

Gökkuşuğu Alabalığının *Oncorhynchus mykiss* Sperminin Kısa Sure Muhafazası: Farklı Ekstendörlerin Etkilerinin Belirlenmesi

Önder Aksu¹ Filiz Kutluyur^{1*} Abdullatif Ölçülü¹ Mehmet Kocabaş²

¹Munzur Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Tunceli, Türkiye

²Karadeniz Teknik Üniversitesi, Yaban Hayatı Ekolojisi ve Yönetimi Bölümü, Trabzon, Türkiye.

*Sorumlu Yazar

E-mail:filizkutluyur@hotmail.com

Özet

Gökkuşuğu alabalığının 4°C’de kısa süreli muhafazasında sperm motilitesi üzerinde farklı sulandırıcıların etkilerini belirlemek için denemeler kurulmuştur. Sperm toplaması abdominal masaj yoluyla gerçekleştirilmiştir. Sperm farklı sulandırıcılarla 1:3 oranında sulandırılmıştır. Sperm hücrelerinin motilitesi ve süresi tüm denemelerde günlük olarak belirlenmiştir. Sonuçlar, glukoz ve dimetilsülfoksit (DMSO) bazlı sulandırıcıda sperm 6 gün motil kaldığını göstermiştir. Bu çalışma kriyoprezervasyon ve üreme yönetimi için yararlı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: *Oncorhynchus mykiss*, sperm, motilite, yaşama süresi

Abstract

Experiments were designed to clarify the effect of different extenders on sperm motility of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* after short-term cold storage at 4°C for 6 days. Sperm collection was performed through gentle abdominal massage. Sperm was suspended in different extenders at 1:3 dilution ratio. The motility and survival of sperm cells were assessed in all the treatments daily. Our results indicated that sperm remained as motile in glucose and dimethyl sulphoxide (DMSO) based extender at day 6. This study would be beneficial for cryopreservation and reproduction management.

Keywords: *Oncorhynchus mykiss*, sperm, motility, survival

GİRİŞ

Kısa süreli muhafaza, balık çiftliklerinde ve yetiştiricilik uygulamalarında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir [1]. Özellikle, gamet kalitesi dölleme ve yumurta açılım oranını etkilediğinden dolayı büyük ölçekli kuluçkahanelerde kısa mesafelerde gametlerin taşınmasında büyük önem taşımaktadır [1-6]. Bu yöntemde, sulandırılmamış ya da iyonik/multi-komponent içeren ortam ile sulandırılmış sperm 4°C’de farklı atmosferik koşullarda (O₂ desteği ya da CO₂ varlığı) farklı sürelerle muhafaza edilmektedir [1,2]. Bu yöntemin başarısı, atmosfer kompozisyonu, sulandırıcı içeriği, sulandırma oranı, sıcaklık kontrolü, ilave maddeler (antibiyotik, antioksidan) gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişmektedir [1,2,7].

Gökkuşuğu alabalığı, *Oncorhynchus mykiss*, yetiştiricilik potansiyeli, ekonomik değeri ve tüketici talebinden dolayı dünyada önemli balık türlerinden birisidir. Bu nedenlerden dolayı, bu çalışmada gökkuşuğu alabalığının sperminin kısa süreli muhafazasında farklı sulandırıcıların etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Anahtar (2 yaş ve üstü) Göktepe Alabalık Üretim Tesisi’nden temin edilmiştir. Anahtar 2-fenoksietanol (0.6 ml L⁻¹) ile bayıldıktan sonra abdominal masaj yöntemiyle sperm toplanmıştır. Sperm toplamada, kontaminasyonu ve aktivasyonu önlemek için sperme su, kan, üre ve fekes karışımına dikkat edilmiştir. Sperm 50 ml’lik tüplere sağlanmış ve analiz edilene kadar buz üstünde tutulmuştur.

Sperm örneklerinin makroskobik (sperm rengi ve hacmi) ve mikroskobik (sperm konsantrasyonu ve motilite) analizi yapılmıştır. Motilite (%) Nikon E50i mikroskop (Nikon CI, Tokyo, Japan, Basler A312fc dijital camera, Microptic S.L., Barcelona, Spain) ile Sperm Class Analyser (SCA) programı kullanılarak belirlenmiştir. Sperm motilite süresi ise kronometre ile belirlenmiştir. Motilitesi >80% olan sperm örnekleri denemeler için seçilmiş ve havuz oluşturulmuştur.

