

SÜTLÜ SULANDIRICILARA FARKLI YUMURTA SARISI İLAVELERİNİN ERİTME SONRASI SPERMATOLOJİK ÖZELLİKLERE VE FERTİLİTEYE ETKİLERİ

(Effects of the addition of different egg yolk
amountsto skimmilk extenders on post-thaw
spermatological characteristics).

Kemal AK*

Adnan ÖZKOCA*

Kamuran İLERİ*

Haluk MOĞOLKOÇ**

SUMMARY

In this study, the bull semen collected from 5 Holstein bulls were extended with skimmilk which contained 0 %, 5 %, 10 % and 20 % egg-yolk and frozen in straws. Before freezing and post-thawing, motility and morphological abnormal rates were examined, and determined as similar. Fertility rates gained from 220 inseminations were not different among extenders. The difference was not important statistically.

ÖZET

Araştırmada kullanılan Holstein ırkı 5 boğanın sperması % 0, % 5, % 10 ve % 20 yumurta sarısı içeren yagsız süt ile sulandırıldı ve payet yöntemine göre donduruldu. Dondurma öncesi ve sonrasında saptanan motilite ve morfolojik bozukluklar benzer bulundu. Toplam 220 tohumlama sonrasında fertilitte (30 - 60 günde % N.R.R.) açısından sulandıcılara göre önemli bir fark bulunmadı.

* : İ. Ü. Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, 34851, Avcılar / İSTANBUL

** : Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, İstanbul İl Müdürlüğü.

GİRİŞ

İnek sütünün boğa sperma sulandırıcısı olarak kullanılabilmesine dair ilk bilimsel rapor 1950 yılında Michaliov tarafından yayınlanmıştır (10). Sitratlı sulandırıcılarda yumurta sarısının yararlı etkisini ise 1939 yılında Philips bildirmiştir (9). Günümüze kadar yapılan çok sayıda araştırmada, yumurta sarısında bulunan Phospholipid ve Lecithin gibi kryoprotektif maddelerin donma ve erime anında hücreleri koruduğu ortaya konmuştur (4, 6, 7). Bu nedenle sütlü sulandırıcılara yumurta sarısı ilavesi yaygın olarak kullanılmaktadır (2, 3, 6, 12). Ancak kimi çalışmalarda süte yumurta sarısı ilave etmeksizin hazırlanan sulandırıcılarla eritme sonrası değişik başarı oranları elde edilebilmiştir (1, 3, 7, 11).

Foote ve Arriola (3), yağsız sütlü sulandırıcıyla işlem görmüş boğa sperması ile % 73.4 fertilite elde ettiklerini, sulandırıcıya % 10 yumurta sarısı ilavesinde % 65.8 fertilite oranı bulduklarını bildirmişlerdir. Graffer (5), süt tozu - yumurta sarısı - fruktoz sulandırıcısı ile sütlü sulandırıcılarda benzer fertilite oranları bulmuşlardır (% 63.97 - % 66.40).

Jeyendran ve Memon (6), hemojenize süte % 20 yumurta sarısı ilavesinin eritme sonrası motilite ve morfolojik bütünlüğe olumlu etki yaptığını, ancak tohumlamalar sonrası yumurta sarısı içermeyen hemojenize sütlü sulandırıcıda daha yüksek fertilite oranı bulduklarını bildirmişlerdir. Araştırmacılar sütlü sulandırıcılara yumurta sarısı ilavesinin fertiliteyi azalttığını açıklamışlardır.

MATERYAL VE METOT

Çalışmada, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, İstanbul İl Müdürlüğünde bulunan 5 Holştein boğa kullanıldı. Sun'i vajen yardımıyla boğaların herbirinden 4 adet olmak üzere toplam 20 ejakulat alındı.

