

DEĞİŞİK SÜRE ve ISILARDA ÇÖZÜLMÜŐ BOĞA SPERMALARININ AKROZOM YAPISI ve DÖL VERİMİ ÜZERİNE ETKİSİ

(Studies on the fertility and morphologic characteristics
of frozen bull semen thawing at different times and temperatures)

Neőe YILMAZ *

Nafiz YURDAYDIN **

SUMMARY

In the present study one Holstein bull was used at Çukurova Agricultural Administration Laboratories. Collected ejaculates were evaluated spennatologically, diluted with Tris extender and frozen with liquid nitrogen vapour in straws of 0.5 ml.

Frozen semen have been thawed at 40 °C for 10 s (Sec.), 40 °C for 5 s, 38 °C for 10 s, 38 °C for 5 s and 35 °C for 15 s (control group), motility and acrosomal defect ratios were 65.7 %; 12.3 %; 63.2 %; 19.3 %; 66.0 %; 11.4 %; 64.2 %; 18.7 % and 65.4 %; 9.2 % respectively.

In İskenderun, total 596 inseminations were resulted in 398 conceptions and the conception ratio was 66.8 % respectively.

Total number of insemination was 471, and conception and conception ratio were 320 and 67.9 % to respectively, in Dörtıyol. The general mean of conception ratio was 67.3 % in both countries.

In this, the relation between the motility and the acrosomal defect ratios of frozen bull semen thawed at different temhperatures and times and the fertility was detected. The optimum thawing temperatures and times have been determined as 38 °C for 10 s, 40 °C for 10 s and 35 °C for 15 s (control group).

*: Tarım ve Köyiőleri Bakanlığı Kahramanmaraő İl Müdürlüğü

** : A. Ü. Veteriner Fakültesi, Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama Bilim Dalı, Ankara.

ÖZET

Bu araştırmada, Çukurova Tarım İşletmesi Sun'i Tohumlama Laboratuvarında bulunan siyah - alaca (Holştayn) ırkından bir boğadan alınan spermalar kullanılmıştır. Alınan ejakülatların spermatolojik özellikleri belirlendikten sonra Tris sulandırıcısı ile sulandırılıp 0.5 ml payetlerde sıvı azot buharında dondurulmuştur.

Dondurulan bu spermalar 40°C 10 sn, 40 °C 5 sn, 38 °C 10 sn, 38 °C 5 sn, 35 °C 15 sn (kontrol grubu) ısı ve sürelerinde çözülerek spermatozoa motilitesi ve akrozom morfolojisi incelenmiştir. Bu değerler sırasıyla 40 °C 10 sn' de % 65.7 ve % 12.3; 40 °C 5 sn' de % 63.2 ve % 19.3; 38 °C 10 sn' de % 66.0 ve % 11.4; 38 °C 5 sn' de % 64.2 ve % 18.7; kontrol grubu olarak 35 °C 15 sn' de ise, % 65.4 ve % 9.2 olarak tespit edilmiştir.

Bu arada, İskenderun İlçesinde tohumlanan toplam 596 inekten 398' i gebe kalarak % 66.8 oranında gebelik elde edilmiştir.

Dörtüyl İlçesinde tohumlanan toplam 471 inekten ise, 320' si gebe kalarak % 67.9 gebelik oranı saptanmıştır. Bu iki İlçede belirlenen genel ortalama gebelik oranı ise % 67.3 olmuştur.

Bu çalışmada değişik ısı ve sürelerde çözülen dondurulmuş boğa spermasında spermatozoa motilitesi ve akrozom bozukluğunun dölverimiyle olan ilişkisi ortaya konmaya çalışılarak, dondurulmuş boğa spermasında uygun çözme ısı ve süresinin 38 °C 10 sn, 40 °C 10 sn ve 35 °C 15 sn (kontrol grubu) olduğu saptanmıştır.

GİRİŞ

Türkiye' de ilk kez 1925 yılında Karacabey Harasında kısıraklarda başlayan sun'i tohumlama uygulamasına halk elindeki sığırlarda 1949 yılında geçilmiştir. Günümüze kadar çok uzun bir süre geçmiş olmasına karşın, gerek tohumlanan inek sayısında, gerekse elde edilen dölveriminde istenilen düzeye ulaşamamıştır.

Hayvanlardan normal bir dölverimi alınabilmesi, sun'i tohumlama ile ilgili temel bilgileri edinmek ve sun'i tohumlamayı etkileyen yapısal ve çevresel faktörleri kontrol altında tutmakla olasıdır.

