BALIK SPERMASININ DONDURULMASI

Ülkemizde bulunan gen kaynakları, herhangi bir şekilde varyasyonun azaldığı durumlarda genetik varyasyonun tekrar sağlanabilmesi ve endemik veya alt türlerin sahip oldukları özel genlerin saklanması amacıyla koruma altına alınmalıdır. Nitekim ekonomik olarak gelişmiş ülkelerin hemen tamamında canlı genetik kaynakların korunmasına yönelik ulusal projeler yürütülerek bu kaynaklar koruma altına alınmaktadır (Ryder et al., 2001; Dobrinsky, 2002; Hiemstra, 2003).

Bu nedenle, önemli gen kaynaklarına sahip olan Türkiye’nin, biyoçeşitliliğini koruması ve gerektiğinde kullanması zorunluluğu bulunmaktadır. Çünkü biyolojik çeşitlilik ekonomik ve genetik zenginliğin bir göstergesi olup tıp, tarım ve endüstride önemli yararlar sağlamaktadır. Aynı zamanda biyolojik çeşitlilik, toplumların ekolojik, kültürel, manevi zenginlikleri ve geçmişleriyle olan bağlantılarının bir göstergesidir. Ancak nüfus artışı ve ekonomik baskı geleneksel tarım sistemlerindeki değişimi hızlandırırken biyolojik çeşitlilik kaybolmaktadır (Soysal 2004; Leibo and Songsasen 2002).

Her ülkenin kendine özgü coğrafik ve iklimsel koşullarına uyum sağlayabilen endemik canlı türleri bulunabilmektedir. Anadolu dağ alabalığı, Türkiye’deki akarsularda bulunan ekonomik öneme sahip doğal balık türlerinden en önemlilerinden birisidir. Anadolu dağ alabalığı, Türkiye’de büyük bir popülariteye sahiptir. Yerel balıkçılık açısından etinin lezzetli olması ve çeşitli hastalıklar için tedavi edici olarak kullanılmasının yanı sıra sportif balıkçılık açısından da büyük öneme sahip bir türdür. Bu nedenle, gökkuşağı alabalığının iki katı fiyata alıcı bulabilmektedir. Anadolu dağ alabalığının bu özellikleri; bulunduğu birçok akarsuda dinamit, el bombası, karpit, elektrik ve ışıkla avcılık gibi yasal olmayan yöntemlerle avcılığını cazip hale getirmiştir (Korkmaz, 2005; Soysal, 2004).

Kryoprezervasyon yöntemlerinin kullanıldığı bir sistem içerisinde, populasyonun sahip olması arzu edilen genetik özellikler nesiller boyunca yeni bireylere aktarılabilmektedir. Mevcut genetik yapının bozulmadan gelecek nesillere aktarılmasını mümkün kılan sperma kryoprezervasyon yöntemi; genetik olarak üstün özelliklere sahip erkek damızlıklardan elde edilecek birey sayısının artırılmasına, genetik materyalin kolay transportuna ve yıl boyunca erkek gamet hücrelerinden faydalanılmasına olanak sağlamaktadır. Bunlara ilave olarak sperma kryoprezervasyonu, erkek bireylerin ekonomik bir şekilde değerlendirilmesine ve sperma gen bankalarının kurulmasına olanak vermektedir.

**2. Temel Bilgiler**

Özellikle üreme döneminde ergin bireyler üzerinde yoğunlaşan aşırı avcılık, populasyona yeni birey katılımının düşük olmasına ve doğal olarak populasyonlarının küçülmesine neden olmaktadır. Ayrıca sulama, içme ve kullanma suyu temini amacıyla doğal habitatı olan akarsuların barajlarla kesilmesi de üreme habitatlarının bozulmasına yol açmaktadır. Anadolu dağ alabalığı benzer habitatta yeterli koruma altında ancak üreme faaliyetini sürdürebildiğinden nesli giderek tükenmektedir (Korkmaz, 2005). Bu nedenle biyolojik gen kaynaklarımızın korunması açısından Anadolu dağ alabalığının sahip olduğu genleri mutlaka muhafaza edilmelidir.

Ülkemizde canlı genetik kaynakların korunmasının gerekli olduğu TÜBİTAK Vizyon-2023 Bilim ve Teknoloji Öngörü Projesi kapsamında belirlenen öncelikli alanlar içerisinde özellikle belirtilmiştir. Yine TÜBA Moleküler Yaşam Bilimleri ve Teknolojileri Öngörü Projesinde (2003-2023) ulusal öncelikli teknoloji alanı olarak belirlenen “Biyoteknoloji ve Gen Teknolojileri” alanı içerisinde “Biyoçeşitlilik Koruma Programı” öncelikli faaliyet alanı olarak tespit edilmiştir.

