

DENİZ BALIKLARINDA SPERMA, YUMURTA VE EMBRİYO DONDURULMASI (DERLEME)

(Cyopreservation of sperm, egg and embryo in marine fish)
(A review)

Erkut Derviř ÖZGÖRAY¹

Ergun AKÇAY¹

¹ Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama ABD Dışkapı/Ankara.

Geliř Tarihi: 24.04.2009

Kabul Tarihi: 16.06.2009

ÖZET

Sperma, yumurta ve embriyonun dondurularak saklanması ve kullanılması birçok canlı türünde uygulanmaktadır. Akuakültürdeki türlerde ise son yıllarda kullanımı giderek artmaktadır. Balık spermasının başarılı bir şekilde dondurulması ilk kez 1953 yılında Blaxter tarafından ringa balığında denenmiş olup, bu güne kadar yaklaşık 50 deniz balığı türünde uygulanmıştır. Sperma türe bağlı olarak 0°C'nin altındaki saklama koşullarında birkaç saat ile birkaç gün arasında canlı kalabilmektedir. Dondurulmuş sperma teorik olarak yıllarca zararlı etki olmaksızın saklanabilmektedir. Spermanın dondurulmuş olarak kullanılmasının balık kültüründe birçok avantajı vardır. Enfeksiyonların yayılma riskini azaltma, hibrid (melez) yavru elde etme, istenen karakterler elde etme, istenen karakterlerde seleksiyon yaparak bir örneklilik oluşturmak gibi avantajlara sahiptir. Bu derlemede deniz balıklarında sperma, yumurta ve embriyo dondurulmasıyla ilgili bilgiler ele alınmıştır.

Anahtar kelimeler: Deniz balıkları, Embriyo, Kriyoprezervasyon, Sperma, Yumurta

SUMMARY

Sperm, egg and embryo cryopreservations have been widely used in so many species. These applications have been also used in aquaculture species in recently. First successful fish sperm cryopreservation was made by Blaxter in 1953 in herring fish. After this, marine fish sperm cryopreservation has been attempted about 50 species. Under 0°C conditions, spermatozoa can be stored for a few hours up to several days, depending on the species. Cryopreserved gametes can be theoretically stored for many years without deleterious effect. In aquaculture use of cryopreserved spermatazoa has lots of advantages such as reduction of disease transition risk, attainment hybrid larvae, selection for desirable characters for similar fishes. In this article, sperm, egg and embriyo cryopreservation in marine fish were reviewed.

Keywords: Cryopreservation, Egg, Embryo, Marine fish, Sperm

GİRİŞ

Kontrollü balık üretimi, hayvansal protein ihtiyacının karşılanabilmesi için günümüzde oldukça büyük boyutlara ulaşmıştır. Balıkların genetik potansiyeli, türlerin ve soyların birleştirilmesi ve gamet manüplasyonları yoluyla ıslah edilebilmektedir. Bu uygulamaların bazıları gamet hücrelerinin saklanması (prezervasyon) gerektirir. Balık spermasının dondurulması ilk kez 1953 yılında Blaxter tarafından ringa balığında denenmiş olup, günümüzde birçok balık türü spermasının dondurulması (kriyoprezervasyon) yapılabilmektedir. Özellikle çipura, levrek, alabalık ve sazan gibi ekonomik değeri yüksek olan balıkların spermasının saklanması oldukça önemlidir (1).

Sperma, yumurta ve embriyonun dondurularak saklanması ve kullanılması birçok canlı türünde uygulanmaktadır. Bugüne kadar yaklaşık 30 deniz balığı türünde uygulanmıştır. 0°C'nin altındaki saklama koşullarında sperma türe bağlı olarak birkaç saat ile birkaç gün arasında canlı kalabilmektedir. Dondurulmuş sperma ise teorik olarak 200 – 32000 yıl zararlı etki olmaksızın saklanabilmektedir (30). Balıklarda spermanın dondurularak saklanması bazı avantajları bulunmaktadır;

1-Melezleme çalışmalarının, üreme mevsimi farklı türler arasında yapılmasını sağlar.

2-Mevcut spermanın tümünün dondurulmasını sağlar. Bu durum özellikle spermanın eldesi zor olan türler ve tutsak

olarak yaşadığı için sperma eldesi düşük olan türler için (Japon yılan balığı, *Anguilla japonica*) önem taşımaktadır.

3-Üreme mevsimi dışında yavru elde etmek için sıcaklık ve fotoperiyod gibi senkronizasyon çalışmalarının sadece dişilere uygulanarak işletme giderlerinin azalmasını sağlar.

4-Gamet taşınmasını kolaylaştırır. Özellikle farklı yerlerden toplanan yumurta ve sperma için önem taşımaktadır. Aynı zamanda doğal hayattaki genlerin kuluçkalara aktarımını kolaylaştırır.

