

DENİZLİ HOROZU SPERMALARININ FARKLI SULANDIRICI VE KRYOPROTEKTANLARLA DONDURULMASI

Ongun KESKİN* Necmettin TEKİN** Nafiz YURDAYDIN*** Murat SELÇUK****

Freezing of Denizli Cock's Semen With Different Diluents and Cryoprotectans

Summary: The aim of this research was to investigate the freezability of Denizli cock's semen using different diluents.

In this experiment, 5 Denizli cocks were treated. During the research, semen was collected from cocks by manual massage method twice in a week. The spermatological characteristics of ejaculates which were collected from cocks are as follows: (1) Ejaculate volume averaged 0.8 ± 0.0 ml., (2) sperm motility 69.0 ± 4.8 (3) sperm concentration $4.2 \times 10^9 / \text{ml} \pm 0.3$ (4) percentage of abnormal sperm $7.9 \pm 1.3\%$ and (5) pH 7.5 ± 0.1 .

Semen from cocks was diluted by skim milk, BPSV and Ringer. Post-equilibration sperm motility (%) was averaged 50.0 ± 5.2 , 58.0 ± 4.9 , 50.0 ± 8.2 respectively for semen diluted with skim milk-1, BPSV-1, Ringer-1, 59.0 ± 5.0 , 60.0 ± 3.0 , 57.0 ± 6.7 respectively with skim milk-2, BPSV-2 and Ringer-2.

Post-thawing sperm motility (%) was recorded as 29.0 ± 4.3 , 26.0 ± 4.0 , 34.5 ± 6.1 respectively for semen diluted with skim milk-1 (Glycerol 5%, DMSO 5%), BPSV-1, Ringer-1, 32.0 ± 3.6 , 36.0 ± 3.0 , 41.0 ± 4.6 respectively with skim milk-2 (Glycerol 5%, DMSO 10%), BPSV-2, Ringer-2.

Post-equilibration percentage of abnormal sperm (%) was averaged 39.5 ± 2.5 , 29.0 ± 3.4 , 43.6 ± 4.4 respectively for semen diluted with skim milk-1, BPSV-1, Ringer-1, 45.0 ± 2.8 , 34.7 ± 2.8 , 48.0 ± 5.1 respectively with skim milk-2, BPSV-2, Ringer-2. Post-thawing percentage of abnormal sperm (%) was recorded as 45.4 ± 4.4 , 55.0 ± 2.2 , 62.7 ± 3.0 , respectively for semen diluted with skim milk-1, BPSV-1, Ringer-1, 51.4 ± 3.8 , 58.2 ± 5.5 , 73.0 ± 4.3 respectively with skim milk-2, BPSV-2 and Ringer-2.

Özet: Bu çalışma, Denizli ırkı horoz spermalarının farklı sulandırıcılar kullanarak dondurulabilirliğini araştırmak amacıyla yapılmıştır.

Çalışmada Denizli ırkı 5 horoz kullanılmıştır. Araştırma süresince spermalar masaj yöntemiyle haftada iki kez alınmıştır. Elde edilen, ejakülatlarda, genel ortalamaları saptanan başlıca spermatolojik özelliklerden ejakülat miktarı 0.8 ± 0.01 ml., spermatozoa motilitesi $\%69.0 \pm 4.8$, spermatozoa yoğunluğu $4.2 \times 10^9 / \text{ml} \pm 0.3$, anormal spermatozoa oranı $\%7.9 \pm 1.3$ ve spermanın pH değeri 7.1 ± 0.1 olmuştur.

Süt-1, BPSV-1 ve Ringer-1 sulandırıcılarıyla ekilibrazyondan sonra ortalama spermatozoa motilitesi (%) sırasıyla 50.0 ± 5.2 , 58.0 ± 4.9 , 50.0 ± 8.2 olurken, Süt-2, BPSV-2 ve Ringer-2 ile 59.0 ± 5.0 , 60.0 ± 3.0 ve 57.0 ± 6.7 değerleri saptanmıştır.

* Dr. A.Ü. Dölerme ve Sun'i Tohumlama A.B.D.

** Prof. Dr. A.Ü. Vet. Fak. Dölerme ve Sun'i Tohumlama A.B.D.

*** Doç. Dr. A.Ü. Vet. Fak. Dölerme ve Sun'i Tohumlama A.B.D.

**** Araş. Gör. A.Ü. Vet. Fak. Dölerme ve Sun'i Tohumlama A.B.D.

Süt-1, BPSV-1 ve Ringer-1 sulandırıcılarıyla çözüm sonu ortalama spermatozoa motilitesi (%) sırasıyla 29.0±4.3, 26.0±4.0, 34.5±6.1 bulunurken, Süt-2, BPSV-2 ve Ringer-2 ile 32.0±3.6, 36.0±3.0 ve 41.0±4.6 kaydedilmiştir.

Ekilibrazyondan sonra ortalama anormal spermatozoa oranı (%) Süt-1, BPSV-1 ve Ringer-1 sulandırıcılarıyla 39.5±2.5, 29.03.4, 43.6±4.4 olurken, Süt-2, BPSV-2 ve Ringer-2 ile 45.0±2.8, 34.7±2.8 ve 48.0±5.1 belirlenmiştir.