Alınan ejakulatlar 32 °C' deki ben-marey'e konuldu ve hacim, konsantrasyon, motilite ve spermatozoit morfolojisinden oluşan spermatozoit testler uygulandı. Motilite ısıtma tablalı faz-kontrast mikroskopta incelendi. Spermatozoit konsantrasyonu elektrofotometre'de saptandı. Spermatozoit morfolojisinde formol-tuz solusyonundan yararlanıldı (2). Morfolojik incelemeler faz-kontrast mikroskopta gerçekleştirildi.

Spermatozoit testlerden sonra her ejakulat 4 eşit hacime ayrıldı ve her hacim değişik oranlarda yumurta sarısı içeren gliserolsüz sulandırıcılarla işlem gördü. Yaklaşık 2 saat sürede 5 °C' a soğutulan sulandırılmış spermalara 5' er dakika aralıklarla ve 10 eşit hacimde gliserollü sulandırıcılar ilave edildi. Gliserolizasyon sonrası finalde % 0, % 5, % 10 ve % 20 yumurta sarısı içeren sulandırıcılar elde edildi (Sulandırıcı 1, 2, 3, 4).

Gliserolizasyon Sonrası Final Sulandırıcılar:

Sulandırıcı 1 (Yumurta Sarısız)

Gliserol	6.0 g.
Yağsız Süt +	100.0 ml.

Sulandırıcı 2 (%5 Yumurta Sarılı)

Gliserol	6.0 g
Yumurta Sarısı	5.0 ml.
Yağsız Süt +	100.0 ml.

Sulandırıcı 3 (% 10 Yumurta Sarılı)

Gliserol	6.0 g
Yumurta Sarısı	10.0 ml.
Yağsız Süt +	100.0 ml.

Sulandırıcı 4 (% 20 Yumurta Sarılı)

Gliserol	6.0 g
Yumurta Sarısı	20.0 ml.
Yağsız Süt +	100.0 ml.

Sulandırıcılara antibiotik olarak 1000 İ.Ü./ml kristalize penicilin ve 1000 mcg/ml Streptomisin sülfat katıldı.

Yaklaşık 2 saatlik ekulibrasyon sonrası spermalar 0.25 ml. hacmindeki minipayetlere çekildi ve -110 °C' da 7 dakika donduruldu. Donmuş payetler saha konteynerlerine aktarılarak sıvı azot içerisinde depolandı.

Spermatolojik incelemeler için payetler 37 °C' da 30 saniyede eritildi. Fertilité sonuçlarını incelemek amacıyla, İstanbul İl Müdürlüğüne bağlı gezici ekiplerce tohumlamalar gerçekleştirildi. Toplam 4 Köyde yapılan tohumlamalar sonrasında 30 - 60 günde tekrar kızgınlık göstermeyenler gebe kabul edildi (30 - 60 günde % N.R.R.). Elde edilen ortalama değerler arasındaki farklılıkların önem kontrolünde T - testinden yararlandı.

BULGULAR

Çalışmada kullanılan 5 boğada saptanan spermatolojik özellikler Tablo 1' de gösterilmiştir.

Tablo 1- 5 Holştein boğadan alınan taze spermalarda saptanan spermatolojik özellikler.

Boğa No.	Hacim (ml)	Spermatozoit Konsantrasyonu x 10 ⁶ /ml	Motilite (%)	Anormal Spermatozoit (%)
1	4.63 ± 0.55	1220.00 ± 123.96	71.25 ± 1.25	6.53 ± 0.63
2	5.10 ± 0.72	1178.50 ± 111.60	73.75 ± 2.39	8.13 ± 1.14
3	5.75 ± 0.12	1392.25 ± 219.27	73.75 ± 2.39	7.75 ± 0.52
4	3.88 ± 0.43	1100.00 ± 111.81	73.75 ± 1.25	7.13 ± 0.63
5	4.75 ± 0.72	1287.50 ± 180.86	73.75 ± 2.39	8.00 ± 0.54

n - 4

Gliserolizasyon sonrası % 0, % 5, % 10 ve % 20 yumurta sarılı sulandırıcılara göre sırasıyla % 58.50±1.20, % 62.25±0.92, % 63.00±0.84, % 60.75±0.90 motilite saptandı (Tablo 2). Yine sırasıyla % 8.10±0.71, % 7.68±0.52, % 7.30±0.60, % 7.38±0.68

Tablo 2- Beş boğada eritme öncesi ve sonrası sulandırıcılarla saptanan
% Spermatozoit motilitesi ve % morfolojik bozukluklar.