5-Sperma yaşlanmasını önler. Üreme sezonu boyunca sperma kalitesi çeşitlilik göstermesi nedeniyle, kriyoprezervasyon uygulanacak spermaların en yüksek kalitede olanlardan seçilebilmesine olanak sağlar.

6-İstenilen karakterler elde etmeyi ve istenen karakterlerde seleksiyon yaparak birörneklilik oluşturmayı kolaylaştırır.

7-Gen kaynaklarının korunmasında kullanılır (13, 30).

SPERMANIN ALINMASI VE DEĞERLENDİRİLMESİ

Erkek balıklardan spermanın sağılması büyük çoğunlukla “abdominal masaj” ile yapılmakla beraber “hava basıncıyla sağım” ve “emme sistemiyle sağım” gibi farklı teknikler de kullanılabilir. Sağımdan önce balıklar chlorbutanol, phenoxyethanol veya tricaine methane-sulphonate (MS-222) ile anesteziye alınabilir. Ancak sağım için anestezi mutlaka gerekli bir işlem değildir.

Genital kanal ile üriner kanalın yakınlığından dolayı sperma sıklıkla idrar ile kontamine olmaktadır. Kalkanda (*Scophthalmus maximus*) yapılan bir çalışmada kontaminasyonun %15,3 olduğu gözlenmiştir. Spermaya idrar karışması spermatozoonun motilitesini, hızını, dölleme kapasitesini ve donma kabiliyetini olumsuz etkilemektedir. Spermaya idrar veya mukusun karışması osmolaritenin ve pH'nın düşmesine neden olur. Levrek gibi yüksek spermatozoon yoğunluğuna sahip balıklarda idrar kontaminasyonu renk değişikliğinden ve viskoziteden dolayı çok kolay tespit edilebilmektedir. Kontaminasyonu önlemek için katater uygulaması yapılabilir (7, 8, 14, 30). Cabrita ve ark.'nın (8) yaptığı çalışmada, çipura spermanın kalite sınırlarını osmolaritesi için 363-408 mOsm/kg ve motilitesi için ise %75-100 arası olarak belirtmektedir. Barbato ve ark.'nın (3) yaptığı bir çalışmada ise çipura (*Sparus aurata*) için spermatozoon yoğunluğu ortalama $15-19 \times 10^9$, aynı aileden (*Sparidae*) sivriburun karagöz (*Diplodus puntazzo*) için $17-19 \times 10^9$ ve levreklerde (*Dicentrarchus labrax*) ise spermatozoon yoğunluğu $40-60 \times 10^9$ arası olabileceği belirtmişlerdir. Bir balık için tespit edilmiş en yüksek spermatozoon yoğunluğuna (60×10^9) üreme sezonunun ortasında rastlandığı bildirilmiştir (14).

Üreme sezonunun başında, sonuna göre daha uzun süre spermatozoon aktivitesi korunmaktadır (6, 30). İntratestikuler maturasyon, idrar kontaminasyonu ve spermatozoon yaşlanması sperma kalitesini etkileyen önemli faktörlerdendir (30). Testis

içi gamet yaşlanması birçok balık türünde gözlenmekte ve özellikle üreme sezonunun sonunda sperma kalitesini olumsuz etkilemektedir. Yaşlanan spermatozoonun yapısındaki değişiklikler, elektron mikroskobu ile gözlenmektedir. Dondurulacak spermada dikkat edilecek hususlar; intratestiküler yaşlanma, üre karışması ve spermatozoonların yaşlanması olarak belirtilmektedir. Bu faktörler taze spermanın kalitesini de etkiler. Dondurulmak üzere alınan spermanın 3 faktör (testis içi yaşlanma, idrarla kontaminasyon, spermatozoon yaşlanması) yönünden dikkatle incelenmesi gerekir (30).

Analizlerin yapılabilmesi için natif sperma öncelikle 1:100 oranında spermayı aktive etmeyen bir solüsyonla sulandırılır ve daha sonra yapay deniz suyu 1:10 oranında ilave edilerek spermatozoonlar aktive edilir (7, 14) ve mikroskop altında motilite, canlılık, yoğunluk gibi kimi spermatolojik parametreler belirlenir.