Boğalardan spermanın alınması, muayenesi, değerlendirilmesi, sulandırılması, dondurulması, saklanması, alana gönderilmesi ve bu spermaların tohumlamada kullanılması birbirine bağlı olaylar zinciridir. Bu zincirin bir yerinde

yapılacak bir hata dölverimi düşüklüklerine neden olmaktadır.

Dondurulmuş boğa spermasını tohumlamada kullanmak için kimi literatür verilerine göre bu spermalar farklı ısı süresi ve derecesinde çözülmektedir. Bu farklılıklar ise, spermatolojik özelliklerde ve dölverimi üzerinde etkili olabilmektedir.

Bu nedenle, araştırmada boğa spermasının değişik ısı ve sürelerde çözülmesinin akrozom morfolojisi ve spermatozoa motilitesiyle olan ilişkisi ve dölverimi üzerindeki etkisi incelenmiştir.

LİTERATÜR BİLGİSİ

Boğa spermasının dondurulması ve bu spermaların değişik süre ve ıslarda çözülmesi üzerinde çalışmalar yapan Dmitrash (3), spermatolojik özelliklerin en iyi 40 °C' de çözülenlerde olduğunu saptamıştır. Roos ve ark. (8) ise, mini payetler içinde dondurdıkları boğa spermasının spermatolojik özelliklerinin en iyi 40 °C' de 10 sn de; Soderquist ve Larson (10) da, 35 °C' de 12 sn de olduğunu belirlemişlerdir.

Öte yandan, Zagorski ve ark. (13) ise, 22 boğadan aldıkları 100 ejakülatı pellet yöntemiyle dondurup 20 - 180 gün süreyle muhafaza etmişlerdir. Bu spermaları 26 °C, 39 °C, 48 °C ve 55 °C ' de çözdüklerinde, spermatozoa motilitesini sırasıyla % 16.8, % 34.8, % 39.7 ve % 43.9 olarak elde etmişlerdir.

El-Danasouri (4) de, payetler içinde dondurduğu boğa spermalarını 5 °C' de 5 sn, 37 °C' de 15 sn ve 70 °C' de 7 sn süreyle çözmüştür. Bu spermalarda en yüksek spermatozoa motilitesini 37 °C' de 15 sn de çözülenlerde, en düşük oranı ise, 5 °C' de 5 sn de çözülenlerde saptamıştır.

Bu arada Tamyürek ve ark. (12), payetler içinde dondurup -196 °C' de muhafaza ettikleri boğa spermalarını 37 °C de 30 sn, 50 °C' de 15 sn, 75 °C' de 10 sn ve 90 °C' de 5 sn süreyle çözdüklerinde sırasıyla % 62.1, % 58.5, % 61.6 ve % 60.5 oranında spermatozoa motilitesi ve % 30.0, % 30.6, % 28.7 ve % 27.3 oranındada akrozom bozukluğu tespit etmişlerdir.

Öte yandan, değişik süre ve ıslarda çözümlenerek tohumlamalarda kullanılan dondurulmuş boğa spermasından elde edilen döl verimi üzerinde de bir çok çalışma yapılmıştır.

Bu konuda çalışan araştırmacıardan Özkoca (7). Laiciphos 271 sulandırıcısıyla sulandırıp payetlerde dondurduğu spermaları 34 °C' de 15 sn süreyle çözerek tohumladığı 282 inekten % 76.0, Iritani (6), dondurulmuş spermaları 30 - 40 °C' de çözerek tohumladığı ineklerden % 63.3 oranında gebelik elde etmişlerdir.

Chinnalya ve Balakrishnan (2) ise, Tris sulandırıcısı ile sulandırıp dondurduğu boğa spermalarını 4 °C, 25-30 °C ve 38 °C' de çözerek tohumladığı ineklerde sırasıyla % 65.0, % 59.0 ve % 69.0 oranında dölverimi saptamıştır. Stoye (11) de, dondurulmuş boğa spermalarını 40 °C' de çözüp tohumladığı 1027 inekte % 77.2 oranında dölverimi belirlemiştir.

Bu arada, Seglin'sh ve Enin (9), Stoye (11), Aamdal ve Andersen (1), Forde ve Gravır (5) gibi araştırmacılar yaptıkları çalışmalarda dondurulmuş boğa spermasının ortalama 38-40 °C' de çözüldüğünde akrozom bozukluğunun en düşük, dölveriminin ise, en yüksek oranlarda olduğunu ortaya koymuşlardır.

MATERYAL ve METOD

Araştırmada Çukurova Tarım İşletmesine ait 2 Holştayn ırkı boğa ile bu boğaların dondurulmuş spermalarıyla İskenderun ve Dörtüol İlçelerinde 1991 - 1992 yıllarında tohumlanan 1067 inek ve düve materyal olarak kullanıldı.

