BOĞA SPERMASININ DONDURULMASINDA ÇEŞİTLİ SULANDIRICILARIN KULLANILABİLME OLANAKLARI

(The use of various diluents for freezing bull sperms)

Mehmet KOZANDAĞI (*)

GİRİŞ

Sığır ıslah çalışmalarında gün geçtikçe önem kazanan sun'i tohumlamada boğa spermasını sulandırmak ve sulandırılan bu spermayı muhafaza etmek bakımından çok sayıda bilimsel araştırmalar yapılmaktadır. Yapılan bu araştırmalardan amaç en iyi metod ve tekniği bulmaktır. Bir sperma sulandırıcısının amaca uygun olabilmesi için; spermatozoitler üzerine zararlı etki yapmaması, spermatozoitlere daha fazla yaşama gücü vermesi, saklanmasının ve hazırlanmasının kolay olması, maliyetinin ucuz olması gibi özellikleri yanında en mühimi de temin edilmesinde güçlük çekilmemesidir.

Ülkemiz sığırlarında dondurulmuş sperma ile sun'i tohumlama çalışmaları 1973 yılından beri sürdürülmektedir. Boğa sperması dondurulmasında Fransızların payet tekniği uygulanmakta ve sperma sulandırıcısı olarakta Laiciphos 271 kullanılmaktadır. Bu çalışmada yurt dışından ithal edilen Laiciphos 271 yerine değişik sperma sulandırıcılarının kullanılıp kullanılamıyacağının tesbiti ile Türkiye şartlarında yapılabilecek yeni bir sulandırıcının geliştirilebilme olanığının araştırılması amaç alınmıştır.

(*) Dr., Lalahan Zootekni Araştırma Enstitüsü Uzmanı.

LİTERATÜR BİLGİSİ

Çeşitli ülkelerde sperma sulandırıcıları konusunda çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bugrov (3), Rus Simental ve Lebedin boğalarından aldığı spermayı sitrat - glikoz - yumurta sarısı sulandırıcısı ile sulandırdı. Gliserilizasyon ve 2. 5 - 13 saatlik ekilibrasyondan sonra – 15, – 51, – 196 °C de dondurdu. Bu spermalarla yaptığı toplam 8. 821 tohumlamadan % 67. 6 gebelik elde etti.

Baicoianu et al. (2), 3 İsviçre esmeri boğanın spermasını sodyum sitrat - yumurta sarısı - gliserol sulandırıcısı ile sulandırıp – 196 °C de 90 gün muhafaza ettiler. 90 gün sıvı azotta sakladıkları spermalarla tohumladıkları ineklerde % 61. 1, 300 gün sıvı azotta sakladıkları spermalarla tohumladıkları ineklerde de % 65. 6 gebelik elde ettiler. Maktig et al. (11), sodyum sitrat - yumurta sarısı - gliserol sulandırıcısı ile sulandırıp payetlerde dondurdukları spermalarla tohumladıkları ineklerde % 63. 7 gebelik saptadıklar. Jondet et al. (8), Normandiya boğalarının spermalarını sodyum sitrat - yumurta sarısı sulandırıcısı ile sulandırdılar, spermanın ısısını 30° C den 5 °C ye 30, 60, 120 dakikada düşürdüler, payetlerde dondurulan spermada motil spermatozoit oranı donmadan önce sırası ile % 68, 68, 70, donmadan sonra % 67, 67, 69 olarak saptandı. Bu spermalarla tohumlanan 227, 241, 226 inekte 60 - 90 günde dönmiyenlere göre gebelik oranı sırası ile % 77. 62, 74. 68, 75. 35 olmuştur. Molinar (13), sodyum sitrat - yumurta sarısı - % 7 gliserol ile sulandırdığı spermaları dondurdu. Bu spermalarla tohumlanan 2. 467 inekte % 66. 92 gebelik elde etti. Otel et al. (14), Romanya'da spermanın dondurulmasında yaptıkları çalışmada sitrat - yumurta sarısı sulandırıcısı ile yapılan uygulamada ortalama motil spermatozoit-oranı % 69. 6 idi. Sıvı azotta dondurulan bu spermalarla tohumlanan 19. 520 inekte % 69. 0 gebelik saptadılar.