SPERMANIN SULANDIRILMASI VE DONDURULMASI

Balıklarda dondurulmuş sperma ile yeterli düzeyde ve standart bir fertilizasyon oranına henüz ulaşamamıştır. Yapılan çalışmalar da, çoğunlukla benzer olup, başlıca izlenen yol spermatozoon aktivasyonundan kaçınarak, uygun bir sulandırıcı ile spermanın sulandırılması, kriyoprotektan eklenmesi ve dondurma ile çözme sırasında oluşabilecek zararlara karşı koruyucu olarak albumin, lesitin ve yumurta sarısı katılmasıdır. Kullanılan yöntemlerde, spermanın ısısının düşürülmesi ve dondurulması işlemleri

birbirinden çok farklı değildir. Balık spermaları genellikle kuru buz üzerinde pellet biçiminde ya da nitrojen buharında payetlerde dondurulmaktadır (1,18). Deniz balıklarının spermalarının dondurmaya karşı daha dayanıklı olduğu, bunun da nedenin spermatozoon membranındaki kolesterol/fosfolipit oranının yüksek olması ve başlangıçtaki ATP içeriğinin olduğu düşünülmektedir. Yine soğuğa karşı dirençte deniz balıklarının spermatozoon membranında bulunan fosfatil kolinin etkili olabileceği vurgulanmıştır (15, 30).

Başarılı bir cryoprezervasyonda sulandırıcının bileşimi ve dondurma yöntemi önemli rol oynar. Balık spermasının prezervasyonu üzerine yapılan çalışmalarda dondurulmuş spermanın fertilizasyon kapasitesinin taze spermadan daha düşük olduğu saptanmıştır. Balık spermatozoa'sının suda aktive olması ve bu aktivitenin 50 saniye ile 2 dakika arasında sınırlı olması balık spermasının kriyoprezervasyon işlemlerini oldukça güçleştirmektedir. Bu nedenle en uygun kriyoprezervasyon yöntemi seçilmeli ve işlemler arasındaki süre minimum tutulmalıdır. Balık sperması pellet, payet ve ampullerde dondurulabilmektedir. Bazı araştırmacılara göre balık spermasının dondurulması için en uygun yöntemin pellet yöntemi olduğunu, bazı araştırmacılar ise payetlerde dondurulan spermadan daha başarılı sonuçlar alındığını bildirmiştir. Araştırmacılar arasındaki farklı sonuçların nedeni olarak çalışmadaki balık türlerinin, kullanılan sulandırıcının ve dondurma

yöntemlerinin farklı olması öne sürülmektedir (7, 13, 18, 32).

Balık spermatozoonlarının küçük yapısından dolayı sulandırma sonrasında penetrasyon hızlıca meydana geldiğinden ekilibrasyon (alışım) safhasına ihtiyaç bulunmamaktadır. Ekilibrasyon aşamasının uygulanmaması kriyoprotektanların toksik etkilerini de minimize etmektedir. Çipuralarda yapılan çalışmada, DMSO katılan spermaların 2 dakikadan fazla ekilibrasyona bırakıldığında dölleme oranlarının daha düşük olduğu gözlenmiştir (6,19). Gliserol kullanılan sulandırıcılarda ise ekilibrasyon aşamasının uygulanması gerektiği bildirilmektedir, nedeni ise gliserolün penetrasyonunun yavaş gerçekleşmesidir (30).

Bir türün spermasını dondurmak için ideal prosedürü belirlemek kolay değildir. Dondurmanın başarısı etkileyen birçok faktör vardır. Bu faktörler sulandırma, kriyoprotektan, ekilibrasyon süresi, sulandırma oranı, soğutma oranı, çözdürme sıcaklığı ve süresi, çözdürme sonrası aktive edilene kadar geçen süre ve bazı diğer faktörler olarak belirtilmektedir. Bir diğer önemli faktör ise spermanın alındığı zaman olarak belirtilmektedir (28, 30).

Özellikle *Serranidae* ailesine bağlı birçok türde görülen protoginus hermafroditlik, yani dişi olarak puburtaya ulaşp 3-5 yaşına kadar dişi kalmaları, spermanın dondurulmasını daha önemli kılmaktadır. Erişkin teleost balıklarının erkekleri yılda canlı ağırlığının her kilogramına 10^{10} ile 10^{12} arası spermatozoon

verebilmektedir. Yaşça ileri ve tecrübeli erkeklerden daha geç olanlara oranla; miktar, kalite, yoğunluk ve fertilizasyon kabiliyeti daha yüksek sperma elde edilmektedir (11).

Mounib sulandırıcısı (10,01 mg/ml KHCO_3 , 1,99 mg/ml azaltılmış glutatyon, 42,78 mg/ml sukroz, 10 mg/ml BSA, 10% dimetil sülfoksit, pH 7,8; osmolarite 310 mOsm/kg) birçok tatlı su ve deniz balıklarında başarıyla uygulanmaktadır. Sulandırma oranı 1:1 ve 1:20 arasında değişmektedir. Sulandırma oranı arttırılan çalışmalarda motilite oranı ve süresi düşmüştür. Sulandırma oranı arttığı zaman oluşan hasarın nedeni, seminal plazma proteinlerinin yüksek sulandırma oranında koruyuculuğunun azalması olarak gösterilmektedir. Seminal plazma proteinlerinin bu özelliği sadece tatlı su balıklarında ve gökkuşağı alabalığında bildirilmektedir (15,21).