Çalışma süresince boğalardan alınan ejakülatların başlıca spermatolojik özellikleri (miktar, motilite, pH, yoğunluk, ölü - canlı oranı ve anormal spermatozoa oranı) belirlendi.

Spermatolojik özellikleri belirlenen spermalar bir tohumlama dozunda (0,5 ml) 25 x 10⁶ motil spermatozoa bulunacak biçimde Tris sulandırıcısı ile sulandırıldı. Bu spermalar payetlere çekilip + 4 °C' de 2.5 saat süreyle ekilibrasyon sonucu, sıvı azot buharında dondurulup tohumlamada kullanılmaya kadar -196 °C' de sıvı azot içinde muhafaza edildi.

Dondurulan spermalar, 40 °C' de 10 sn, 40 °C' de 5 sn, 38 °C' de 10 sn, 38 °C' de 5 sn ve kontrol grubu olarak 35 °C' de 15 sn süreyle çözümlenerek adı geçen İlçelerde tohumlamada kullanılmıştır. Tohumlanan ineklerden 60-90 günde tekrar kırgınlık göstermeyenlerin oranına bakılarak dölverimi oranları saptanmıştır.

Çalışmada elde edilen verilerin ortalama değerleri ve standart hataları hesaplanmış, Duncan testi uygulanarak gruplar arası farklılıklar belirlenmiştir.

BULGULAR

Araştırmada kullanılan boğaların değişik süre ve ısılarda çözümlenmiş dondurulmuş spermalarında saptanan spermatolojik değerler Tablo 1 ' de gösterilmiştir.

Tablodan da izlenebileceği gibi, 40 °C' de 10 sn' de çözümlenen 53 payette ortalama spermatozoa motilitesi % 65.7 ± 0.4, anormal spermatozoa oranı % 12.3 ± 0.4; 40 °C' de 5 sn' de çözümlenen 59 payette aynı değerler sırasıyla % 63 ± 0.3 ve % 19.3 ± 0.8 olarak belirlenmiştir.

Bu arada, yukarıda belirtilen değerler, 38 °C' de 10 sn' de çözülen spermalarda sırasıyla % 66 ± 0.4 ve % 11.4 ± 0.4; 38 °C' de 5 sn' de çözülen spermalarda sırasıyla % 64.2 ± 0.2 ve % 18.7 ± 0.5 olmuştur.

Bu değerler, kontrol grubu olarak 35 °C' de 15 sn' de çözülen spermalarda ise, sırasıyla % 65.4 ± 0.5 ve % 9.2 ± 0.4 olarak saptanmıştır.

Öte yandan, İskenderun ve Dört Yol İlçelerinde tohumlanan 1067 inek ve düveden elde edilen dölverimi sonuçları da Tablo 2' de verilmiştir.

Tablodan da görülebileceği gibi, İskenderun İlçesinde 40 °C' de 10 sn de çözülen spermalar ile tohumlanan 120 inekte gebelik oranı % 70.0. 40 °C' de 5 sn' de çözülen spermalar ile tohumlanan 124 inekte gebelik oranı % 64.5, 38 °C' de 10 sn' de çözülen spermalar ile tohumlanan 123 inekte gebelik oranı % 67.5 ve 38 °C' de 5 sn' de çözülen spermalar ile tohumlanan 120 inekten gebelik oranı ise % 61.7 olmuştur. Adı geçen İlçede kontrol grubu olarak 35 °C' de 15 sn' de çözülen spermalar ile tohumlanan 109 inekte ise, gebelik oranı % 70.6 olarak saptanmıştır.

Aynı tablodan izlenebileceği gibi, Dört Yol İlçesinde 40 °C' de 10 sn' de çözülen spermalar ile tohumlanan 84 inekte gebelik oranı % 72.6, 40 °C' de 5 sn' de çözülen spermalar ile tohumlanan 94 inekte % 64.9; 38 °C' de 10 sn' de çözülen spermalar ile tohumlanan 98 inekte % 70.4, 38 °C' de 5 sn' de 97 inekte gebelik oranı % 62.9 olarak elde edilmiştir. Aynı İlçede kontrol grubu olarak 35 °C' de 15 sn' de çözülen spermalar ile tohumlanan 98 inekte dölverim oranı ise, % 69.4 olmuştur.

Tablo 1. Siyah - Alaca (Holştayn) Irkı Boğaya Ait Örneklerin Değişik Isı ve Sürelerdeki Çözümünden Sonra Motilite ve Akrozom Bozuklukları Yönünden Saptanan Ortalama Değerler.