Çözüm sonu ortalama anormal spermatozoa oranı (%) Süt-1, BPSV-1 ve Ringer-1 sulandırıcılarıyla 45.4±4.4, 55.0±2.2, 62.7±3.0 saptanırken, Süt-2, BPSV-2 ve Ringer-2 ile 51.4±3.8, 58.2±5.5 ve 73.0±4.3 bulunmuştur.

Giriş

Son yıllarda dünyada bilimsel ve teknolojik gelişmelere paralel olarak tavukçuluk alanında da önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Özellikle, 20. yüzyılın ortalarında başlatılan horoz spermasının kısa süreli kryoconservasyonu çalışmaları ya da dondurularak uzun süre saklanabilmesi gibi biyoteknolojik yöntemler tavuklarda sun'i tohumlamanın başarıyla uygulanmasını sağlamıştır.

Türkiye'de gelişmiş ve modern anlamda bir tavukçuluk sektörünün kurulmasına yönelik ilk çalışmalar, 1930 yılında "Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü"nü kurulması ile başlatılmıştır. 1960'lı yıllardan itibaren endüstriyel tavukçuluğun başlamasıyla devlet çiftliklerine yüksek verimli ırklar getirilmiş, Marmara ve Ege bölgesinde yetiştiricilere dağıtılarak tavukçuluk özendirilmiştir. Türkiye'de ilk yerli hibrit elde etme çalışmaları 1968'de başlatılarak devlet kuruluşlarınca sürdürülmüş ve günümüzde tavukçuluk kârlı bir üretim kolu haline gelmiştir.

Tavukçuluktan bağımsız düşünilemeyecek olan horoz yetiştiriciliği de döllü yumurta elde etme yönüyle ayrı bir önem taşımaktadır. Ancak, tavukçuluk alanındaki gelişmelere karşın, henüz horozların reproduktif özelliklerine ilişkin bilgiler yeterli düzeyde değildir. Hatta ülkemize ait bir ırk olan Denizli horozlarında spermanın dondurulması ve dondurulmuş spermalarla yapılan tohumlamalardan elde edilen dölverimleri de ortaya konmamıştır.

Bugüne kadar sun'i tohumlama ya da biyoteknolojik araştırmalar için deneysel olarak zaman zaman sun'i vajen (10) ve elektroejakülasyon (16) yöntemiyle sperma alınmışsa da günümüzde masaj yöntemi yaygın biçimde uygulanmaktadır (18).

Horoz sperması kısa (41) ya da uzun süreli (22) olarak pellet, payet ve ampul biçiminde başarıyla saklanabilmektedir (14). Bugüne kadar horoz spermasının saklanması Süt, Ringer, BPSV (Blumberger Puterspermaverdünner),

BPSE (Beltsville Poultry Semen Etender), Serum fizyolojik, Lake gibi sulandırıcılar kullanılmıştır (28). Spermanın dondurulmasında sulandırıcının kapsadığı biyokimyasal maddeler kadar, sulandırıcıya katılan kryoprotektanların oranları da önem taşımaktadır. Horoz spermalarının uzun süreli saklanması spermatozoonları soğuk şokuna karşı koruması amacıyla glyserol, DMSO, DMA, ethylene glycol, dimethylformamide gibi kryoprotektanlar tek başına veya birlikte kullanılmaktadır (9). Ancak, yüksek oranlarda kullanılan kimi koruyucular toksik etki göstererek spermatozoa motilitesini düşürürken, kimileri de hücre membranlarına olumsuz etki yaparak spermatozoa morfolojisinin bozulmasına neden olmaktadır.

Değişik kryoprotektanlarla horoz spermalarını donduran Schramm (32), çözüm sonu spermatozoa motilitesini glyserolle %13.2-40.2, ethylene glycolle %18.7-36.3 olarak bulmuştur. Araştırmacı, en yüksek spermatozoa motilitesini (%30-40) %10-20 ethylene glycolle elde etmiştir.

Kimi araştırmacılar (17, 34), horoz spermasının dondurulmasında sulandırıcıdaki glyserol konsantrasyonunun %7 olması halinde en iyi çözüm sonu spermatolojik özellikleri elde ettiklerini söylerken, kimileri de daha yüksek ya da daha düşük oranlardaki glyserolün sonuçları değiştirmediklerini bildirmişlerdir (33, 40).

Terada ve ark. (35) farklı oranlarda glyserol ve DMSO kullanarak horoz spermalarını dondurmışlar, %7'yi aşan konsantrasyonlardaki kryoprotektanların spermatozoa motilitesini düşürdüğünü, anormal spermatozoa oranını artırdığını bildirmişlerdir.

Değişik kryoprotektanlarla horoz spermalarını donduran Westfall ve Harris (40) yüksek konsantrasyonlardaki (%16) glyserolle en yüksek çözüm sonu spermatozoa motilitesi (%63) elde ettiklerini söylemişlerdir.

Horoz spermalarını %5.7'lik glukoz solusyonuyla 1:3 oranında sulandırarak donduran

Watanabe ve Terada (38) çözüm sonu anormal spermatozoa oranını $\%8.4 \pm 2.0$ saptamışlardır.