Gadus morhua ve *Melanogrammus aeglefinus* sperması (mezgitgiller) tuz veya sukroz ağırlıklı sulandırılırken, dimetil sülfoksit (DMSO), propilen glikol (PG) ve gliserol kriyoprotektan olarak kullanılabilir. Rideout ve ark., (2004) kriyoprotektanların, sulandırmanın ve spermanın alınma zamanındaki değişimlerin, kriyoprezervasyon üzerine etkilerini araştırmışlar ve propilen glikolün, gliserol ve DMSO'dan daha başarılı sonuçlar verdiğini, fakat dondurma kalitesini sperma alma zamanı kadar etkilemediğini bildirmişlerdir. Aynı araştırmada, üreme sezonunun sonlarında alınan spermanın dondurmaya karşı çok dayanaksız olduğu bir kez daha

vurgulanmıştır. Bu dönemde alınan spermalara katılan kriyoprotektanların etkilerinin çok azaldığı belirtilmiştir. Aynı araştırmacılar, kriyoprotektanların, çözündürme sonrası 0 ile 30 dk içinde aktive edilen sperma motilitesine önemli bir etki yapmadığı fakat 60 dk sonra aktive edilen spermanın motilitesinde ise önemli bir düşüş gözlemlendiği, DMSO ve gliserolde ise tersi olmasına rağmen çözündürülen spermaların mümkün olan en kısa sürede kullanılması gerektiğini bildirmişlerdir.

Mercan (*Pargus major*) sperması üzerine yapılan bir çalışmada (21), birçok sulandırıcı; Cortland, Ringer, Hanks dengeli tuz solüsyonu (HBSS), modifiye Mounib mediyumu (MMM), Mounib mediyumu (MO) ve Tuzlu Mounib mediyumu(MNM) denenmiş olup çözüm sonu en iyi motilite Cortland ve HBSS sulandırıcılarına %15 DMSO katılarak elde edilmiştir. Taze sperma ile dondurulmuş sperma arasında motilite, fertilizasyon ve kuluçka çıkış oranları açısından önemli fark bulunamamıştır. Miyaki ve ark. (2005) serranidae ailesine ait *Epinephelus moara* türünde yaptığı çalışmada sulandırıcı olarak sadece trehalose solüsyonu kullanılmasının basit, kolay uygulanabilir ve güvenilir bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir.

SPERMANIN DONDURULMASI

Kriyoprezervasyon işleminin spermatozoa üzerine birçok olumsuz etkisi vardır. Özellikle, sperma kalitesinin düşmesi, dölleme yeteneğinin azalması ve larval sağ kalma oranında düşme en önemli olumsuzluklardır. Dondurulmuş spermanın taze sperma ile benzer fertilizasyon ve yakın

motilite oranına sahip olduğu tespit edilmiştir (31). Dondurulmuş spermada hem viabilite (canlılık) oranı düşmüş, hem de spermatozonların fonksiyonları azalmıştır. Bunun nedenleri arasında soğuk şokuna uğramaları, osmotik strese maruz kalmaları ve hücre içi kristalizasyon gösterilebilir (7, 10, 13).

Spermanın dondurulması sırasında genellikle iki yöntem kullanılmaktadır: 1- Spermanın sıvı nitrojen buharı (LN₂) ile dondurulması; 2 – Kuru buz (katı CO₂) ile dondurulması. Azot buharı ile dondurmada soğutma oranı azotun konduğu kaba bağlı olarak sıvı seviyesine olan uzaklığa bağlıdır. Kuru buz ile dondurmada ise yaklaşık olarak dakikada 35°C olarak hesaplanmıştır.

Çipura spermasını dondurma esnasında soğutma oranları ile ilgili çalışmada 1°C'den 100°C'e kadar 6 grup arasından, dakikada 10°C düşürülmesinin en iyi sonucu verdiği belirtilmiştir (5). Levrekte ise Barbato ve ark.ları (1996) 10°C/dk soğutma oranı kullanmalarına rağmen, Fauvel ve ark. (1998), 65°C/dk soğutma oranının daha başarılı olduğunu bildirmişlerdir. Kalkan balığında ise 99°C/dk soğutma oranı daha başarılı bulunmuştur (12).

SPERMANIN ÇÖZDÜRÜLMESİ VE TOHUMLAMADA KULLANILMASI

Çözdürme aşamasının hızlı geçilmesi kristalizasyonu önlemek için gereklidir. Çözdürme ısısı levrek spermasında 35°C/dk, çipura spermasında 26°C/dk olarak uygulama alanı bulmuştur (3,15). Mercan (*Pargus*

major) türünde ise en iyi çözdürme sıcaklığının 40°C/dk olduğu belirtilmiştir (21).