Dondurulmuş Spermayı Çözme Isı ve Süresi		Çözülen Payet (n)	Spermatozoa Motilitesi ($\bar{X} \pm S\bar{X}$)	Akrozom Bozukluğu ($\bar{X} \pm S\bar{X}$)
40 °C	10 sn	53	65.7 ± 0.4 ^a	12.3 ± 0.4 ^a
40 °C	5 sn	59	63.2 ± 0.3 ^b	19.3 ± 0.8 ^b
38 °C	10 sn	47	66.0 ± 0.4 ^a	11.4 ± 0.4 ^a
38 °C	5 sn	54	64.2 ± 0.2 ^b	18.7 ± 0.5 ^b
35 °C	15 sn	44	65.4 ± 0.5 ^a	9.2 ± 0.4 ^c
Ö.D.			++	++

Ö.D. : Önemlilik Deresi.

+ : P<0.05 Grup Ortalamaları Arası Fark Önemli.

++ : P<0.01 Grup Ortalamaları Arası Fark Önemli.

a, b, c : P<0.05 Aynı Sütunda Farklı Harfleri Taşıyan Ortalamalar Arası Farklar Önemli

sn : Saniye

Tablo 2. Değişik Süre ve Isılarda Çözölmüş Dondurulmuş Boğa Spermaları İle Elde Edilen Dölverimi Sonuçları.

	Dondurulmuş Spermayı Çözme Isı ve Süresi		Tohumlama (n)	Gebelik	
				(n)	(%)
İskenderun	40 °C	10 sn	120	84	70.0
	40 °C	5 sn	124	80	64.5
	38 °C	10 sn	123	83	67.5
	38 °C	5 sn	120	74	61.7
	35 °C	15 sn	109	77	70.6
Ortalama			596	398	66.8
Dörtyol	40 °C	10 sn	84	61	72.6
	40 °C	5 sn	94	61	64.9
	38 °C	10 sn	98	69	70.4
	38 °C	5 sn	97	61	62.9
	35 °C	15 sn	98	68	69.4
Ortalama			471	320	67.9
Genel Ortalama			1067	718	67.3

TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmada dondurulmuş boğa spermaları, değişik süre ve ısılarda çözüldüğünde ortalama spermatozoa motilitesi 40 °C 10 sn' de % 65.7, 40 °C ' de 5 sn' de % 63.2, 38 °C ' de 10 sn' de % 66.0, 38 °C 5 sn' de % 64.2 ve 35 °C 15 sn' de % 65.4 olarak saptanmıştır.

Bu sonuçlara göre, değişik çözme süre ve ısılarının çözüm sonu spermatozoa motilitesi üzerine etkisi önemli ölçüde farklı bulunmuştur (P<0.01).

Ortalama akrozom bozukluğu oranı ise, 40 °C 10 sn' de % 12.3, 40 °C 5 sn' de % 19.3, 38 °C 10 sn' de % 11.4, 38 °C 5 sn' de % 18.7 ve 35 °C 15 sn' de % 9.2 olarak elde edilmiştir.

Bu verilere göre, değişik çözme ısı ve süresinin akrozom morfolojisi üzerine olan etkisi önemli bulunmuştur (P<0.01).

Öte yandan, çalışmada dondurulmuş spermaları değişik ısı ve sürelerde çözerek elde ettiğimiz spermatozoa motilite oranı ile anormal spermatozoa oran-

ları, kimi araştırcıların (3, 8, 10) değerlerine benzerlik göstermekte, oysa kimilerin (4, 12) değerlerinden ise yüksek ya da daha az olarak görülmektedir.

Belirlenen bu benzerlik doğal karşılanabileceği gibi, kimi sonuçların farklı olması, değişik laboratuvar koşullarında ve araştırmayı gerçekleştirenlerin farklı teknik ve yöntem uygulamalarından da, ileri gelmiş olabilir.

Çalışmada, İskenderun İlçesinde en yüksek gebelik oranı (% 70.6) 35 C 15 sn' de, en düşük gebelik oranı da (% 61,7), 38 C 5 sn' de üzülen spermalarla tohumlanan ineklerden elde edilmiştir. Dörtyol İlçesinde ise, en yüksek gebelik oranı (% 72.6), 40 C 10 sn' de en düşük gebelik oranı da (% 62.9), 38 C 5 sn' de üzülen spermalar ile tohumlanan ineklerde saptanmıştır.