Yine bu konunun önemi II. Tarım Şurasının 1. Komisyon raporunda da belirtilmiştir (Ertuğrul, 2005). Türkiye, biyoçeşitlilik ve genetik kaynakların korunması ile ilgili uluslar arası anlaşmalara taraftır. Bu anlaşmalardan birisi “BM Biyoçeşitlilik” sözleşmesidir. Aynı zamanda FAO tarafından hayvan genetik kaynaklarının korunması ile ilgili olarak bir “Komisyon” kurulmuş ve hayvan genetik kaynaklarının korunması alanında bir çalışma başlatılmıştır. Hazırlanan bu projenin yürütülecek olması, sözleşmelerden doğan taahhütlerimizin yerine getirilmesine de katkıda bulunacaktır.

Açıklanan nedenlerle ve ülkemizde yapılan öngörü çalışmalarında da belirtildiği gibi ulusal canlı genetik kaynaklarımızın korunması doğrultusunda hazırlanan bu projede, ülkemize özgü doğal bir alabalık türü olan Anadolu dağ alabalığı (*Salmo trutta macrostigma*)’nın türe özgü genetik özelliklerinin korunması amacıyla spermasının dondurulması ana hedeftir.

Bu ana hedefin yanında, dondurulan spermanın bir kısmı çözdürülerek fertilizasyon yeteneğinin araştırılması ve dolayısıyla ülkemizde dondurulmuş alabalık sperması kullanımının işletme koşullarında pratiğe aktarılabilirliği de belirlenmeye çalışılacaktır. Çünkü Türkiye’de çiftlik hayvanlarının yetiştiriciliğinde geniş bir kullanım alanı bulmasına rağmen, balık yetiştiriciliğinde işletme koşullarında dondurulmuş sperma kullanımı ve dondurulmuş sperma kullanarak yeterli düzeyde uygulama ve fertilizasyon başarısına henüz ulaşılamamıştır.

Bu konudaki literatürler incelendiğinde ise çalışmaların çoğunlukla benzer olduğu ve başlıca izlenen yolun spermatozoon aktivasyonundan kaçınarak spermanın uygun bir sulandırıcı ve internal kryoprotektan ile kuru buz (-79 °C) üzerinde yada sıvı azot buharında (-120 °C) dondurulması şeklinde olduğu görülmektedir (Munkittrick ve Moccia 1984; Baynes ve Scott 1987; Akçay ve ark, 2004). Ancak çözüm sonrası motilite ve fertilizasyon oranlarında ise oldukça farklı ve çelişkili sonuçların alındığı dikkati çekmektedir. Bu durumun, spermatozoonların motil kalma sürelerinin çok kısa olması (~1 dk), ozmotik basıncı düşük sıvılarda hareket kabiliyeti kazanması, buna karşın bu sıvılarda hipoozmotik şoka uğraması gibi

nedenlerden kaynaklanabileceği belirtilmektedir (Billard 1992; Cabrita ve ark, 2001a, Tekin ve ark, 2003). Belirtilen nedenler veya diğer faktörler dondurma işlemini zorlaştırmakta ve fertilizasyon oranını etkileyebilmektedir.

Balık spermasının dondurulması için farklı sulandırıcılar ve kryoprotektanlar (DMSO, DMA, Gliserol, Methanol), farklı paketleme yöntemleri (0.25 ve 0.50’lik payet, makrotüp, yassı makrotüp, pellet) ve farklı dondurma yöntemleri (katı CO2 sıvı azot buharı, programlanabilir dondurma makinası) uygulanmıştır (Wheeler ve Thorgard,1991; Piironen 1993; Cabrita ve ark, 1998, 2001b; Labbe ve Maisse, 2001; Babiak ve ark, 2001; Bozkurt ve ark, 2005). Yapılan ilk araştırmalarda basit sulandırıcıların (0.3M Glukoz, 0.6M Sükroz) iyi sonuçlar verdiği, daha sonra yapılan araştırmalarda ise kullanılan kompleks sulandırıcıların daha başarılı olduğu bildirilmiştir (Legendre ve Billard, 1980; Baynes ve Scott 1987). Ayrıca kryoprotektan olarak %5-15 DMSO ve DMA ilavelerinin iyi sonuçlar verdiği belirtilmektedir (Babiak ve ark. 2001).

Balık spermasının dondurulmasında bazı araştırıcılar (Billard, 1992; Holtz,1993) pellet yönteminin iyi sonuçlar verdiğini belirtmesine rağmen bir çok araştırıcı (Cabrita ve ark. 2001b; Labbe ve Maisse 2001), spermayı payetlerde dondurmanın daha avantajlı olduğunu bildirmiştir.