Beş farklı kryoprotektan bulunduran iki ayrı sulandırıcıyla horoz spermalarını donduran Hübner (14) çözüm sonu $\%10.6-89.3$ arasında değişen anormal spermatozoa oranı kaydetmiştir.

Araştırmacılar (19, 23) horoz spermalarının saklanması sulandırıcının pH'sı ve ozmotik basıncının çözüm sonu spermatolojik özelliklerle spermatozoanın fertilizasyon yeteneğini önemli ölçüde etkilediğini vurgulamaktadırlar. Horoz sperması için en uygun sulandırıcı pH'sını Bogdonoff ve Schaffner (5), 7.0, Pradhan ve Tomar (30) 6.7-7.0 olarak birbirlerine yakın değerler bildirmişlerdir. Masuda ve ark. (26) horoz spermasının dondurulması için optimum sulandırıcı ozmotik basıncını 300-400 mOsm. söylerken, birçok araştırmacının da kendilerinininkine benzer sonuçlar aldıklarını ifade etmişlerdir (11, 20, 27).

Materyal ve Metod

Çalışmada 48 haftalık Denizli ırkı 5 horoz kullanılmıştır. Araştırmanın başlangıcında horozlar 2 hafta süreyle sperma vermeye alıştırmışlardır. Araştırma süresince spermalar masaj yöntemiyle haftada iki kez alınmıştır. Sperma alma yerinde hazırlanan laboratuvarında başlıca spermatolojik özellikler yönüyle incelenen ejakülatlar aynı sperma toplama kadehinde birleştirilerek mix ejakülat elde edilmiştir.

Ejakülat miktarı (ml), sperma toplama kadehinden direkt okunarak belirlenmiştir. Spermatozoa motilitesi (%) lam ısıtma tablalı Phase Contrast mikroskopta 10×40 büyütmede muayene edilmiştir. Spermatozoa yoğunluğu ($\times 10^9$) 0.01 ml. sperma örneği 5 ml. Hayem solusyonunda sulandırılarak hemositometrik yöntemle saptanmıştır. Anormal spermatozoa oranının değerlendirilmesi için yaklaşık 0.5 ml. Hancock solusyonunda fikze edilen sperma, mikroskopun inmersiyon bakısında incelenerek, normal form dışında yapı gösterenler saptanmıştır. Spermanın pH'sı, renk skalası bulunduran pH metre kullanılarak ölçülmüştür (10).

Spermaların dondurulması için Süt, BPSV ve Ringer olmak üzere üç ayrı sperma sulandırıcısı kullanılmıştır. Kryoprotektan olarak her sulandırıcı için $\%5$ glyserol, $\%5$ DMSO ve $\%5$ glyserol, $\%10$ DMSO oranları kullanılarak Süt-1 ve Süt-2, BPSV-1 ve BPSV-2, Ringer-1 ve Ringer-2 olmak üzere altı farklı sulandırma grubu oluşturulmuştur.

Spermatolojik özellikleri saptandıktan sonra altı eşit kısma bölünerek elde edilen split-

ejakülatlar yukarıda kryoprotektan oranları ve rilen sperma sulandırıcılarıyla bir tohumlama dozunda (0.25) 300×10^6 motil spermatozoa bulunduracak biçimde payetlere çekilerek dozlanmış, buzdolabında $+4^\circ\text{C}$ 'da 1 saat ekilibrasyona (Equilibration-Alışım) bırakılmıştır. Ekilibrasyondan sonra spermalar yaklaşık -120°C daki sıvı azot buharında 10 dakika bekletilerek dondurulmuş ve sıvı azot içinde -196°C 'da saklanmıştır.

Ekilibrasyondan sonra her sulandırıcı ve kryoprotektan oranı için spermatozoa motilitesi ve anormal spermatozoa oranı saptanmıştır.

Dondurulmuş spermalarda ise her sulandırıcı ve kryoprotektan oranı için 40°C da 15 saniyede çözülen payetlerden aynı spermatolojik özellikler değerlendirilmiştir.

Bulgular

Çalışmada Denizli horozlarına ait başlıca spermatolojik özelliklerin ortalama değerleri toplam 5 horozda sırasıyla ejakülat miktarında (ml) 0.9 ± 0.0 , 1.4 ± 0.2 , 0.6 ± 0.0 , 0.7 ± 0.0 ve 0.6 ± 0.0 , spermatozoa motilitesinde (%) 77.8 ± 2.2 , 85.0 ± 1.7 , 77.8 ± 4.0 , 52.2 ± 5.5 ve 52.0 ± 10.7 , spermatozoa yoğunluğunda ($\times 10^9$) 4.1 ± 0.3 , 4.0 ± 0.2 , 5.1 ± 0.4 , 4.9 ± 0.4 ve 3.0 ± 0.3 , anormal spermatozoa oranında (%) 5.5 ± 0.4 , 8.7 ± 1.5 , 6.4 ± 1.4 , 4.9 ± 1.0 ve 14.4 ± 2.3 ve spermanın pH değerinde 7.0 ± 0.0 , 7.1 ± 0.1 , 7.1 ± 0.0 , 7.1 ± 0.1 ve 7.1 ± 0.1 bulunmuştur (Tablo 1).