D O N M A Ö N C E S İ	Boğa No	YUMURTA SARISI ORANLARI							
		% 0		% 5		% 10		% 20	
		Motilite	Morfolojik Bozukluk	Motilite	Morfolojik Bozukluk	Motilite	Morfolojik Bozukluk	Motilite	Morfolojik Bozukluk
S O N R A S I	1	60.00 ± 2.04	8.00 ± 0.45	61.25 ± 1.25	7.63 ± 0.55	52.50 ± 1.44	8.75 ± 0.43	61.25 ± 1.25	8.38 ± 0.62
	2	58.75 ± 1.25	8.38 ± 1.02	62.50 ± 1.44	8.00 ± 0.40	62.50 ± 1.44	7.25 ± 0.66	60.00 ± 0.00	8.75 ± 0.82
	3	61.25 ± 2.39	8.00 ± 0.35	61.25 ± 3.14	7.38 ± 0.47	63.75 ± 2.39	7.13 ± 0.87	61.25 ± 2.39	6.75 ± 0.66
	4	55.00 ± 2.04	8.88 ± 0.77	73.75 ± 2.39	8.00 ± 0.73	63.75 ± 2.39	6.88 ± 0.42	61.25 ± 1.25	6.50 ± 0.35
	5	57.50 ± 4.78	7.25 ± 0.32	63.75 ± 2.39	7.38 ± 0.47	62.50 ± 2.50	6.50 ± 0.61	60.00 ± 4.08	6.50 ± 0.93
	Ortalama	58.50 ± 1.20 ^a	8.10 ± 0.71 ^a	62.25 ± 0.92 ^a	7.68 ± 0.52 ^a	63.00 ± 0.84 ^a	7.30 ± 0.60 ^a	60.75 ± 0.90 ^a	7.38 ± 0.68 ^a
I	1	50.63 ± 1.57	9.50 ± 0.94	56.25 ± 1.25	8.63 ± 0.41	57.50 ± 1.02	7.50 ± 0.27	55.63 ± 1.57	9.75 ± 0.65
	2	50.00 ± 1.02	8.56 ± 0.64	50.63 ± 2.57	9.25 ± 0.27	55.63 ± 1.19	8.19 ± 0.60	51.25 ± 1.25	8.00 ± 0.53
	3	61.08 ± 2.36	9.56 ± 0.72	62.50 ± 1.44	9.88 ± 0.63	64.38 ± 0.62	9.69 ± 3.57	63.13 ± 1.19	9.00 ± 0.54
	4	23.13 ± 2.36	18.31 ± 1.12	46.88 ± 3.44	10.94 ± 0.66	51.88 ± 2.77	11.06 ± 0.54	19.38 ± 1.19	13.19 ± 0.51
	5	47.50 ± 2.50	9.13 ± 0.31	48.75 ± 1.25	8.50 ± 0.62	51.88 ± 1.19	8.88 ± 0.38	51.88 ± 1.87	9.31 ± 0.77
	Ortalama	46.63 ± 0.03 ^a	11.01 ± 0.89 ^a	53.00 ± 1.56 ^a	9.41 ± 0.29 ^a	56.25 ± 1.22 ^a	9.06 ± 0.34 ^a	54.25 ± 1.25 ^a	9.85 ± 0.47 ^a

n=4

a: Her bir grupta saptanan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir (P<0.05)

morfolojik bozukluk bulundu. Eritme sonrasında sulandırıcılara göre sırasıyla % 46.63±3.03, % 53.00±1.56, % 56.25±1.22, % 54.25±1.25 motilite ve % 11.01±0.89, % 9.44±0.29, % 9.06±0.34, % 9.85±0.47 morfolojik bozukluk saptandı.