Sperm yoğunluğu hemasitometrik yöntemle belirlenmiştir. Spermatokrit Rurangwa et al. [8]’in yöntemine göre belirlenmiştir.

Kısa süreli muhafaza işlemi için, sperm örnekleri 1:3 oranında 5 farklı sulandırıcıyla sulandırılmıştır; 1) Glukoz (0,15 mM), MeOH (%9), 2) Glukoz (0,18 mM), MeOH (%9), 3) Glukoz (0,3 mM), MeOH (%10), yumurta sarısı (%11), 4) Glukoz (0,2 mM), MeOH (10%) ve 5) NaCl (103 mM), KCl (40 mM), CaCl₂ (1 mM), MgSO₄ (0,8 mM), Hepses (20 mM), MeOH (%10), BSA (%1,5), Sukroz (%0,5) ve yumurta sarısı (%7). Sperm, NaCl (52 mM) ile aktive edilmiştir. Sperm örnekleri 4°C’de muhafaza edilmiş ve günlük olarak motilite yüzdeleri ve süreleri takip edilmiştir. Sonuçlar ortalama ± standart sapma (S.D.) olarak sunulmuştur.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Gökkuşuğu alabalığının sperm kalite parametreleri Tablo 1’de sunulmuştur. Taze sperm motilite yüzdesi ve süresi sırasıyla %95,09±0,01 ve 47,02±3,54 s olarak belirlenmiştir.

Table 1. Gökkuşuğu alabalığının sperm kalite parametreleri (ortalama ± SD).

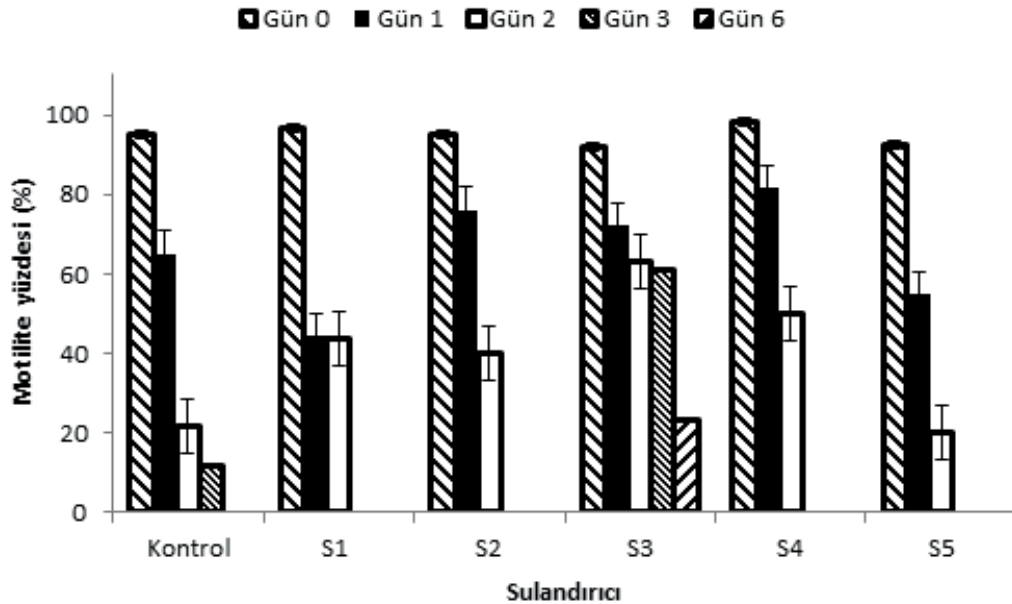
Parametre	Ortalama±SD	Dağılım
Renk	Beyaz	
Hacim (ml)	4,25±1,26	1-6
pH	7,28±0,15	7,25-7,59
Spermatokrit (%)	58,20±2,35	55,00-60,00
Sperm yoğunluğu (×10 ⁹)	8,34±0,34	8,15-8,65