Araştırma süresince elde edilen toplam 47 ejakülatla saptanan spermatolojik özelliklerin genel ortalamaları ise sırasıyla 0.8 ± 0.0 ml., $\%69.0 \pm 4.8$, $4.2 \times 10^9/\text{ml} \pm 0.3$, $\%7.9 \pm 1.3$ ve 7.1 ± 0.1 olarak kaydedilmiştir.

Süt-1, BPSV-1 ve Ringer-1 sulandırıcılarıyla ekilibrasyondan sonra ortalama spermatozoa motilitesi (X) sırasıyla 50.0 ± 5.2 , 58.0 ± 4.9 , 50.0 ± 8.2 olurken, Süt-2, BPSV-2 ve Ringer-2 ile 59.0 ± 5.0 , 60.0 ± 3.0 , 57.0 ± 6.7 saptanmıştır (Tablo 2).

Süt-1, BPSV-1 ve Ringer-1 sulandırıcılarıyla çözüm sonu ortalama spermatozoa motilitesi (%) sırasıyla 29.0 ± 4.3 , 26.0 ± 4.0 , 34.5 ± 6.1 bulunurken, Süt-2, BPSV-2 ve Ringer-2 ile 32.0 ± 3.6 , 36.0 ± 0.3 , 41.0 ± 4.6 kaydedilmiştir (Tablo 3).

Ekilibrasyondan sonra ortalama anormal spermatozoa oranı (%) Süt-1, BPSV-1 ve Ringer-1 sulandırıcılarıyla 39.5 ± 2.5 , 29.0 ± 3.4 , 43.6 ± 4.4 olurken, Süt-2, BPSV-2 ve Ringer-2 ile 45.0 ± 2.8 , 34.7 ± 2.8 , 48.0 ± 5.1 belirlenmiştir (Tablo 2).

Tablo 1. Denizli ırkı horoz ejakülatlarında ortalama spermatozojik değerler.

SPERMA HOROZ	1 $\bar{x} \pm s\bar{x}$	2 $\bar{x} \pm s\bar{x}$	3 $\bar{x} \pm s\bar{x}$	4 $\bar{x} \pm s\bar{x}$	5 $\bar{x} \pm s\bar{x}$	Genel ortalama n $\bar{x} \pm s\bar{x}$
Ejakülat miktarı (%)	0.9±0.0 c	1.4±0.2 d	0.6±0.0 a	0.7±0.0 b	0.6±0.0 a	47 0.8±0.0
Spermatozoa motilitesi (%)	77.8±2.2 a	85.0±1.7 c	77.8±4.0 a	52.2±5.5 b	52.0±10.7 b	47 69.0±4.8
Spermatozoa yoğunluğu (X10 ⁹)	4.1±0.3 b	4.0±0.2 b	5.1±0.4 a	4.9±0.4 a	3.0±0.3 a	47 4.2±0.3
Anormal spermatozoa oranı (%)	5.5±0.4 a	8.7±1.5 b	6.4±1.4 a	4.9±1.0 a	14.4±2.3 c	47 7.9±1.3
pH	7.0±0.0	7.1±0.01	7.1±0.01	7.1±0.1	7.1±0.1	47 7.1±0.1

a, b, c, d: P<0.01 Aynı satırda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arası fark önemi.

Tablo 2. Sulandırılmış horoz spermalarında ekilibasyondan sonra ortalama spermatozojik değerler.

SPERMA SULANDIRICI	SÜT-1 $\bar{x} \pm s\bar{x}$	BPSV-1 $\bar{x} \pm s\bar{x}$	RİNGER-1 $\bar{x} \pm s\bar{x}$	Genel ort. n $\bar{x} \pm s\bar{x}$	SÜT-2 $\bar{x} \pm s\bar{x}$	BPSV-2 $\bar{x} \pm s\bar{x}$	RİNGER-2 $\bar{x} \pm s\bar{x}$	Genel ort. n $\bar{x} \pm s\bar{x}$
Spermatozoa motilitesi (%)	50.0±5.2	58.0±4.9	50.0±8.2	30 52.7±6.1	59.0±5.0	60.0±3.0	57.0±6.7	30 58.7±4.9
Anormal spermatozoa oranı (%)	39.5±2.5	29.0±3.4	43.6±4.4	30 37.4±3.4	45.0±2.8	34.7±2.8	48.0±5.1	30 42.6±3.6

P > 0.05: Grup ortalamaları arası fark önemsiz.

Tablo 3. Dondurulmuş horoz spermalarında çözüm sonu ortalama spermatozojik değerler.

SPERMA SULANDIRICI	SÜT-1 $\bar{x} \pm s\bar{x}$	BPSV-1 $\bar{x} \pm s\bar{x}$	RİNGER-1 $\bar{x} \pm s\bar{x}$	Genel ort. n $\bar{x} \pm s\bar{x}$	SÜT-2 $\bar{x} \pm s\bar{x}$	BPSV-2 $\bar{x} \pm s\bar{x}$	RİNGER-2 $\bar{x} \pm s\bar{x}$	Genel ort. n $\bar{x} \pm s\bar{x}$
Spermatozoa motilitesi (%)	29.0±4.3	26.0±4.0 a	34.5±6.1	30 29.8±4.8	32.0±3.6	36.0±3.0 b	41.0±4.6	30 36.3±3.7
Anormal spermatozoa oranı (%)	45.4±4.4	55.0±2.2	62.7±3.0 a	30 54.4±3.2	51.4±3.8	58.2±5.5	73.0±4.4 b	30 50.9±4.5

a, b: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arası fark önemli (P<0.01).

