M. & Khodadoost, A. (2014).** Effect of different activation solutions on motility and fertilizing ability of spermatozoa in common carp *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758. *Indian Journal of Fisheries*, **61**, 63-68.
- Krise, W.F., Hendrix, M.A., Bonney, W.A. & Baker-Gordon, S.E. (1995).** Evaluation of sperm-activating solutions in atlantic salmon *Salmo salar* fertilization tests. *Journal of the World Aquaculture Society*, **26**, 384-389.
- Lahnsteiner, F., Weismann, T. & Patzner, R. A. (1998).** Determination of the semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoal metabolism. *Aquaculture*, **163**, 163-181.
- Momin, M. & Memiş, D. (2018).** Sperm quality analysis of normal season (NG) and out-season by photoperiod manipulation (PG) of male rainbow trout broodstock (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry*, **44**, 1551-1560.
- Morisawa, M. & Suzuki, K. (1980).** Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. *Science*, **110**, 1145-1147.
- Stoss, J. (1983).** Fish Gamete preservation and spermatozoan physiology. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. & Donaldson, E.M. (Ed.) *Fish Physiology, Volume 9, Part B*, 305-350p, Academic Press, New York-USA.
- Woolsey, J., Holcomb, M., Cloud, J.G. & Ingermann, R.L. (2006).** Sperm motility in the steelhead *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): influence of the composition of the incubation and activation media. *Aquaculture Research*, **37**, 215-223.