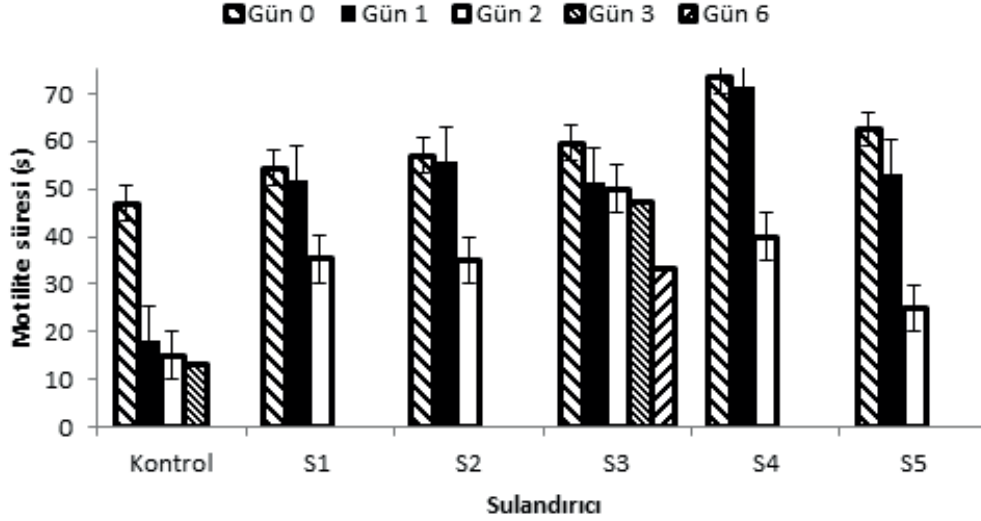
Salmonidlerde sperm kalitesiyle ilgili yapılan çalışmaların karşılaştırılması Tablo 2’de verilmiştir. Bu çalışmadaki sonuçlar önceki çalışmalardan farklıdır. Bu farklılığın sebebi, anacın yumurtlama davranışı ve ekolojisi, boy ve ağırlığı, örnekleme zamanı ve yöntemi olabilir [9-13].

Table 2. Salmonidlerde yapılan çalışmalar

Tür	Sperm hacmi (ml)	pH	Spermatokrit (%)	Sperm yoğunluğu ($\times 10^9$)	Araştırmacı
<i>Oncorhynchus mykiss</i>				8,9	Ciereszko and Dabrowski [14]
<i>Salmo trutta caspius</i>			28,8-45,6	6,02	Hajirezaee ve ark. [15]
<i>Salmo trutta macrostigma</i>	13,93 \pm 0,84	7,53 \pm 0,20	55,6 (24-72)	0,8 – 5,3	Bozkurt ve ark. [16]
<i>Salmo cettii</i>	0,2-5		63,2	6,5-14,7	Iaffaldano ve ark. [17]
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	7,33 \pm 0,18	7,17 \pm 0,34	40,00 \pm 0,18	3,81 \pm 0,24	Kocabaş and Kutluyur [3]
<i>Salmo rizeensis</i>	7,00 \pm 0,25	7,76 \pm 0,22	55,33 \pm 0,24	9,27 \pm 0,56	Kutluyur and Kocabaş [4]
<i>Salmo coruhensis</i>	6,67 \pm 0,53	7,71 \pm 0,14	50,00 \pm 0,35	6,18 \pm 0,52	Kocabaş and Kutluyur [5]
<i>Salmo coruhensis</i>	6,78 \pm 0,12	7,89 \pm 0,14	49,87 \pm 0,24	6,25 \pm 0,29	Kutluyur [19]
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	7,49 \pm 0,36	7,36 \pm 0,24	45,25 \pm 0,39	4,58 \pm 0,22	Kutluyur [19]
<i>Salmo rizeensis</i>	7,25 \pm 0,15	7,80 \pm 0,15		9,67 \pm 0,43	Kutluyur ve ark.[18]
<i>Salmo coruhensis</i>	6,76 \pm 0,23	7,70 \pm 0,12		6,24 \pm 0,22	Kutluyur ve ark. [18]
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	7,35 \pm 0,19	7,27 \pm 0,41		3,95 \pm 0,21	Kutluyur ve ark. [18]
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	8,50 \pm 4,24	7,26 \pm 0,10	31,64 \pm 4,38	7,26 \pm 0,18	Bu çalışma
<i>Salvelinus fontinalis</i>	4,25 \pm 1,26	7,28 \pm 0,15	58,20 \pm 2,35	8,34 \pm 0,34	Bu çalışma

Çalışmada en iyi sonuçlar 3. sulandırıcıdan elde edilmiş ve 6 günden sonra motilite gözlenmemiştir. Motilite süresi ve yüzdesi gün geçtikçe düşmüştür (Şekil 1 ve 2).