Tablo 4. Denizli ırkı horoz ejakülatlarında ekilibasyondan sonra ortalama anormal spermatozoa tipleri ve yüzdeleri (%).

SPERMA SULANDIRICI	SÜT-1 $\bar{x} \pm s\bar{x}$	BPSV-1 $\bar{x} \pm s\bar{x}$	RİNGER-1 $\bar{x} \pm s\bar{x}$	Genel ort. n $\bar{x} \pm s\bar{x}$	SÜT-2 $\bar{x} \pm s\bar{x}$	BPSV-2 $\bar{x} \pm s\bar{x}$	RİNGER-2 $\bar{x} \pm s\bar{x}$	Genel ort. n $\bar{x} \pm s\bar{x}$
Akrozom	5.3±1.6	2.6±0.7	3.4±1.0	30 3.8±1.1	11.9±1.6	7.8±1.3	8.1±2.5	30 9.3±1.8
Baş	5.4±1.3	3.4±1.1	5.3±1.4	30 4.7±1.3	3.0±0.7	5.1±1.7	4.2±0.9	30 4.1±1.1
Orta Kısım	28.2±3.4	22.2±4.4	34.5±4.4	30 28.3±4.1	28.7±3.1	21.0±3.7	35.7±5.9	30 28.4±4.2
Kuyruk	0.6±0.2	0.8±0.4	0.4±0.2	30 0.6±0.3	1.4±0.6	0.8±0.5	0.0±0.0	30 0.7±0.4

Çözüm sonu ortalama anormal spermatozoa oranı (%) Süt-1, BPSV-1 ve Ringer-1 sulandırıcılarıyla 45.4±4.4, 55.0±2.2, 62.7±3.0

saptanırken, Süt-2, BPSV-2 ve Ringer-2 ile 51.4±3.8, 58.2±5.5, 73.0±4.3 bulunmuştur (Tablo 3).

Tablo 5. Denizli ırkı horoz ejakülatlarında çözüm sonu ortalama anormal spermatozoa tipleri ve yüzdeleri (%).

SULANDIRICI SPERMA	SÜT-1 $\bar{x} \pm s\bar{x}$	BPSV-1 $\bar{x} \pm s\bar{x}$	RİNGER-1 $\bar{x} \pm s\bar{x}$	Genel ort. n $\bar{x} \pm s\bar{x}$	SÜT-2 $\bar{x} \pm s\bar{x}$	BPSV-2 $\bar{x} \pm s\bar{x}$	RİNGER-2 $\bar{x} \pm s\bar{x}$	Genel ort. n $\bar{x} \pm s\bar{x}$
Akrozom	8.8±2.6	4.2±2.3	3.4±0.5	30 5.5±1.8	8.9±1.7	21.5±6.0	10.1±1.2	30 13.5±3.0
Baş	15.7±2.8	39.8±4.3	4.4±0.9	30 20.0±2.7	13.0±3.7	25.0±5.1	6.9±1.2	30 15.0±3.3
Orta Kısım	20.0±2.1	9.1±2.8	47.7±8.3	30 25.6±4.4	28.4±2.2	11.3±1.9	55.8±5.1	30 31.8±3.1
Kuyruk	0.9±0.4	1.9±0.9	7.2±7.2	30 3.3±2.8	1.1±0.4	0.4±0.2	0.2±1.3	30 0.6±0.6

Toplam 5 horozun mix ejakülatlarında anormal spermatozoa tiplerinden akrozom, baş, orta kısım ve kuyruğa ait bozuklukların ortalama değerleri Tablo 4 ve 5'de verilmiştir.

Tartışma ve Sonuç

Araştırmada, 48 haftalık Denizli ırkı horozlardan öğleden sonraları alınan ejakülatlarda başlıca spermatolojik özellikler değerlendirilmiştir. Tavuklar öğleden sonra geç saatlerde çiftleşme isteği gösterdiklerinden, horozdan spermanın alınması ve sun'i tohumlama için en uygun zaman bu saatlerdir (29). Üstelik öğleden sonra horozlarda sperma miktarı en yüksek seviyeye ulaşır (21) ve tavuklar öğleden sonra tohumlandığında fertilite daha yüksektir (15).

Çalışma süresince toplam 47 ejakülatta değerlendirilen başlıca spermatolojik özelliklerden ejakülat miktarı, spermatozoa motilitesi, spermatozoa yoğunluğu ve anormal spermatozoa oranı yönüyle horozlar arasında gözlenen farklılıklar önemli ($P < 0.01$) bulunurken, sperma pH'sı yönüyle bireylerarası farklılıklar önemsiz ($P > 0.05$ kaydedilmiştir (Tablo 1).

Bu araştırmada saptanan başlıca spermatolojik özelliklere ilişkin değerler büyük ölçüde fizyolojik sınırlar içinde kalmıştır. Değişik sulandırıcıların ayrı ırktan horozlarda (2), farklı amaçlarla (8) yaptıkları araştırmalarda elde edilen benzer (36) ya da değişik (28) sonuçlar çalışma koşullarından ileri gelebilecek ve normal sayılabilecek olgular olarak görülmüştür.