Spermatozoon yoğunluğu ortalama 50×10^9 spz / ml olan levrek sperması, yaklaşık olarak 100000 yumurtayı (yaklaşık 100 ml) dölleyebilmektedir. Aynı sayıdaki yumurtaları dölleyebilmek için 400 µl taze spermadan elde edilmiş 1,2 ml dondurulmuş sperma kullanılabilir (15). Cabrita ve ark. (2005a) çipuralar üzerine yaptığı çalışmada, natif sperma (%77) ve dondurulmuş sperma (%75) arasında fertilitate farkı olmadığını ortaya koymuştur.

Tohumlama için öncelikle 2 ml (ortalama 2000 adet) yumurta 10 ml'lik behere alınır. 20 µl taze sperma BSA ile zenginleştirilmiş aktive etmeyen sulandırıcı ile istenilen oranda sulandırılır. Ardından yavaşça karıştırılır, bazı araştırmacılar karıştırmak için kuş tüyü kullanılabileceğini belirtmektedir. Son olarak spermatozoonların aktivasyonu ve yumurtaların şişmesi için 1 ml %0.37'lik filtre edilmiş deniz suyu eklenir. Spermatozoonların yumurtaları döllemesi için 3 dk beklenir. Ardından cam şişelerde deniz suyu içerisinde erken embriyonik dönem geçirmesi sağlanır (14).

YUMURTA VE EMBRİYO DONDURULMASI

Denizlerdeki balık popülasyonundaki aşırı düşüşünün ihtiyaç haline getirdiği balık yumurta ve embriyolarının saklanması son yıllarda araştırılmaya başlanmıştır. Yumurta üzerine yapılan çalışmalarda dondurma başarısının çok düşük olması, araştırmacıları

embriyo ve embriyonun ileri safhalarını araştırmaya itmiştir. Balık embriyo kriyoprezervasyonu çok kompleks bir işlem olup; hücre içi ve dışı sıvı değişimini, sıcaklığın embriyo üzerine etkisini içermektedir (4, 27). Embriyonun dondurma işlemi birçok farklı parametrelere dayanmakta ve bu parametrelerin bir bütün olarak algılanması ve çok dikkatli çalışılması gerektiği bildirilmektedir. Dondurma ve çözündürmede sıcaklık değişim oranları önemli faktörler olup, yavaş dondurma sırasında kriyoprotektan etkinliğine bağlı hücre dehidrasyonu çok önemli bir noktadır (22). Balık embriyoları iki seçici geçirgen kompartmandan oluşan kompleks bir yapıya sahiptir. Bu kompartmanlardan biri yumurta sarısı, diğeri de blastodermdir. Hagedon ve ark. (1997) yumurta sarısını saran zarın kriyoprotektanların yumurta sarısına etkimesine engel olan ana bariyer olduğunu belirtmişlerdir. Bazı araştırmacıların bildirdiği gibi (17, 34) embriyo kriyoprezervasyonu için anahtar nokta embriyo geçirgenliğidir.

Embriyonun dondurulması gen bankası oluşturulması açısından büyük fayda sağlamaktadır. Mümkün olan en küçük alanda babadan (paternal) ve anadan (maternal) olan genetik materyalin taşınması ve saklanması gibi önemli bir avantaja sahiptir. Aynı zamanda transgenik ve melez türler üretilmesine olanak sağlamaktadır. Balık üretim çiftliklerinde doğal şartlarda yılda bir kez yavru alınırken, embriyo dondurulmasında başarıya ulaşılması halinde yıl boyunca yavru alınabilmesi ile üretimin artabileceği

bilinmektedir. Başarılı bir embriyo kriyoprezervasyonu aynı zamanda doğada türü tehlike altında olan canlılar için de hayati öneme sahiptir. Başarılı bir embriyo dondurulması kuluçkahanelerde kullanılacak damızlık balıkların sayısını azaltarak işletme giderlerini düşürecektir. Sonuçta hastalıklara direnç ve reproduktif açıdan üstün bireylerin yetiştirilmesinin önü açılmış olacaktır (17, 26).

EMBRİYO DONDURULMASINDA UYGULANAN YÖNTEMLER

Son on yıl içinde yapılan yoğun araştırmalara karşın, başarılı bir balık embriyo kriyoprezervasyonu sağlanabilmiş değildir. Balık spermasının dondurulmasındaki başarı, oosit ve embriyoda elde edilememiştir. Balık embriyolarındaki yumurta sarısı hacminin fazla oluşu ve düşük membran geçirgenliği, su çıkışı ve kriyoprotektanların penetrasyonunu azaltmaktadır. Başka bir deyişle; kriyoprezervasyon başarısını engelleyen iki ana bariyer vardır:

1-Düşük membran geçirgenliği, suyu materyalden uzaklaştırmakta ve kriyoprotektif ajanların penetrasyonunu önlemektedir.