**Şekil 1.** Farklı sulandırıcılarla muhafaza edilen gökkuşuğu alabalığının spermının günlük motilite yüzdeleri (%)



Şekil 2. Farklı sulandırıcılarla muhafaza edilen gökkuşağı alabalığının sperminin motilite süreleri (s)

Şimdiye kadar, gökkuşağı alabalığının sperminin kısa süreli muhafazasıyla ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır [12, 20-28]. Sperm oksijen desteğiyle daha uzun süreler muhafaza edilmiştir. Bu çalışmada sperm 6 gün muhafaza edilebilmiş ve bu süre sperm sağlığının sezon sonunda yapılmış olmasından olabilir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, en iyi sonuçlar glukoz ve DMSO bazlı sulandırıcılardan elde edilmiştir. Daha iyi sonuçlar antioksidan, antibiyotik gibi maddelerin sulandırıcılara ilave edilmesiyle elde edilebilir. Bu çalışma, uzun süreli sperm muhafazası çalışmalarını ve anaç yönetimi için yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] Shaliutina A, Hulak M, Gazo I, Linhartova P, Linhart O. 2013. Effect of short-term storage on quality parameters, DNA integrity, and oxidative stress in Russian (*Acipenser gueldenstaedtii*) and Siberian (*Acipenser baerii*) sturgeon sperm. *Animal Reproduction Science*, 139: 127–135.
- [2] Penaranda DS, Marco-Jimenez F, Perez L, Gallego V, Mazzeo I, Vicente JS, Jover M, Asturiano JF. 2010. Evaluation of different diluents for short-term storage of European eel sperm under air-limited conditions. *Journal of Applied Ichthyology*, 26: 659–664.
- [3] Kocabas M, Kutluyer F. 2017a. *In vitro* effect of zinc: Evaluation of the sperm quality of endangered trout *Salmo coruhensis* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and fertilizing capacity. *International Journal of Aquatic Biology*, 3(2): 046-050
- [4] Kocabas M, Kutluyer F. 2017b. Effect of Cobalt on sperm motility in an endangered trout species, *Salmo coruhensis*. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology*, 99(6): 690-694
- [5] Kocabas M, Kutluyer F. 2017c. Dose dependent treatment with boric acid induces more changes in the sperm cells of endangered trout *Salmo coruhensis* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Science and Engineering Research*, 4(9): 475-481.
- [6] Yavas I, Seçer FS, Yavas TK. 2017. Effect of antioxidants on spermatological parameters in two different carp species after short-term storage. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 20(Suppl. 1): 100–104.
- [7] Alavi SMH, Cosson J. 2005. Sperm motility in fish-

es. I. Effects of temperature and pH: a review. *Cell Biology International*, 29: 101–110.

[8] Rurangwa E, Kime DE, Ollevier F, Nash JP. 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, 234: 1–28.

[9] Piironen J, Hyvarinen H. 1983. Composition of the milt of some teleost fishes. *Journal of Fish Biology*, 22: 351–361

[10] Suquet M, Billard R, Cosson J, Dorange G, Chauvaud L, Mugnier C, Fauvel C. 1994. Sperm features in turbot (*Scophthalmus maximus*): a comparison with other freshwater and marine fish species. *Aquatic Living Resources*, 7: 283–294

[11] Suquet M, Dreanno C, Dorange G, Normant Y, Quemener L, Gaignon JL, Billard R, 1998. The ageing phenomenon of turbot, *Scophthalmus maximus*, spermatozoa: effects on morphology, motility and concentration, intracellular ATP content, fertilization and storage capacities. *Journal of Fish Biology*, 32: 31–41.