Kupferschmied (10), sitrat solusyonu ile sulandırılan ve payetlerde dondurulan 13 boğa sperması ile yapılan 4. 009 ilk tohumlamada % 71. 5, tris ile sulandırıp payetlerde dondurulan sperma ile yapılan 4. 010 ilk tohumlamada 60 - 90 günde dönmiyenlerin oranı olarak % 70. 5 gebelik elde etmiştir. Andersen ve Rosbeck (1), 10 boğanın spermasını tris sulandırıcısı ile sulahdırıp payetlerde dondurdukları bu spermalarla yapılan 3. 592 tohumlamada % 64. 2 gebelik elde ettiler.

Gavrikov (6), Simental boğalarının spermasını laktoz - yumurta sarısı - gliserol sulandırıcısı ile sulandırıp – 196 °C de sıvı azot buharında dondurdu ve 15 - 30 gün sıvı azot içerisinde muhafaza etti. Bir tohumlama dozunda 10 - 30 - 50 milyon motil spermatozoit bulunan sperma ile % 67. 6, 65. 0, 68. 1 gebelik oranı saptadı.

Deleu ve Nauk (5), boğa spermasının Laiciphos 271 sulandırıcısı ile sulandırıp payetlerde dondurdular. Bu spermalarla yaptıkları 207 tohumlamada % 58. 4 gebelik oranı buldular.

Özkoca (15), sodyum sitrat - yumurta sarısı sulandırıcısı ile sulandırdığı spermaları – 79°C de dondurdu. Bu spermalarla tohumladığı 20 inekte % 60 gebelik elde etti.

Özkoca (16), Laiciphos 271 sulandırıcısı kullanarak BF – 4 – 2 sistemiyle dondurduğu spermaları iki ayrı bölgeye gönderdi. Birinci bölgede 282 inek tohumlandı ve 214 gebelik elde edilerek gebelik oranı % 76 oldu. İkinci bölgeye gönderilen spermalarla 130 inek tohumlandı ve 92 sinde gebelik elde edilerek % 71 oranında gebelik sağlandı.

Kozandağı (9), Lalahan Zootekni Araştırma Enstitüsünün 8 baş değişik tip esmer ırk ve Holştayn boğalarından aldığı spermaları Laiciphos 271 sulandırıcısı ile sulandırıp 0. 5 $cm.^3$ lük payetlerde sıvı azot buharında dondurdu. Bu spermalarla çeşitli illerde yapılan 3. 732 baş inekte birinci tohumlamadan % 56, birden çok yapılan tohumlamalardan ise % 69. 83 doğum oranı saptadı.

MATERYAL VE METOD

Araştırmanın hayvan materyalini bir adet Esmer boğa ile Lalahan Zootekni Araştırma Enstitüsü ve çevresi köylerde yetiştirilen 113 baş inek oluşturmuştur.

Boğalardan alınan spermalar Laiciphos 271, sodyum sitrat, tris ve laktoz sulandırıcıları ile sulandırıldı.

Laiciphos 271 sulandırıcısı (4) :

Laiciphos 271	50	gr.
Yumurta sarısı	70	$cm.^3$
Damıtık su	500	"
Glycerol	36	"

Sodyum sitrat sulandırıcısı (12) :

Sodyum sitrat ($Na_3 C_6 H_5 O_7 H_2 O$)	2. 9	gr.
Yumurta sarısı	20. 0	$cm.^3$
Damıtık su	100. 0	"
Glycerol	% 7	
Glikoz	0. 8	gr.