2-Oositin ve erken embriyonik dönemde yumurta sarısının büyük bir kütleyle sahip olması su aktivitesinin düşürülmesini önlemektedir.

Bu nedenlerden dolayı dondurma sırasında oluşan buz kristalleri oosit ve embriyoya zarar vermektedir. Bu durum araştırmacıları 3 yeni yaklaşıma sevk etmiştir (9).

1-Embriyoların bulunduğu ortamların modifikasyonu ve ultrason ile manüple edilerek geçirgenliğin artırılması,

2-Yumurta sarısı kütesine mikro manipülasyon ile direkt modifikasyon,

3-Streskobi yöntemi ile embriyoların geçirgenlik analizi.

Balık embriyosunun dondurmaya karşı hassasiyetine rağmen vitrifikasyon yöntemi en umut verici yöntem olarak görülmektedir (33). Yapılan bazı çalışmalar ışığında, balık embriyosunun yavaş dondurmaya uygun olmadığı anlaşılmıştır (16). Bu yüzden vitrifikasyon yönteminin araştırılması önem kazanmıştır. Bu yöntem memelilerde başarı ile kullanılmaktadır. Vitrifikasyonda kullanılan solüsyonlar yüksek miktarlarda kriyoprotektan içermekte ve genellikle moleküler ağırlığı yüksek, dondurmaya karşı koruyucu ajanlar kullanılmaktadır (9).

Kriyoprotektanların toksik etkisi, kullanılacak konsantrasyonun sınırlarını belirler ve dondurmaya karşı koruyucu özelliğini sınırlar (2). Buna göre toksik seviyeler, embriyonun gelişim aşamasına ve türe göre değişmektedir. Bu yüzden türe özgü dondurma prosedürü oluşturulması gerekmektedir (9). Balık embriyosunun dondurulması üzerine yapılan çalışmalar çoğunlukla tatlı su balıklarında uygulanmıştır (Zebra balığı). Robles ve ark.'nın (2004) yaptığı çalışmada vitrifikasyon ile dondurulan kalkan balığı embriyolarının zebra balığı embriyolarına kıyasla daha az hücresel zarar gördüğü bildirilmiştir.

Çipuranın embriyo büyüklüğü kalkan balığı embriyosu ile aynı büyüklükte olup, döllenmiş yumurtaların inkube edilmesi için 19°C'de dakikada 200 ml deniz suyu değişimi kullanılır. Embriyo gelişimi G (kuyruk lekeli) yada F (kuyruk lekeli kaybolması) safhasına kadar gözlenir ve yaklaşık 24-36 saattir. Cabrita ve ark. (9) çipura embriyoları üzerine yaptıkları bir çalışmada, embriyoların G (ileri safha) safhasında tüm internal kriyoprotektanlara yüksek konsantrasyonda bile direnç gösterdikleri, kriyoprotektan konsantrasyonu ve temas süresi uzadıkça (10dk'dan-30dk'ya) kontrol grubuna göre kuluçka başarı oranının düştüğünü gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada Etilen glikol 10 dk'lık temas süresinde, embriyo tarafından aynı konsantrasyondaki diğer kriyoprotektanlara göre en fazla tolere edilebilen kriyoprotektan olmuştur. DMSO ise 4 M üzeri konsantrasyonda en toksik ve kuluçka oranı en düşük kriyoprotektan olmuştur. Embriyonun F safhası için etilen glikol ve 1,2-propanediol benzer toleransta olup, methanoldan daha az toksik etki göstermiştir. Aynı araştırmacılar DMSO tabanlı vitrifikasyon solüsyonunun (PVP, sukroz) ileri dönemlerde (G safhası) kuluçka oranını etkilemediğini, EG tabanlı solüsyonların ise daha toksik olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan vitrifikasyon deneyleri sonucu 1 ml'lik makro tüpler daha başarılı bulunmuştur. Çözüm sırasında ise birkaç saniyeliğine tekrar kristalizasyon gözlemlendiği ve bunun yumurta sarısında beyaz bir alan olarak görüldüğü belirtilmiştir.

Kriyoprotektif ajanların spesifik miktarlarda olması, dondurma işleminin başarısı için kritik öneme sahiptir. Eşit olmayan ve tamamlanmayan penetrasyon embriyo için öldürücü etkiye neden olabilmektedir (4). Bazı araştırmacılar, balık embriyosunun farklı katmanlarını geçmek için mikroenjeksiyonun en etkin yol olduğunu belirtmektedirler (20, 29). Bu teknik gen çalışmalarında; gen transferi sırasında ve genetik mühendisliği ile üretilen türlerde de kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak zebra balığı embriyolarından (*Danio rerio*) yumurta sarısının kısmi olarak alınması ve kalkan balığı (*Scophthalmus maximus*) embriyolarındaki antifiriz proteinlerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (29).