[12] Tekin N, Secer S, Akcay E, Bozkurt Y. 2003. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen. *Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgah*, 55(3): 208-212.

[13] Kocabas M, Kutluyer F. 2017b. Effect of Cobalt on sperm motility in an endangered trout species, *Salmo coruhensis*. *Bulletin of Environmental Contaminant and Toxicology*, 99(6): 690-694

[14] Ciereszko A, Dietrich GJ, Nynca J, Dobosz S, Zalewski T. 2014. Cryopreservation of rainbow trout semen using a glucose-methanol extender. *Aquaculture*, 420–421: 275–281.

[15] Hajirezaee S, Mojazi Amiri B, Mirvaghefi A, Sheikh Ahmadi A. 2010. Evaluation of semen quality of endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) in different times of spermiation during the spawning season. *Czech Journal of Animal Science*, 55(10): 445–455.

[16] Bozkurt Y, Öğretmen F, Kökçü Ö, Erçin U. 2011. Relationships between seminal plasma composition and sperm quality parameters of the *Salmo trutta macrostigma* (Dumeril, 1858) semen: with emphasis on sperm motility. *Czech Journal of Animal Science*, 56(8): 355–364.

[17] Iaffaldano N, Di Iorio M, Manchisi A, Gibertoni PP, Esposito S. 2016. Semen quality of threatened native population of Mediterranean brown trout (*Salmo cetti*, Rafinesque 1810) in the Biferro River (Molise Region - South

Italy). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Science, 16: 259-266.

[18] Kutluyer F. 2018a. *In vitro* effect of L-tryptophan on the quality and fertilizing capacity of sperms of endangered species of trouts. Pakistan Journal of Zoology, 50(3): 903-910.

[19] Kutluyer F. 2018b. Role of pH on the initiation of sperm motility in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Çoruh trout (*Salmo coruhensis*). Journal of BAUN Institute Science and Technology, XX(X): 1-9. doi: 10.25092/baunfbed.418456.

[20] Pérez-Cerezales S, Martínez-Páramo S, Cabrita E, Martínez-Pastor F, de Paz P, Herráez MP. 2009. Evaluation of oxidative DNA damage promoted by storage in sperm from sex-reversed rainbow trout. Theriogenology, 71(4): 605-613.

[21] Lahnsteiner F, Mansour N, Kunz FA., 2011. The effect of antioxidants on the quality of cryopreserved semen in two salmonid fish, the brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Theriogenology, 76(5): 882-890.

[22] Pourkazemi M, Shakibi Daryakenari A, Kalbasi M, Abdolhay H, Baradaran Noveiri S. 2013. Short term preservation of spermatozoa of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). ISFJ, 21(4): 157-164

[23] Sarosiek B, Judycka S, Kowalski RK. 2013. Influence of antioxidants on spermatozoa in the short-term storage of Salmonidae milt. Polish Journal of Natural Science, 28(3): 379-384.

[24] Şahin T, Kurtoğlu İZ, Köse Ö. 2013a. Spermato-logic characteristics and short-term storage of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, sperm. Firat University Journal of Science, 25(1): 77-92.

[25] Şahin T, Kurtoğlu İZ, Balta F. 2013b. Effect of different extenders and storage periods on motility and fertilization rate of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen. Universal Journal of Agriculture Research, 1(3): 65-69.

[26] Aguilar-Juárez M, Ruiz-Campos G, Paniagua-Chávez CG. 2014. Cold storage of the sperm of the endemic trout *Oncorhynchus mykiss nelsoni*: a strategy for short-term germplasm conservation of endemic species. Revista Mexicana Biodiversity, 85(1): 294-300.

[27] Ubilla A, Fornari D, Effer FB, Valdebenito I. 2014. Short-term cold storage of the semen of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) incorporating DMSO in the sperm diluent. Effects on motility and fertilizing capacity. Aquaculture Research, <https://doi.org/10.1111/are.12458>.

[28] Risopatrón J, Merino O, Cheuquemán C, Figueroa E, Sánchez R, Fariás JG, Valdebenito I. 2018. Effect of the age of broodstock males on sperm function during cold storage in the trout (*Oncorhynchus mykiss*). Andrologia, doi: 10.1111/and.12857