Bu arada, bu konuda araştırmalar yapan Stoye (11) en yüksek gebelik oranını (% 77.2) 40 C ' de üzülen spermalarla tohumlanan ineklerde, Forde ve Gravır (5) de 35 C 30 sn' de üzülen spermalarla tohumlanan ineklerde % 62.9 olarak belirlemişlerdir. zkoca (7), 34 C 15 sn' de üzülen spermalarla tohumlanan ineklerden % 76, Chinnalya ve Balakrishnan (2) 38 .C' de zdikleri spermalarla tohumlanan ineklerde % 69, dondurulmuş spermayı 75 C ' de zen Aamdal ve Andersen (1) ise, % 72.0 gebelik oranı saptamışlardır.

Çalışmada dondurulmuş boğa spermalarıyla yapılan tohumlamalardan elde edilen dölverimi sonuçları kimi araştırcıların (7, 11) değerlerinden belli ölülerde farklı olduğu gibi kimilerinin (1, 2, 5, 6, 9, 11) değerlerine de benzerlik göstermektedir.

Dölverimi sonuçlarında gözlenen bu farklılıklar, araştırcıların farklı fertilitte gücüne sahip boğalar kullanmalarından ileri gelebileceği gibi, kullanılan sperma sulandırıcılarının değişik olması, spermayı zme ısı ve sürelerinin de farklı olması yanında, alanda karşılaşılan kimi sorunlardan da kaynaklanmış olabilir.

Sonuç olarak, gerek spermatozoa motilitesi ve akrozom morfolojisinin in-vitro değerlendirilmesi, gerekse dlverimine ilişkin veriler, dondurulmuş boğa spermalarının 40 C de 10 sn süreyle üzüldüğünde en iyi sonuçların alınabileceği bu çalışmayla ortaya konmuştur.

LİTERATÜR LİSTESİ

1. AAMDAL, J. and ANDERSEN. K. (1968): Fast thawing of semen frozen in straws. *Zuchthygiene*, 3: 22 -24.
2. CHİNNALYA, G. P. and BALAKRİSHNAN, M. (1988): Conception rate with frozen semen after prolonged thawing. *Indian, J. Animal Reprod.* 9 (1): 9 -13.
3. DMİTRASH, M. A. (1973): The effect of various diluents and thawing temperatures on quality of pelleted semen. *Plemınna Sprkavai Biol. Rozmnoz. Sıl's' kogospod. Tvarm. Resp. Mızhvıd. Temat. Nauk. Zb.* 3: 79 -81.
4. EL -DANASOURİ. (1987): Photogrammetric studies on the motility of cattle spermatozoa after thawing at various temperatures *Anim. Breed. Abs.*, 55 (2): 776.
5. FORDE, B. and GRAVIR, K. (1973): A uniform method of thawing frozen Semen. *Norsk Veterinartidsskrift*, 85 (3): 146 -148.
6. IRITANI, A. (1980): Problems of freezing spermatozoa of different species. In: 9 th International Congress On Animal Reproduction and Artificial İnsemination, Madrid, Spain.
7. ÖZKOCA, A. (1962): Dondurulmuş boğa spermasıyla tohumlamalardan elde edilen sonuçlar. *L. Z. A. E. Dergisi*, 3: 3 -4.
8. ROOS, B., BADER, H., PFEILSTICKER, J. and MARRE, H. (1974): Investigations on the processing of bull semen in mini straws -laboratory and field experiments. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 81 (24): 610 -614.
9. SEGLIN'SH. A. K. and ENIN, V. P. (1982): The use of frozen semen of bulls. In *Povysh. Rezistentnosti zhivot. Vusloviyakh ikh konsentratsii Riga, USSR.* 51 -55.
10. SODERQUIST, L. and LARSON, K. (1985): Relationship between ATP content and post -thaw motility in bull semen. *Anim. Breed. Abs.* 54 (5).
11. STOYE, H. (1966): Investigations on the influence of thawing temperature on the quality of deep -frozen semen. *Dt. tierärztliche Wschr.*, 73: 281 -284.
12. TAMYÜREK, F., İLERİ, K., SAYIN, T. ve PLEVNELİ, T. (1984): Payet yöntemiyle dondurulmuş boğa spermasının değişik sıcaklık ve sürede çözülmesinin motiliteye ve akrozom bozukluklarının oluşmasına etkisi. *İ. Ü. Vet. Fak. Derg.* 10 (1): 29 -39.
13. ZAGORSKİ, D., DIMITROV, B. and WANNOVA, S. (1974): Comparison of different temperatures for thawing deep - frozen bull semen. *Veterinarna Sbirka.* 71 (5): 35 -37.