Değişik sperma sulandırıcılarının benzer spermatolojik özelliklere farklı etkilerinin büyük ölçüde yapılarında buldukları maddelerden kaynaklandığı, bir ölçüde de sulandırıcılara katılan kryoprotektanlar ve bunların oranlarının önem taşıdığı bilinmektedir (12). Ayrıca sulandırıcının bileşimindeki biyokimyasal maddeler ve kryoprotektanlar sulandırıcının ozmotik basıncını ve pH'sını değiştirmektedir. Horoz sperması çok az şeker içerdiğinden, horoz spermasının saklanması sulandırıcıya fruktoz eklenir (6). Bunun yanında sulandırıcıda sülfat

iyonlarının bulunması, sulandırıcının ozmotik basıncını kontrol eder ve spermatozoanın özellikle başında oluşabilecek morfolojik değişiklikleri önler. Ayrıca sulandırıcının albumin kapsamı horoz spermatozonun oksijen alımını artırır. Glutamik asit ozmotik basıncı düzenleyerek spermatozoanın invitro yaşam süresini uzatır ve fertiliteyi olumlu yönde etkiler (23, 30). Kalsiyum iyonları ise horoz spermatozoasının motilitesini düzenlemektedir (1). Sözü geçen biyokimyasal maddeler çalışmada kullanılan sulandırıcıların bileşiminde bulunmaktadır.

Horoz spermatozoası için gerekli bu maddeler sulandırıcıda bulunsun bile pH'sı 6.5'dan düşük hiçbir sulandırıcı %50 spermatozoa motilitesini 36.8 saatten fazla koruyamaz. Horoz spermatozoasının saklanması en uygun sulandırıcı pH'sı 6.7-7.0 ve ozmotik basıncı 300-400 mOsm. olarak saptanmıştır (22, 30). Sunulan çalışmada her sulandırıcının pH'sı ayrı ayrı ölçülmüş ve süt sulandırıcısı için 6.5, BPSV için 6.7 ve Ringer için 6.5 değerleri saptanmıştır. Sulandırıcıların pH'sı horoz spermasının dondurulması için istenen ölçüler içindedir.

Çalışmada farklı konsantrasyonlarda glyserol ve DMSO bulunduran Süt, BPSV ve Ringer sulandırıcılarıyla ekilibrazyondan sonra sulandırıcıların ve kryoprotektanların spermatozoa motilitesi ve anormal spermatozoa oranı üzerine etkisinde gözlenen farklılıklar önemsiz ($P > 0.05$) kaydedilmiştir. Ancak birinci grup sulandırıcılarla (%5 glyserol, %5 DMSO), ekilibrazyondan sonra ve çözüm sonu spermatozoa motilitesi ve anormal spermatozoa oranının ikinci grup sulandırıcılardan (%5 glyserol, %10 DMSO) daha düşük olduğu gözlenmiştir (Tablo 2, 3).

Genel olarak spermatozoa anomalilerinin sulandırıcının ozmotik basıncındaki değişikliklerden kaynaklandığı bilinmektedir. Bununla beraber spermatozoa morfolojisindeki bozukluklar daha çok sulandırıcının bileşimi, kryoprotektanların niteliği ve oranı ile ilgilidir. Spermatozoanın değişik kısımlarında gözlenen

bozukluklara birbirinden bağımsız faktörler neden olmaktadır. Horoz spermatozonunun dondurma ve çözme işlemlerine en duyarlı kısmı plazma membranı ile orta kısımdır ve başlıca bozukluklar plazmalemmada meydana gelir (4, 13). Plazma membranını koruması yönüyle glyserol, diğer kryoprotektanlardan DMSO ve ethylene glycole daha üstün bulunmuştur (24). Horoz spermatozoasında meydana gelebilecek akrozom bozuklukları, dondurma işlemlerinin neden olduğu hasarın bir göstergesidir (39). Akrozom bozuklukları sulandırıcıdaki glyserolden kaynaklanan yüksek ozmotik basınca bağlı olarak artmaktadır (3, 25). Bu çalışmada glyserole ilişkin bir sonuç verememekle birlikte, DMSO'nun yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığı sulandırıcılarla daha düşük konsantrasyonlara göre sırasıyla ekilibasyon sonrası (%9.3±1.8 ve %3.8±1.1) ve çözüm sonu (%13.5±3.0 ve %5.5±1.8) akrozom bozukluklarının oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir. Çözüm sonu başa ait bozukluklar ise BPSV-1 ve BPSV-2 sulandırıcılarıyla (%39.8±4.4 ve %25.0±5.1) diğer sulandırıcılarla karşılaştırıldığında daha yüksek çıkmıştır (Tablo 4, 5).