Donma öncesi motilite ve morfolojik bulgular benzer bulundu. Eritme sonrasında ise en düşük motilite % 46.63±3.03 ile yumurta sarısı içermeyen sulandırıcılarda bulunmasına rağmen, aradaki fark önemsiz bulundu. En yüksek morfolojik bozukluklar yine aynı sulandırıcıda saptandı (% 11.01 ± 0.89). Ancak sulandırıcılar arasında morfolojik açıdan önemli bir fark saptanmadı.

Eritme sonrasında yumurta sarısı içermeyen sulandırıcılarla işlem gören 4 no'lu boğada % 23.13±2.36 motilite ve % 18.31±1.12 morfolojik bozukluk bulundu. Bu nedenle belirtilen boğanın yumurta sarısız sulandırıcı ile işlem görmüş spermaları tohumlanabilir kalitede bulunmadı ve fertilite çalışmalarında kullanılmadı.

Fertilite çalışmalarında toplam 220 tohumlama gerçekleştirildi (Tablo 3). En düşük fertilite oranı % 76.19 ile % 20 yumurta sarılı sulandırıcıda ve en yüksek fertilite oranı % 90.00 ile % 10 yumurta sarılı sulandırıcıda elde edildi. Sulandırıcılar arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmadı.

Tablo 3- Tohumlama sonrasında sulandırıcılara göre saptanan fertilite oranları (30 -60 günde % N.R.R). (Toplam tohumlanan inek sayısı / gebe kalan inek sayısı)

Boğa No.	YUMURTA SARISI ORANLARI			
	% 0	% 5	% 10	% 20
1	2/1	10/9	3/3	-/-
2	20/15	17/11	12/10	12/10
3	14/13	16/16	2/2	1/0
4	-/-	15/10	4/4	-/-
5	27/22	25/19	19/17	8/6
Ortalama	63/51 (% 80.95) ^a	83/65 (% 78.31) ^a	40/36 (% 90.00) ^a	21/16 (% 76.19) ^a

a: Her bir grupta tespit edilen ortalamalar arasındaki fark önemsizdir (P<0.05)

SONUÇ VE TARTIŞMA

Yapılan çok sayıda araştırmada sütlü sulandırıcılara farklı oranlarda yumurta sarısı ilaveleri ile başarılı sonuçlar alınmıştır (2, 12). Ancak sütlü sulandırıcılara yumurta sarısı ilave etmeksizin de yeterli sonuçlar alınabildiği bildirilmektedir (1, 7, 11). Foote ve Arriola (3), yumurta sarısı ilave etmeksizin daha yüksek fertilitite oranları elde ettiklerini bildirmişlerdir. Jeyendran ve Memon (6), yumurta sarısının laboratuvar koşullarında spermatolojik özelliklere yararlı olduğunu, ancak tohumlama sonrasında yumurta sarısının dişi genital kanallarında olumsuz etki yaptığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada da eritme sonrasında istatistiksel açıdan önemli olmasa da % 5 ve % 10 yumurta sarılı sulandırıcılarda yüksek motilite ve morfolojik bütünlük saptanmıştır. Ancak Foote ve Arriola (3) ile Jeyendran ve Memon'un (6) bildirdiği gibi en yüksek fertilitite oranları yumurta sarısız sulandırıcılarda çıkmamış, aksine % 10 yumurta sarılı sulandırıcı daha başarılı bulunmuştur. Bununla birlikte sütlü sulandırıcılara yumurta sarısı ilavelerinin çok önemli bir katkısı olmadığı görülmüştür.

