

T.C.
AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİNDİ (*Meleagris gallopavo*) SEMENİNİN
DONDURULMASINDA KULLANILAN FARKLI
SULANDIRICILARIN KARŞILAŞTIRILMASI

Mehmet KUZLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

KIRŞEHİR

2015

T.C.
AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİNDİ (*Meleagris gallopavo*) SEMENİNİN
DONDURULMASINDA KULLANILAN FARKLI
SULANDIRICILARIN KARŞILAŞTIRILMASI

Mehmet KUZLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Atilla TAŞKIN

KIRŞEHİR

2015

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Başkan(İmza)

Üye(İmza)

Üye(İmza)

Üye(İmza)

Üye(İmza)

Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

../../2015

Prof. Dr. Levent KULA

Enstitü Müdür

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğuna, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Mehmet KUZLU

**HİNDİ (*Meleagris gallopavo*) SEMENİNİN
DONDURULMASINDA KULLANILAN FARKLI SULANDIRICILARIN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Mehmet KUZLU

Ahi Evran Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Ağustos 2015

ÖZET

Bu çalışma, farklı sulandırıcıların kullanılarak hindi spermasının uzun süreli muhafaza yöntemlerinin geliştirilmesi amacıyla yapılmıştır. Çalışma boyunca 5 adet hindiden masaj yöntemiyle haftada ikişer kez ve toplamda 44 kez sperm alınmıştır. Elde edilen nativ spermaların ortalama ejakülat miktarı, sperm yoğunluğu, motilite ve vitalite değerleri sırasıyla $0,22\pm 0,01$ ml, $3,5\pm 0,17 \times 10^9$ sp/ml, % $77,0\pm 1,44$ ve % $86,2\pm 0,95$ olarak belirlendi. Çalışmada, % 5 DMSO kriyoprotektanı içeren Glikoz, Tris-Glikoz, Laktatlı Ringer ve Laktatlı Ringer-Glikoz sulandırıcıları kullanılmıştır. Hindilerden alınan spermalar birleştirilip 4 eşit parçaya bölünerek 1:3 oranında sulandırıldıktan sonra $+4^{\circ}\text{C}$ ' de 90dk boyunca ekilibrasyona tabi tutulmuştur. Ekilibrasyon sonrası 5dk süreyle -80°C ' ye kadar sıvı azot buharında dondurulmuş ve -196°C ' lik sıvı azot içerisinde depolanmıştır. Dondurma-çözme sonrası motilite değerleri sırasıyla % $43,3\pm 1,62$, % $12,2\pm 0,66$, % $12,6\pm 0,92$ ve % $24,6\pm 1,53$ olarak bulunmuştur. Dondurma-çözme sonrası vitalite değerleri ise sırasıyla % $55,8\pm 1,89$, % $23,8\pm 1,58$, % $21,5\pm 1,10$ ve % $36,5\pm 1,59$ olarak tespit edilmiştir.

Çalışmada elde edilen bulgulara göre Glikoz sulandırıcısının hindi semeninin uzun süreli muhafazasında diğer sulandırıcılara göre daha etkili olduğu saptanmıştır ($p<0.01$).

Bilim Kodu:

Anahtar Kelimeler: Hindi, sperma, motilite, vitalite, sperma dondurma,

Tez Yöneticisi: Yrd. Doç. Dr. Atilla TAŞKIN

Sayfa Adedi: 58

COMPARISON OF DIFFERENT DILUENT USED IN TURKEY (*Meleagris gallopavo*) SEMEN FREEZING