Tris sulandırıcısı (7) :

Tris	2. 422	gr.
Acide citrique	1. 342	"
Fructose	1. 000	"
Penicillin cristalisee	100. 000	I. Ü.
Streptomycine	0. 100	$cm.^3$
Yumurta sarısı	20. 0	"
Glycerol	6. 4	"
Bidistile su Q. S.	100. 0	"

Laktoz sulandırıcısı (17) :

Laktoz solusyonu (% 11 lik)	73. 0 $cm.^3$
Yumurta sarısı	20. 0 "
Glycerol	7. 0 "

Sulandırıcılar iki bölüm halinde hazırlandı. Birinci bölüm glycerolsuz, ikinci bölüm glycerollu idi. Sulandırıcılar genellikle kullanılmadan 15 - 20 saat önce hazırlandı ve kullanılıncaya kadar + 5 °C de buzdolabında saklandı. Sperma boğadan sun'i vajenle alındı. Önce makroskopik olarak miktar, renk, yoğunluk ve spermatozoitlerin toplu hareketleri incelendi. Daha sonra mikroskopik muayeneye geçildi. Bir damla sperma bir lam üzerine konularak mikroskopun küçük objektifi (10 x 10 büyütme) ile spermatozoitlerin toplu hareketleri incelendi. Daha sonra küçük bir damla sperma lam üzerinde bir damla sulandırıcı ile karıştırılarak mikroskopun büyük objektifi (10 x 40 büyütme) ile bir yönde, hızlı hareketli spermatozoit oranı (motilite) saptandı.

Spermatozoit yoğunluğu, yani 1 $cm.^3$ spermada bulunan spermatozoit sayısı Foto - Elektro - Kolorimetre ile tayin edildi. Daha önce hazırlanan ve 5 ° C de muhafaza edilen sulandırıcıların birinci bölümü 37 °C deki benmariye kondu. Spermanın sulandırılması bir tohumlama dozunda 25 x 10^6 motil spermatozoit bulunacak biçimde yapıldı. Alınan ejekulat 4 eşit parçaya bölündü. Her bölüm tohumlamada kullanılan 0. 5 $cm.^3$ lük payetler olduğundan 1 $cm.^3$ de 50 x 10^6 motil spermatozoit olacak şekilde sulandırıldı. İlk sulandırması yapılan sperma içinde 25 °C su bulunan kaplarla buzdolabına kondu. 45 dakikada glycerollu sulandırıcının ısı derecesine düşmesi sağlandı. 5 °C deki soğutucu kabinde gliserollü sulandırıcı bölümü ilk sulandırılması yapılan spermaya 5 er dakika aralıklarla ve 45 dakika içinde katıldı (Glycerolization). Gliserolleme işlemi tamamlanmış olan sperma motilite kontrolünden sonra emici vakum pomposa ile tekrar payetlere dolduruldu. Ancak değişik sulandırıcılarla sulandırılan spermanın konulduğu payetlerin ağzı değişik renkteki polivinilalkol tozu ile kapatıldı. Böylece spermanın hangi mahlül ile sulandırıldığı kolayca ayırt edilir duruma getirildi. Polivinilalkol tozu ile kapatılan payetlerin ağızları kurutma kâğıdı ile temizlenip 5 °C deki suya konuldu. Burada payetler 2. 5 saat tutuldu (Equilibration). Bu süre sonunda payetler sudan çıkartılarak dondurma raflarına dizildi. Dondurma işlemi LR. 320 sıvı azot kazanında yapıldı. Kazanın sıvı azot seviyesi dondurma raflarından 0. 5 $cm.^3$ aşağıda olacak biçimde ayarlandı. Bu suretle sıvı azot seviyesinden 4 cm. yukarıda – 120° C sağlandı.

Dondurma raflarına dizilen payetler kazanın ızgarası üzerine yerleştirilip, 7 dakika donmaya terkedildi. Bu süre sonunda payetler alınarak içi sıvı azot dolu gobletlere konulup, sıvı azot içerisine daldırıldı. Bu şekilde spermalar kullanılıncaya kadar – 196° C de saklandı. Alanda yapılacak tohumlamalar için sperma LR. 7 adı verilen teknisyen termosları kullanıldı.