Spermatozoanın orta kısım bozuklukları da kryoprotektanların değerlendirilmesi için önemli bir kriterdir (24). Çünkü horoz spermatozoonunda tipik anomali orta kısımda gözlenir ve kıvrık boyun olarak adlandırılır (42). Genel olarak kıvrık boyunlu spermatozoa oranının artmasına 5°C da saklanan spermalarda klorid iyonlarının zararlı etkisi neden olmaktadır (7). Kıvrık boyunlu spermatozoa oranının artması, fertilitenin düşmesine yol açmaktadır (31). Kimi araştırmacılar (37) spermada kıvrık boyunlu spermatozoa oranının %15'i geçmemesi halinde fertilitenin etkilenmeyeceğini %37'ye çıkması ile dölvriminin düşeceğini söylemişlerdir. Maeda ve ark. (24) DMSO'nun spermatozoonunda orta kısmı koruması özelliğinin glyserol, methylformamid ve ethylene glycole göre daha zayıf olduğunu söylemişler ve farklı kryoprotektanların spermatozoonun değişik kısımlarına farklı koruyucu etki gösterdiğini iddia etmişlerdir. Bu çalışmada da, DMSO konsantrasyonu yüksek (%10) sulandırıcılarla dondurulup çözülen spermatozoonlardaki orta kısım bozuklukları daha yüksek saptanmıştır. Her iki kryoprotektan oranı için Ringer sulandırıcısı ile orta kısım ait bozuklukların diğer sulandırıcılarla karşılaştırıldığında yüksek olduğu gözlenmiştir. Ringer'in spermatozoonun orta kısmını koruması yönüyle daha zayıf bir sulandırıcı olduğu söylenebilir. Ayrıca, birinci grup sulandırıcılarla çözüm sonu orta kısım bozuklukları (%25.6±4.4) ikinci grup sulandırıcılara göre (%31.8±3.1) daha düşük saptanmıştır (Tablo 5).

Bu araştırma ile optimum koşullar sağlanmakla birlikte, horoz spermasının dondurulmasındaki başarıyı, çalışmada kullanılan sulandırıcıların bir ölçüde etkilediği ancak, kryoprotektan konsantrasyonlarının daha önemli olduğu ortaya konmuştur. Çözüm sonu spermatozoa özelliklerinin değerlendirilmesiyle düşük oranlarda (%5) kullanılan DMSO'nun yüksek (%10) konsantrasyonlarına göre daha üstün olduğu gözlenmiştir.

Kaynaklar

1. Ashizawa, K., Wishart, G.J. (1986): *Fowl sperm motility stimulating factors taken from seminal plasma and female peritoneal fluid taken at the time of ovulation*. Dev Growth Differ Suppl. 116.
2. Bakst, M.R. (1980). *Fertilizing capacity and morphology of fowl and Turkey spermatozoa in hypotonic extender*. J Reprod Fertil 60: 121-127.
3. Bakst, M.R., Howarth, B. (1977): *The effect of glycerol and its removal on cock spermatozoa concanavalin ferritin binding sites*. Poult Sci, 56 pp.1318-1323.
4. Bakst, M.R., Sexton, T.J. (1979): *Fertilizing capacity and ultrastructure of fowl and turkey spermatozoa before and after freezing*. J Reprod Fertil, 55: 1-7.
5. Bogdonoff, P.D., Shafner, C.S. (1954): *The effect of pH on in vitro survival metabolic activity and fertilizing capacity of chicken semen*. Poult Sci., 33 pp.665-669.
6. Bootwalla, S.M., Miles, R.D. (1992): *Development of diluent for domestic fowl semen*. World's Poult Sci 48, July.
7. Chaudhuri, D., Lake, P.E. (1988): *A new diluent and method of holding fowl semen for up to 7 hour at high temperature*. 18 th World's Poult Congr, Nagoya, 591-593.
8. Davtyan, A. (1984): *Dilution, storage and transport of cock semen*. Pitsevodstvo, 7: 23.
9. Dawe, Y.M., Ansah, G.A., McNiven, M.A., Buckland, R.B.N. (1986): *N, N-dimethylacetamide as a cryopreservative compound for chicken spermatozoa*. In Res Repor Dep Anim Sci McGill Univ, Montreal, Canada, 45-47.
10. Fomin, A., Scherbatov, V. (1989): *Semen collected from cocks using an artificial vagina*. Pitsevodstvo, 7: 26-28.
11. Graham, E.F., Brown, K.I. (1971): *Effect of osmotic pressure of semen extenders on the fertility and hatchability of turkey eggs*. Poult. Sci. 50: 836-838.
12. Günter, A. (1986): *Motilität und Kopfkappenintegrität von aufgetautem Kaninchensperma in Vater-Söhne-Vergleich*. Tierarztl Hochshule Diss, Hannover.
13. Harris, G.C. Jr., Thurston, R.J., Gundall, I. (1973): *Changes in the ultrastructure of the fowl spermatozoon due to rapid freezethaw*. J Reprod Fertil, 34: 389-394.
14. Hübner, R. (1990): *Investigations on the assesment of fertility following AI with frozen fowl and turkey semen*. Reich Agrar, 39: 335-342.
15. Johnston, N.P., Parker, J.E. (1970): *Effect of time of oviposition in relation to insemination fertility of chicken hens*. Poult Sci, 49: 325-327.
16. Kono, K., Hiura, Y. (1983): *Semen collection by rectal electroejaculation in the domestic fowl*. Jpn. Poult Sci, 20: 267-270.
17. Krivtsova, E.B., Otpushchennikov, V.F. (1983): *The role of diluents and cryoprotektans in the cryopreservation*