Ayrıca embriyo dondurulmasında membranlar arası geçirgenliği arttırmak için ultrason kullanılabilceği bildirilmiştir (23). Yapılan çalışmalarda ultrasonun düşük frekansla muamelesinde embriyonun absorpsiyonunun arttığı belirtilmiştir. Bununla birlikte ultrason çalışmalarında, geçirgenlik oranını ve kriyoprotektanların lokalizasyonunun nasıl sağlanacağını çalışılması ve geliştirilmesi gerektiği belirtilmiştir.

Elektroprosyon ise, lipid katmalarındaki tek katlı geçirgenliği tersine çevirebilen elektiriksel bir fenomen olarak tanımlanmıştır. Elektroprosyon aynı zamanda elektro-osmosis yolu ile membranlar arası moleküler geçişi de değiştirmektedir (23).

SONUÇ

Deniz kültür balıkçılığı Türkiye ve Dünya'da yükselen bir değer haline almış, gelişmekte olan ülkelerin en önemli geçim kaynaklarından olan balık ihracatını karşılamak için hızla gelişmekte ve büyümektedir. Bu büyüme ve üretim artışının devamı için birçok bilimsel çalışma yapılmış olmasına karşın, Türkiye'de gereken önem ve kapasiteye ulaşamadığı bilinmektedir. Balıkçılığının insanlar için önemli bir protein kaynağını olduğunu vurgulayarak, Türk Veteriner Hekimleri tarafından da gereken önem ve bilimselliğe dikkat çekmek amacıyla, günümüzde deniz kültür balıkçılığının en önemli türleri olan, yüksek ekonomik değere sahip balıkların gametlerinin dondurularak saklanması bir zorunluluk haline almıştır.

Genel olarak deniz balıklarında dondurulmuş-çözdürülmüş spermanın motilitesi tatlı su balıklarına kıyasla çok yüksektir. Deniz balıklarındaki çözüm sonu %80-95 motilite oranları beklenen oranlarda etki göstermekte ve yüksek dölleme oranları görülmektedir.

Balık embriyosunun dondurulması, sperma dondurulmasından çok daha karmaşık ve ilgi çekici olmasına rağmen günümüzde başarılı sonuçlar alındığı söylenemez. Hangi kriyoprotektanın hangi konstarasyonda kullanılacağı, difüzyon katsayısı, toksik seviyesi, muamelenin süresi, donmaya karşı duyarlılık, uygun vitrifikasyon solüsyonlarının formüle edilmesi, dondurma ve çözündürme sıcaklıklarının türlere göre değişmesi başarıyı düşük tutmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Akçay E, Tekin N, Seçer S (1995) *Balık spermasının prezervasyonu*. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi, 12 (3-4) 367-373.
2. Arakawa T, Carpenter J F, Kita YA, Crowe JH (1990) *The basis for toxicity of certain cryoprotectants: a hypothesis*. Cryobiology, 27, 401-415.
3. Barbato F, Canese S, Moretti F, Misiti S (1996) *Notes on a cryopreservation technique for gilthead sea bream sperm*. In: Proceeding of the Commission C2, Refrigeration and Production, International Symposium Froid et Aquaculture', p. 21. Bordeaux.
4. Bart AN (2000) *New approaches in cryopreservation of fish embryos*. In: Tiersch, T.R., Mazik, P.M. (Eds.), Cryopreservation in Aquatic Species. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, pp. 179-187.
5. Billard R (1978) Changes in structure and fertilizing ability of marine and fresh water fish spermatozoa diluted in media of various salinities. Aquaculture 14, 187-198.
6. Billard R, Dupont J, Barnabé G (1977) Diminution de la motilité et de la durée de conservation du sperme de *Dicentrarchus labrax*, L., (poisson téléostéen) pendant la période de spermiation. Aquaculture 11, 363-367.
7. Cabrita E, Robles V, Cuñado S, Wallace JC, Sarasquete C, Herráez MP (2005a) *Evaluation of gilthead sea bream, Sparus aurata, sperm quality after cryopreservation in 5ml macrotubes*. Cryobiology, 50: 273-284.
8. Cabrita E, Robles V, Cuñado S, Wallace J C, Sarasquete C, Herráez M P (2005b) *Evaluation of DNA damage in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) and gilthead sea bream (Sparus aurata) cryopreserved sperm*. Cryobiology, 50, 144-153.
9. Cabrita E, Robles V, Wallace JC, Sarasquete M C, Herráez M P (2006) *Preliminary studies on the cryopreservation of gilthead seabream (Sparus aurata) embryos*. Aquaculture, 251:245- 255.
10. Chambeyron F, Zohar Y (1990) A diluent for sperm cryopreservation of gilthead seabream, *Sparus aurata*. Aquaculture, 90: 345-352.
11. DeGraaf J D, King W V, Benton C, Berlinsky DL (2004) *Production and storage of sperm from the black sea bass Centropomus striata L*. Aquaculture Research, 35:1457-1465.
12. Dreanno C, Suquet M, Quemener L, Cosson J, Fierville F, Normant Y, Billard R (1997) *Cryopreservation of turbot (Scaphthalmus maximus) spermatozoa*. Theriogenology, 48:589-603.
13. Fabbrocini A, Lavadera L, Rispoli S, Sansone G (2000) *Cryopreservation of sea bream (Sparus aurata) spermatozoa*. Cryobiology, 40:46-53.
14. Fauvel C, Savoye O, Dreanno C, Cosson J, Suquet M (1999) *Characteristics of sperm of captive sea bass in relation to its fertilization potential*. Journal of Fish Biology, 54:356-369.
15. Fauvel C, Suquet M, Dreanno C, Zonno V, Menu B (1998) *Cryopreservation of sea bass (Dicentrarchus labrax) spermatozoa in experimental and production conditions*. Aquatic Living Resources, 11:387-394.
16. Hagedorn M, Peterson A, Mazur P, Kleinhans FW (2004) *High ice nucleation*