Master's Thesis

Mehmet KUZLU

Ahi Evran University

Institute of Science

August 2015

ABSTRACT

This study was conducted to improve the development of long-term preservation methods of turkey semen using different extenders. Semen was collected from five turkeys by manual massage method twice a week and a total of 44 times throughout the study. The means amount of the resultant native semen ejaculate volume (ml), sperm concentration ($\times 10^9$ sp/ml), motility (%) and vitality (%) were recorded as $0,22 \pm 0,01$ ml, $3,5 \pm 0,17 \times 10^9$ sp/ml, % $77,0 \pm 1,44$ and % $86,2 \pm 0,95$ respectively. In this study, used Glucose, Tris-Glucose, Lactated Ringer and Lactated Ringer-Glucose extenders containing % 5 DMSO cryoprotectant. The semen collected from turkeys combined and divided into four equal parts. The semen equilibrated at 4°C for 90 min after diluted 1:3 with extenders. The semen stored at -196°C on liquid nitrogen after frozen at -80°C for 5 min on liquid nitrogen vapour. After post-thaw motility for Glucose, Tris-Glucose, Lactated Ringer and Lactated Ringer-Glucose detected as % $43,3 \pm 1,62$, % $12,2 \pm 0,66$, % $12,6 \pm 0,92$ and % $24,6 \pm 1,53$ and for vitality detected as % $55,8 \pm 1,89$, % $23,8 \pm 1,58$, % $21,5 \pm 1,10$ and % $36,5 \pm 1,59$ respectively.

According to the findings obtained in this study, Glucose extenders was found to be more effective in the long-term preservation of turkey semen than the others ($p < 0.01$).

Science Code:

Keywords: Turkey, sperm, motility, vitality, cryopreservation

Thesis Adviser: Assis. Prof. Dr. Atilla TAŞKIN

Number Of Pages: 58

TEŞEKKÜR

Bütün araştırma süresi boyunca maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen tezimin her aşamasında bilgi, beceri ve deneyimlerini sunan danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Atilla TAŞKIN' a, çalışmam boyunca yardımlarını ve deneyimlerini esirgemeyen Doç. Dr. Ufuk KARADAVUT, Doç. Dr. Sevil SAĞLAM, Yrd. Doç. Dr. Serdar GENÇ, Yrd. Doç. Dr. Hakan KIR, Araş. Gör. Hüseyin ÇAYAN, Araş. Gör. Emre UĞURLUTEPE, Vet. Hek. Demirel ERĐÜN ve diğer tüm hocalarıma bütün içtenliğimle teőekkürlerimi sunarım.

Çalışma boyunca her zaman yanımda olup desteklerini esirgemeyen Ali İhsan KARAYEL, Ahmet DEMİREL, Mehmet Rifat TÜRK, Özge ZORBİLMEZ, Hatice SEÇİLMİŐ ve Mehmet YILDIRIM arkadaşlarıma teőekkürlerimi sunarım.

Lisans ve Yüksek Lisans hayatım boyunca büyük bir sabırla maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, en büyük destekçilerim olan aileme Őükranlarımı sunuyorum.

Bu çalışma Ahi Evran Üniversitesi PYO birimi tarafından AEÜ-PYO.ZRT.4003/2.13.007 proje numarası ile desteklenmiŐtir. Desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ BİLDİRİMİ	I
ÖZET	II
ABSTRACT	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
TABLolar DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR	IX
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	5
2.1. KONU İLE İLGİLİ YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	5
3. MATERYAL METOD	15
3.1. MATERYAL.....	15
3.1. 1.Hayvan Materyali	15
3.1.2. Deneme Yeri ve Yılı	15
3.1.3. Denemede Kullanılan Malzemeler.....	15
3.1.4. Denemede Kullanılmak Üzere Hazırlanan Sulandırıcılar ve Eosine-Y Boyası	17
3.2. YÖNTEM.....	18
3.2.1. Spermanın Masaj Yöntemi İle Alınması	18
3.2.2. Spermatolojik Özelliklerin Belirlenmesi.....	19
3.2.2.1. Ejekülat Miktarı	19
3.2.2.2. Motilite.....	19
3.2.2.3. Sperm Yoğunluğu	20

3.2.2.4.Vitalite	21
3.2.3. Spermanın Sulandırılması ve Ekilibrasyon	21
3.2.4. Spermanın Dondurulması Ve Çözülmesi	22
3.4. VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	22
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	24
4.1. NATİV SPERMA.....	24
4.1.1. Ejekülat Miktarı.....	24
4.1.2. Sperm Yoğunluğu	26
4.1.3. Nativ Sperma Motilitesi	28
4.1.4. Nativ Sperma Vitalitesi	30
4.2. SULANDIRMA SONRASI	32
4.2.1. Sulandırma Sonrası Motilitesi	32
4.2.2. Sulandırma Sonrası Vitalitesi.....	36
4.3. DONDURMA-ÇÖZME SONRASI.....	39
4.3.1. Dondurma-Çözme Sonrası Motilitesi.....	39
4.3.2. Dondurma-Çözme Sonrası Vitalitesi	43
SONUÇ.....	48
KAYNAKÇA	50
ÖZGEÇMİŞ.....	58