Donmuş spermanın tohumlamada kullanılması için daha önce 34 °C ye getirilmiş ve bir termos içerisinde muhafaza edilen suya, bir payet özel payet tutma pensi ile alınarak bırakıldı. 15 saniye bekletildikten sonra sudan çıkartıldı. Bir bezle üzeri kurulandı. Kurulanmış payetlerin pamuklu ucu özel tohumlama aletine (Pistole) yerleştirildi. Polivinilalkol tozu ile kapatılmış ucu bir makasla kesildikten sonra üzerine plastik bir kılıf geçirilerek (Pistole kılıfı) pistole tohumlamaya hazır duruma getirildi. Tohumlamalar Rektovaginal metodla yapıldı. Tohumlanan ineklerde tohumlama zamanının kızgınlığın ortasında (Kızgınlık başlangıcından 8 - 18 saat arasında) olmasına özen gesterildi. Tek tohumlama uygulandı. Tohumlamadan 3 ay sonra rektal yolla gebelik teşhisi yapılarak değişik sulandırıcılardan elde edilen dölverimi saptandı.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Esmer ırk bir boğadan alınan 8 cm. lük ejekulat 2 şer cm.^{3} lük 4 bölüme ayrılarak her tohumlama dozunda 25 milyon motil spermatozoit bulunacak şekilde sıra ile Laiciphos 271, sodyum sitrat, tris ve laktoz sulandırıcıları ile sulandırılmış ve dondurulmuştur. Dondurulmadan önce ve sonra spermatolojik muayeneler yapılmış ve dondurulmuş spermalarla kurum ve halk hayvanlarında sun'i tohumlama tatbikatı uygulanmıştır. Alınan ejekulattaki spermatolojik özellikler Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo: 1 – Kullanılan sulandırıcılara göre spermatolojik özellikler.

SULANDIRICI	EJEKULAT Miktarı (cm.^{3})	Konsant. (Milyon/cm.^{3})	Motilite % Dondurulmadan Önce	Dondurulduktan Sonra
Laiciphos 271	2	1. 902	85	75
Sodyum sitrat	2	1. 902	85	60
Tris	2	1. 902	85	50
Laktoz	2	1. 902	85	65

Alınan ejekulatın konsantrasyonu 1. 902 x 10^6/cm.^{3} bulunmuştur. Ejekulattaki spermatozoit yoğunluğu dondurulmadan önce ilk sulandırmada % 85 dondurulduktan sonra ise, kullanılan sulandırıcılardan, Laiciphos 271 de % 75, sodyum sitratta % 60, tris de % 50 ve laktozda % 65 olmuştur. Bu spermalarla yapılan tohumlamalardan elde edilen dölverimi sonuçları Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo: 2 – Değişik sulandırıcılarla dondurulan boğa sperması ile yapılan tohumlamalardan elde edilen dölverimi sonuçları.

SULANDIRICI	Tohumlanan İnek Sayısı	Gebe İnek	Kısır İnek	Gebelik %
Laiciphos 271	32	23	9	71. 9
Sodyum sitrat	25	17	8	68. 0
Tris	30	16	14	53. 3
Laktoz	26	16	10	61. 5
TOPLAM	113	72	41	62. 8

En yüksek gebelik oranı Laiciphos 271 ile dondurulan spermalarla elde edilmiştir. Bu spermalarla 32 inek tohumlanmış bunlardan 23 ünde gebelik teshis edilmiş ve % 71. 9 gebelik oranı saptanmıştır. En düşük gebelik oranı Tris ile sulandırılıp dondurulan spermalarla elde edilmiştir. Bu spermalarla 30 inek tohumlandı. Sağlanan gebelik oranı % 53. 3 dür. Toplam olarakta 113 inek tohumlandı. 72 inekte gebelik, 41 inde kısırlık teşhis edildi. Gebelik oranı % 62. 8 olarak saptandı.

Laiciphos 271 sulundarıcısı kullanarak saptanan % 71. 9 gebelik oranı, Özkoca'nın BF – 4 – 2 sistemiyle dondurup iki ayrı bölgede uygulanan spermalardan elde edilen gebelik sonuçları bölgelerden birinde % 71. 00 dır. Bu sonuç bizimkine benzerlik göstermekte ancak araştırıcının diğer bölgede elde ettiği % 76 lık sonuçtan daha düşük görülmektedir. Deleu ve Nauk (5) ın 207 inek tohumlayarak elde ettikleri % 58. 40 gebelik oranı ile Kozandağı (9) ın 3. 732 inekte birinci tohumlama sonucu sağlanan % 56. 00 doğum oranından daha yüksektir. Bu sonuçlardan gebelik oranındaki farklılığın kullanılan tohumlama tekniğinin ve tohumlama teknisyenlerinin dikkat ve yeteneklerinin farklı oluşuna, doğum oranındaki farklılığın ise embriyonik ölümlerden olacağına bağlanabilir.