- temperature of zebrafish embryos: slow-freezing is not an option.* Cryobiology, 49:181–189.
17. **Hagedorn M, Hsu E, Kleinhans F W, Wildt DE** (1997) New approaches for studying the permeability of fish embryos: toward successful cryopreservation. Cryobiology, 34:335–347.
 18. **Holtz W** (1993) Cryopreservation of rainbow trout sperm practical recommendations. Aquaculture, 110:97-100.
 19. **Jamieson BGM** (1991) Fish evolution and systematics: Evidence from spermatozoa. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 1-319.
 20. **Janik M, Kleinhans F W, Hagedorn M** (2000) Overcoming a permeability barrier by microinjecting cryoprotectants into zebrafish embryos (*Brachydanio rerio*). Cryobiology, 41:25–34.
 21. **Liu q, Li J, Zhang S, Xu F, Ding F, Xiao Z, Xu S** (2006) *An Efficient Methodology for Cryopreservation of Spermatazoa of Red Seabream, Pargus major, with 2-ml Cryovials.* Journal of the World Aquaculture Society, 37, No:3.
 22. **Longzhen Z, Xianting L, Dachun L, Songlin C, Jianping F** (1992) *Effects of several factors on the survival rate of fish embryos pre cryopreservation.* Changjiang Fisheries Institute. Chinese Academy of Fisheries Institute, Shashi, Hubei, China, pp. 1–11.
 23. **Mitragotri S, Blankschtein D, Langer R** (1995) Ultrasound-mediated transdermal protein delivery. Science, 269:850–853.
 24. **Miyaki K, Nakano S, Otha H, Kurokura H** (2005) Cryopreservation of kelp grouper *Epinephelus moara* sperm using only a trehalose solution. Fisheries Science, 71:457-458.
 25. **Mounib MS** (1978) *Cryogenic Preservation Of Fish And Mamalian Spermatozoa.* Journal Of Reproduction And Fertility, 53:13–18.
 26. **Rana K** (1995) *Preservation of gametes* In: Broodstock Management and Egg and Larval Quality. N. R. Bromage and R. J. Roberts, editors. University Press, Cambridge, England, pp. 53–75.
 27. **Rawson DM, Zhang T** (2005) *New approaches to the cryopreservation of fish oocytes and embryos,* Erişim: <http://www.fao.org/biotech/docs/rawson.pdf> Erişim tarihi:1.11.2007.
 28. **Rideout RM, Trippel EA, Litvak MK** (2004) The development of haddock and Atlantic cod sperm cryopreservation techniques and the effect of sperm age on cryopreservation success. Journal of Fish Biology, 65:299-311.
 29. **Robles V, Cabrita E, Cunãdo S, Herra´ez, MP** (2004) Effect of a vitrification protocol on the LDH and 6GPDH activities and the hatching rates of zebrafish and turbot embryos. Theriogenology, 61:1367– 1379.
 30. **Suquet M, Dreanno C, Fauvel C, Cosson J, Billard R** (2000) *Cryopreservation of sperm in marine fish,* Aquatic Research, 31:231–243.
 31. **Suquet M, Omnes MH, Normant Y, Fauvel C** (1992) Assessment of sperm concentration and motility in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Aquaculture, 101:177–185.

- 32. Wheeler PA, Thorgard GH** (1991) Cryopreservation of rainbow trout semen in large straws. *Aquaculture*, 93:95 – 100.
- 33. Zhang T, Rawson DM** (1996) Feasibility studies on vitrification of intact zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. *Cryobiology*, 33:1–13.
- 34. Zhang T, Rawson DM** (1998) Permeability of dechorionated one cell and six-somite stage zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos to water and methanol. *Cryobiology*, 37:13–21.