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 4.1. Nativ Sperma Ejekülat Miktarlarına Ait Değerler	24
Tablo 4.2. Nativ Spermaya Ait Sperm Yoğunluğuna Ait Değerler	26
Tablo 4.3. Nativ Spermaya Ait Motilite Değerleri	28
Tablo 4.4. Nativ Spermaya Ait Vitalite Değerleri	30
Tablo 4.5. Sulandırma Sonrası Farklı Sulandırıcılara Ait Motilite Değerleri.....	33
Tablo 4.6. Sulandırma Sonrası Farklı Sulandırıcılara Ait Vitalite Değerleri.....	37
Tablo 4.7. Dondurma-Çözme Sonrası Farklı Sulandırıcılara Ait Motilite Değerleri	40
Tablo 4.8. Dondurma-Çözme Sonrası Farklı Sulandırıcılara Ait Vitalite Değerleri .	44

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3. 2. Denemede Kullanılan Hindilerden Bir Görünüm	15
Şekil 3. 3. Kimyasal Madde Tartımına Ait Bir Görünüm.....	17
Şekil 3. 4. Sperm Sağımına Ait Görünümler	18
Şekil 3. 5. Sperm Sağımına Ait Bir Görünüm	19
Şekil 3. 6. Spermanın Mikroskopik İncelenmesi Sırasında Bir Görünüm.....	20
Şekil 3. 7. Boyanmış (a) ve Boyanmamış (b) Spermaların Mikroskopik Görünümü	21
Şekil 3. 8. Sperm Dondurma İşlemi Sırasında Bir Görünüm.....	22
Şekil 4. 1. Nativ Sperma Ejekülat Miktarı Ortalama Değerleri	25
Şekil 4. 2. Nativ Spermalara Ait Sperm Yoğunluğu Ortalama Değerleri.....	27
Şekil 4. 3. Nativ Sperm Motilitesi Ortalama Değerleri.....	29
Şekil 4. 4. Nativ Sperm Vitalitesi Ortalama Değerleri	31
Şekil 4. 5. Farklı Sulandırıcılara Ait Sulandırma Sonrası Ortalama Motilite Değerleri	34
Şekil 4. 6. Farklı Sulandırıcılara Ait Sulandırma Sonrası Ortalama Vitalite Değerleri	38
Şekil 4. 7. Farklı Sulandırıcılara Ait Dondurma-Çözme Ortalama Motilite Değerleri	41
Şekil 4. 8. Farklı Sulandırıcılara Ait Dondurma-Çözme Ortalama Vitalite Değerleri	45

SİMGELER VE KISALTMALAR

µl: Mikrolitre

BPSE: Beltsville Poultry Semen Extender

BSW: Beltsville Small White

DMA: Dimetil asetamid

DMF: Dimetil formamid

DMSO: Dimetilsülfoksit

FTS: Fizyolojik Tuzlu Su

g: Gram

IMV: Instruments For Veterinary Medicine

LR: Laktatlı Ringer

ml: Mililitre

mOsm: Miliosmol

SF: Serum fizyolojik

Sp: Sperm

1. GİRİŞ

Günümüz dünyasında bir taraftan hayvansal protein açığını kapatmak için çalışmalar yapılırken diğer taraftan da hızla artan nüfusun beslenme ihtiyacını karşılamak amacıyla yeni protein kaynakları araştırılmaktadır. Birim alanda yoğun bir şekilde üretilen, birim alanda hızla üreyebilen ve yemi ete en iyi dönüştürme yeteneğine sahip kümes hayvanlarının önemi giderek artmaktadır (Eleroğlu, 1996; Akçay ve ark., 1997; Türkoğlu ve ark. 2005; Eleroğlu ve ark., 2012). Melezleme çalışmalarıyla, başta yüksek verimli erkeklerden daha çok yararlanma, bireysel verim kontrolü ve üretimin artırılması gibi birçok etki araştırılmaktadır. Bu çalışmaların etkinliği ve başarısı için suni tohumlama ve diğer kimi biyoteknolojik yöntemlerin ayrıntılı olarak incelenmesi ve kanatlı yetiştiriciliğinde uygulanması zorunlu görülmektedir (Sexton, 1981; Ilgaz, 1990; Akçay ve ark., 1997; Donoghue ve Wishart, 2000; Rosato ve ark., 2012).