Sodyum sitrat sulandırıcısı kullanarak elde edilen % 68. 0 gebelik oranı, Bugrov (3) un % 67. 6, Molinar (13) un % 66. 92, Otel et al. (14) un % 69. 0 olarak elde ettiklerine benzerlik göstermekte, Baiccoianu et al. (2) in – 196 °C de 90 gün ve 300 gün muhafaza ettikleri spermalarla tohumladıkları ineklerden % 61. 1 - 65. 6, Maktig et al. (11) in % 63. 7, Özkoca (15) in % 60 olarak saptadıkları gebelik oranından yüksek, Jondet et al. (8) in spermanın ısısını 30°C den 5 °C ye 30 dakikada düşürdükleri spermalardan % 77.62, ile Kupferschmied (10) in 4. 009 inekte yapılan ilk tohumlamada % 71. 5 olarak elde ettikleri gebelik oranından düşük bulunmuştur.

Bu farklı sonuçların nedeni kullanılan erkek ve dişi materyalin değişik ırklardan olması, değişik genetik yapılarına sahip bulunmaları ve farklı çevre koşullarında bakım ve beslemeye tabi tutulmuş olmalarıdır. Öte yandan gerek dondurmada gerekse tohumlamadaki tekniklerin değişik olması da bu farklı sonuçları doğurmaktadır.

Tris sulandırıcısı ile sulandırılarak dondurulan spermalarla yapılan tohumlamalardan % 53. 3 olarak elde edilen gebelik oranı, Kupferschmied (10) un yapılan 4. 010 inekte ilk tohumlamada % 70. 5, Andersen ve Rosbeck (1) ın 3. 592 tohumlamada % 64. 2 olarak elde edilen gebelik oranlarından daha düşüktür. Bunada spermanın dondurulması sırasında sulandırıcıya katılan gliserol oranı, ekilibrasyon süresi, dondurma süresi ve bir tohumlama dozundaki motil spermatozoit sayısı sonuçların farklı çıkmasına neden olabilir.

Laktoz sulandırıcısı ile sulandırılarak dondurulan spermalardan % 61. 5 oranında sağlanan gebelik oranı, Gavrikov (6) un bir tohumlama dozunda 30 milyon motil spermatozoit bulunan spermalarla saptanan % 65. 0 oranındaki gebelik sonucuna benzerlik göstermektedir.

Yapılan araştırmada sodyum sitrat sulandırıcısı ile elde edilen dölverimi sonucunun laboratuvarımızda kullanılan Laiciphos 271 sulandırıcısına ve kimi literatür verilerine uygun olması nedeniyle kullanılabileceği görülmektedir. Ancak bu konuda kesin kanaata varabilmek için, iki farklı sulandırıcı ile daha çok sayıda inek tohumlayarak araştırmanın tekrarlanması umulan verilerin elde edilmesinde kesinlik kazanması bakımından daha da faydalı olacaktır.

ÖZET

Lalahan Zootekni Araştırma Enstitüsünde 115 - 73 kulak nolu Kral adlı boğanın aynı gün alınan sperması, Laiciphos 271, sodyum sitrat, tris ve laktoz sulandırıcıları ile sulandırıldı. Sıvı azot buharında dondurularak kurum ve çevredeki yetiştiricilerin inekleri tohumlandı. Sulandırıcı sırasına göre % 71. 9, 68. 0, 53. 3 ve 61. 5 oranında gebelik saptandı.

SUMMARY

The semen of the 115 - 73 bull was diluted on the same day of collection with Laiciphos 271, sodium citrate and Lactose diluents and was frozen in liquid nitrogen vapour in Lalahan Zootechnical Research Institute with this semen the cows of the Institute and environment was inseminated. According to the dilution order 71. 9 %, 68 %, 53. 3 % and 61. 5 % pregnancy were obtained.