- of cock semen. Byull. Vses. Nauchno-Isslovatel skogo Ins Fiz Biok Pit Sel skok Zhivot, 17: 57-59.
18. Kunev, K., Manoly, I. (1988): Age and seasonal dynamics of semen production in NewHampshire cocks. Zhivotnov dni Nauki 25: 18-24.
 19. Kurbatov, A.D., Narubina, L.E., Bubyayeva, G.B. and Ivanov, I. (1976): Freezing cock sperm in liquid nitrogen. In VIII th Int Congr Anim Reprod Artif Insem, Krakow, July, 12-16.
 20. Kurbatov, A.D., Voronina, M.S. (1982): Effect of holding and equilibration time on sperm motility and fertilizing ability of frozen fowl semen. Byull Vses Nauchno-Issledovatel'skogo Is Razvedeniya Gen Sel'skok Zhivot, 57: 17-20.
 21. Lake, P.E., Wood-Gush, D.G.M. (1956): Diurnal rhythms in semen yields and mating behavior in domestic cock. NATUA. 178-853.
 22. Lake, P.E., Ravie, O. (1979): Effect on fertility of storing fowl semen for 24 hr at 5°C in fluids of different pH. J Reprod Fertil 57: 149-155.
 23. Li, S.R., Graham, E.F. (1986): Effect of different treatments on cock semen stored at 5°C. Sci Agri Sin, 3: 83-89.
 24. Maeda, T., Terada, T. and Tsutsumi, Y. (1984): Comparative study of the effects of various cryoprotectants in preserving the morphology of frozen and thawed fowl spermatozoa. Br Poult Sci 25: 547-553.
 25. Marquez, B.J., Ogasawara, F.X. (1977): Effects of glycerol on turkey sperm viability and fertilizing capacity. Poult Sci 56: 725-731.
 26. Masuda, H., Soejima, A. and Waide, Y. (1974): Study on the deep freezing preservation of the chicken spermatozoa. Byull Nat Ins Anum Ind, 28: 33-40.
 27. Nagae, T., Tanaka, K. (1975): Storage of fowl semen under reduced pressure. Jpn. Poult Sci 12: 259-264.
 28. Ohara, M., Ozeki, T. Tamura, C. Takahashi, T. and Kusakari, N. (1990): Effects of insemination dose and re-dilution rate on the fertility of fowl semen frozen in Hiroshima diluent. Jpn. Poult Sci 27: 403-408.
 29. Ottinger, M.A., Schleidt, W.M. and Russek, E. (1982): Daily patterns in courtship and mating behavior in the male Japanese quail. Behav Proces, 7: 223-233.
 30. Pradhan, P.K., Tomar, N.S. (1987): Preservation of liquid poultry semen. Indian Vet J, 64: 403-407.
 31. Saeki, Y. (1960): Crooked-necked spermatozoa in relation to low fertility in the artificial insemination of fowl. Poult Sci 39: 1354-1361.
 32. Schramm, R. (1975): Studies on long-term preservation of cock semen of medium-heavy breeds in liquid nitrogen using the straw method. Monatsh Veterinaarmed 30: 941-944.
 33. Schuster, S., Lalblin, C. (1979): Comparative investigations on the freezing of cock semen. Zuchthygiene, 14: 81.
 34. Terada, T. (1983): Effects of the addition of semen plasma to a semen diluent on post-thawing sperm motility and abnormalities in cocks. Jpn Poult Sci, 20: 15-20.
 35. Terada, T. Hashimoto, H. Maeda, T. Watanabe, M. and Tsutsumi, Y. (1988): Influence of cryoprotectants concentration on cell volume and motility of frozen-thawed fowl spermatozoa. Jpn. Poult Sci, 25: 268-277.
 36. Tereschenko, A.V., Linnik, T.P. and Shyrov, V.L. (1988): The effect of cryoprotectants on heat absorption by a suspension of cock spermatozoa. In Sosto prespec raz biotek zhivot, Krakow, 21-22 sentyabrya.
 37. Van Wambeke, F. (1977): The effect of toxicity of storage media for fowl semen on the occurrence of neck-bending spermatozoa and hatchability. Br Poult Sci, 18: 163-168.
 38. Watanabe, W., Terada, T. (1976): A new diluent for deep freezing preservation of fowl spermatozoa. In VIII the Int Congr Anim Reprod Artif Insem, Krakow, July, 12-16.
 39. Watson, P.F. Martin, I.C.A. (1972): A comparison of changes in the acrosomes of deep-frozen ram and bull spermatozoa. J Reprod Fertil 28: 99-101.
 40. Westfall, F.D., Harris, G.C. Jr. (1975): The ability of cryopreservatives to prevent motility loss and freeze-thaw damage to the acrosome of chicken spermatozoa. Cryobiology, 12: 89-92.
 41. Wishart, G.J. (1989): Physiological changes in fowl and Turkey spermatozoa during in vitro storage. Br Poult Sci, 30: 443-454.
 42. Yamane, J., Tsukunaga, S. and Takahashi, T. (1966): "Hiroshima" method of artificial insemination of the domestic fowl. J Fac Fish Anim Hub. Hiroshima Univ 6 pp. 395-429.