Çalışmada kullanılan 4 no'lu boğanın sperması yumurta sarısız sulandırıcılarla işlem gördüğünde başarısız motilite değerleri vermiştir. Ancak aynı ejakulat yumurta sarısı içeren sulandırıcılarla işlem gördüğünde motilite değerleri artmış ve morfolojik bozukluklar azalmıştır. Bilindiği üzere spermanın donma yeteneği boğalara göre değişebilen bir özelliktir. Bir boğanın aynı ejakulatından yumurta sarılı sulandırıcılarında başarılı sonuçlar alınabilmesi, yumurta sarısının kryoprotektif etkisine bağlanabilmektedir.

Sonuç olarak; sütlü sulandırıcılara yumurta sarısı ilavesinin zorunlu olmadığı, ancak donma yeteneğinin bireylere göre değişebildiği dikkate alınarak yumurta sarısı ilavelerinin daha yüksek eritme sonrası motilite, morfolojik bütünlük ve fertilitite sonuçları verebileceği kanısına varılmıştır.

LİTERATÜR LİSTESİ

1. ABOUD, M.Y., SHALASH, M.R., NOUR, EL-DJN, A.A., ZAKI, K. (1976): Buffalo milk as a diluent for preservation semen. VII. th. Int. Cong. Anim. Rep. A. I. 12 -16 (4): 779 -781.
2. AK, K. ve İLERİ, İ. K. (1991): Süt Tozunun Boğa Sperma Sulandırıcısı Olarak Ülkemizde Kullanılabilirliği Üzerinde araştırmalar. 3. Süt Tozu-Yumurta Sarısı Sulandırıcısına Farklı Oranlardaki Gliserol İlavelerinin Çözünme Sonrası Spermatozoitler Üzerine Etkileri. İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg. 17 (1): 39 - 44.
3. FOOTE, R. H., ARRİOLA, J. (1987): Motility and fertility of bull sperm frozen - thawed differently in egg yolk and milk extenders containing detergent. J. Dairy. Sci. 70 (12): 2642 -2647 (Abst.)
4. GARCIA., M. A., GRAHAM, E. F. (1987): Effects of Low-Molecular-Weight-Fractions (LMWF) from milk, egg yolk and seminal plasma on freezability on bovine spermatozoa. Cryobiology 24, 429 -436.
5. GRAFFER. T. (1988): Effect of fertility results of frozen bull semen. II. th Int. Cong. on Anim. Reprod. and A. I. III. 246.
6. JEYENDRAN, R. R., MEMON, M. A. (1986): Fertility of bovine spermatozoa cryopreserved in milk/yolk extender. Agri-Practise 7 (3 - 4): 19 - 21.
7. LANZ. R.N., PICKETT. B.W., KOMAREK. R. J. (1967): Effect of lipid additives on pre-and post freeze survival of bovine spermatozoa. J. Dairy. Sci. 48 (12): 1692 -1697.
8. PACE. M. M., GRAHAM, E. F. (1974): Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. J. Anim. Sci. 39 (6): 1144 -1149.
9. SHANNON, P., CURSON, B. (1983): Effect of egg yolk levels on the fertility of diluted bovine sperm stored at ambient temperatures. New Zealand. Journal of Agricultural Research 26: 187 -189.
10. THACKER, D.L., ALMQUIST, J.O. (1953): Diluters for bovine semen. I. Fertility and motility of bovine spermatozoa in boiled milk. J. Dairy Sci.36 (2): 173 - 180.
11. WALL. R. J. (1981): Metabolism and fertility of bovine spermatozoa stored at -196 °C Dissertation Abst. int. B 42 (4): 1341.
12. WILLINGTON. J. A. (1988): The effect of frozen semen quality of the eggs used in UHT/ECG yolk 1 glycerol diluent and the effect of age of this diluent. II. th. Int. Cong. Anim. Rep. and. A. I. III., 315.