LİTERATÜR

1 — *ANDERSEN, J. B. and ROSBECH, N. O., (1974): İnvestigation on deep - freezing of bull semen according to the landshut metod. Anim. Breed. Abstr. 42 : 970.*

2 — *BAICOIANU, C., DIMOFTACHEA and BOUREANU, A., (1974): Fertility of bull semen frozen under variying conditons Anim. Breed. Abstr. 42: 4815.*

3 — *BUGROV, C. D., (1970) : Effect of duration of storage and equilibration on a activaty, survival and fertilisation capacity of frozen and thawed bull spermatozoa. Anim. Breed. Abstr. 39: 322.*

4 — *CASSAU, R., (1975) : The French straw tecnique, A. I. Co - op centre, 61 L'Aigle (France).*

5 — *DELEU, V., NAUK, V., (1973) : Imporement of the technique of freezing of semen in straws. Anim. Breed. Abstr. 41: 5242.*

6 — *GAVRİKOV, A. M., (1969): Dependence of cow fertility on the number of motile spermatozoa in the dose of semen inseminated. Anim. Breed. Abstr., 31: 3229.*

7 — *HAHN, R., CASSAU, R. and EİBL, K., (1969): Vergleichende Untersuhungen über die Einfriertechnik des Bullen semens mit nilfe der paillette bzw. Ampulle. Dtsch. Tierarztl. Wschr., 1969, 76, 346 - 350.*

8 — *JONDET, R. RABADEUX, Y. and JONDET, M. (1975) : Effect of duration of chilling (From 30˘C - 5 ˚C) on the recovery rate and fertilising ability of frozen bull spermatozoa. Anim. Breed. Abstr., 43: 77.*

9 — *KOZANDAĞI, M. (1979): Lalahan Zootekni Araştırma Enstitüsünün değişik tip Esmer ırk Holştayn boğaları spermalarının kimi spermatolojik özellikleri ile çeşitli illerde kullanılan donmuş ve donmamış spermalardan elde edilen sonuçlar. Lalahan Zoot. Araşt. Enst. Yayın No: 59.*

10— *KUPFERSCHMIED, H., (1971): Comparison between a citrate and a tris diluent in cattle A. I., Zuchthygiene., 6: 123 - 126, Anim. Breed. Abstr., 40: 422.*

11— *MAKTIG, R. C., ALMQUIST, J. O. and FOSTER, J. (1970): Reproductive capacity of beef bulls. V. Fertility and Freezability of successive ejeculates collected by different metods. J. Anim. Sci., 30: 60 - 62.*

12— *MILOVANOV, V. K. (1962): Biology and reproduction and artificial insemination of animals. Lzd. selk. hoz., Lit., Moscow (Asquated) in paufler, S. K. und Mitautoren., (1974): Künstlich Besamung und Eitransplantation bei Tier und Mensch. Verlag M. - H. Schaper, Hannover.*

13— *MOLINAR, D. R. (1961): Fertility of bull semen stored un milk - yolk, C.U. E. Milk - glycerol and I. V. T. Dienents Ministry of Agricultura, Fisherien and food, Reoding cattle Breeding candre shinfield, Reoding England.*

14— *OTEL, V., BOUREANU, A., FEREDAN, T., NEGOITA, V., (1973): Results with deep freezing of semen in Romania. Anim. Breed. Abstr. 41: 129.*

15— *ÖZKOCA, A. (1962): Dondurulmuş boğa sperması ile yapılan tohumlamalardan elde edilen sonuçlar. L. Z. A. E. Dergisi Cilt: II, Sayı: 3 - 4.*

16— *ÖZKOCA, A. (1976): Boğa spermasının plâstik çubuklarda BF - 4 - 2 freezen aygıtı ile dondurulması ve elde edilen sonuçlar. İstanbul Üniversitesi Vet. Fak. Dergisi Cilt: II, Sayı: 1, 41 - 48.*

17 — *VOLKOV, A. S.,(1974): The effect of number of motile spermatozoa on conception rate in sheep. Zhivod. 10: 69 - 71 (Asquated) in Anim. Breed. Abstr. 1975, 43 : 3.*