Tekin ve ark. (2007), gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus* *mykiss*) spermasının 0.5 ml’lik payetlerde %15 DMSO+%1 gliserol içeren glukoz solusyonu ile başarılı bir şekilde dondurulabileceğini, ancak yüksek dölverimi elde edebilmek için spermatozoon/yumurta oranlarının araştırılması gerektiğini bildirmişlerdir. Aynı araştırıcılar (Tekin ve ark. 2003) çözüm sonrası fertilizasyon oranını %49.3 olarak belirlemişlerdir. Conget ve ark. (1996) kryoprotektan olarak gliserol, DMSO ve DMSO + sükroz’u karşılaştırdıkları araştırmalarında en yüksek motilite (%63) ve fertilizasyon oranını (%58) DMSO + sukroz ile elde etmişlerdir. Labbe ve Maisse (2001), %10 DMSO içeren Mounib solusyonunda, 0.5 ml’lik payetlerde sıvı azot buharında dondurdukları spermalarda fertilizasyon oranını %31.9 olarak belirlemişlerdir.

**Faydalanılan Literatür**

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.

Babiak I, Glogowski J, Goryczko K, Dobosz S, Kuzminski H, Demianowicz W (2001). Effect of extender composition and equilibration time on fertilization ability and enzymatic activity of rainbow trout cryopreserved spermatozoa. Theriogenology, 56, 177-192.

Baynes, SM and Scott, AP (1987). Cryopreservation of rainbow trout spermatozoa: the influence of sperm quality, egg quality and extender compozition on post-thaw fertility. Aquaculture, 66, 53-67.

Billard, R (1992). Reproduction in Rainbow trout. Aquaculture, 100, 263-298.

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-Bamidgeh, 57 (2): 125-130.

Cabrita E, Alvarez R, Anel L, Rana KJ, Herraez MP (1998). Sublethal damage during cryopreservation of rainbow trout sperm. Cryobiology, 37, 245-253.

Cabrita E, Robles V, Alvarez R, Herraez MP (2001). Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws. Aquacultıre, 201, 301-304.

Conget P, Fernandez M, Herrera G, Minguell J (1996). Cryopreservation of rainbow trout spermatozoa using programmable freezing. Aquaculture, 143, 319-329.

Dobrinsky J.R. (2002). Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. Theriogenology. 57 (1): 285-302.

Ertuğrul, M., Dellal, G., Elmacı, C., Akın A.O., Karaca,O., Altın, Cemal, İ. (2005). Hayvansal gen kaynaklarını koruma ve kullanımı. TMMOB Ziraat Mühendileri Odası, Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik Kongresi, I. Cilt. 275-290.

Geijsen N., Horoschak M., Kim K., Gribnau J., Eggan K. ve Daley G.Q. (2004). Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. Nature; 427:148–154.

Hall, S.S.G. (2004). Livestock biodiversity: genetic resources for the farming of the future. Blackwell Publishing Company.

Hiemstra S.J. (2003). Guidelines for the constitution of national cryopreservation programmes for farm animals (FAO).

Holtz, W. (1993). Cryopreservation of rainbow trout sperm pratıcal recommendations. Aquaculture, 110, 97-100.

Korkmaz, Ş. (2005). Kadıncık deresindeki (Çamlıyayla-Mersin) balık yoğunluğu ve biyoması. Tarım Bilimleri Dergisi, 11 (1): 91-97.

Labbe C and Maisse G. (2001). Characteristics and freezing tolerance of brown trout spermatozoa according to rearing water salinity. Aquaculture, 201, 287-299.

Legendre M and Billard R. (1980). Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep-freezing. Reprod Nutr Develop, 20, 1859-1868.

Munkittrick K.R. and Moccia R.D. (1984). Advances in the cryopreservation of salmonid semen and suitability for a production scale artificial fertilization program. Theriogenology, 21, 645-659.

Piironen J. (1993). Cryopreservation of sperm from brown trout and arctic charr. Aquaculture, 116, 275-285.

Ryder O.A., ve ark. (2001). DNA banks for endangered animal. Science; 288 (5464): 275.

Shivaji S, Kholkute SD, Verma SK, Gaur A, Umapathy G, Singh A, Sontakke S, Shailaja K, Reddy A, Monika S, Sivaram V, Jyotsna B, Bala S, Ahmed MS, Bala A, Chandrashekar BV, Gupta S, Prakash S, Singh L. (2003). Conservation of wild animals by assisted reproduction and molecular marker technology. Indian J Exp Biol. 41(7):710-723.

Soysal I. (2004). Turkiye Yerli Hayvan Genetik Kaynaklarımız. Tekirdağ Ziraat Fakultesi

Tekin, N., S. Seçer, E. Akçay ve Y. Bozkurt(2003). Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen. The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh,55 (3): 208-212.

Tekin, N., S. Seçer, E. Akcay, Y. Bozkurt veS. 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.

Wheeler P.A. and Thorgard G.H. (1991). Cryopreservation of rainbow trout semen in large straws. Aquaculture, 93, 95-100.

http://www.dha.com.tr/balik-spermleri-eksi-196-derecede-dondurulacak\_1211614.html

http://www.iskenderun.org/haberdetails.isk?ID=33854#.WBS62cnIaQE

http://www.sozcu.com.tr/2016/gundem/balik-spermleri-eksi-196-derecede-dondurulacak-1208081/