Suni tohumlamanın en önemli yararlarından biri, sürüde mevsim boyunca yüksek dörlülük sağlanmasıdır. Suni tohumlamada karışık sperma kullanma olanağı bulunduğundan, kimi erkeklerin döllenme gücünden yoksun olmasından ileri gelen sakınca giderilmiş olur. Ayrıca suni tohumlamada çiftleşme kafeslerine gereksinim duyulmadığından dolayı hindi yetiştiricileri için de girdi miktarını azaltmaktadır (Koçak, 1982; Eleroğlu, 1996). İlk suni tohumlama çalışmasını kestiği tavuğun ductus deferensine uyguladığı basınç ile elde ettiği spermi kullanarak Ivanov 1912’de gerçekleştirmiştir. Günümüz araştırmalarına kadar sperm alma yöntemleri suni vajen ve elektrojekülasyon olmuşsa da şimdilerde kullanılan en iyi ve en yaygın yöntem masaj yöntemidir (Keskin ve ark., 1995; Blesbois ve Brillard, 2007). Masaj yöntemi ile sperm sağımını ilk defa Burrows ve Ouinn (1936), tavuklarda yapmışlardır ve daha sonrada aynı yöntemi uygulayarak hindilerden de sperm almayı başarmışlardır. Yapılan çalışmalara göre masaj yöntemi ile alınan semen miktarı doğal aşım sırasında bırakıldan daha fazladır (Burrows ve Ouinn, 1937; Smirnov ve Aleksev, 1990; Akçay ve ark., 1997).

Sulandırıcıların fertilitite yeteneğini kaybetmemesi için 5-15°C’ de 6-48 saat içerisinde kullanılması önemlidir. Kullanılan sulandırıcılar, hem yoğunluğu fazla olan semenin sulandırılarak daha kullanılır hale getirmek hem de spermatozoonlar

için enerji sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Sulandırılan semenler fizyolojik sulandırıcılarla sulandırılarak kısa süre için kullanılabilir (Lake ve ark., 1984; Akçay ve ark., 1997). Sulandırıcı olarak; SF, ringer, yağsız süt tozu, buffer solüsyonları ve birçok araştırmacı tarafından formüle edilen veya modifiye edilen solüsyonlar kullanılabilir. Teknolojinin daha gelişmemiş olması ve araştırmaların daha yetersiz olmasından doğan eksik bilgiden dolayı ilk denemelerde doğal sulandırıcılar (seminal plazma) kullanılmıştır (Ashizawa ve Okauchi, 1984; Blesbois ve Caffin, 1992). Farklı sulandırıcılara %20 ve %40 seminal plazma ilave edilerek yapılan bir araştırmada, seminal plazma miktarının yüksek olduğu sulandırıcılarda motilite ve oksijen tüketiminin daha fazla olduğu saptanmıştır (Ashizawa ve Okauchi, 1984). Sexton (1984) tarafından yapılan bir araştırmada ise, sulandırılmış sperma için en uygun sıcaklığın 5-15°C arası olduğunu (6 saat), sulandırılmamış spermalar için ise 15°C olduğunu belirtmiştir. Ayrıca Sexton (1998) yaptığı başka bir araştırmasında sulandırılmış spermanın vitalite değerleri, sulandırılmamış spermanın vitalite değerlerinden daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Giesen ve Sexton (1983), kısa süreli saklama yöntemleri üzerine yaptıkları bir çalışmada 5°C' de 24 saat süreyle BPSE, IMV ve Minnesota sulandırıcılarını kullanmış, en iyi sonucun BPSE sulandırıcısından elde edildiğini bildirmişlerdir.

Semen kalitesinin saptanabilmesi için ejakulat miktarı, motilite, vitalite, anormal bozukluklar, pH ve sperm yoğunluğu gibi ölçümlerin yapılması gerekir (Seigneurin ve Blesbois, 1995; Alkan ve ark., 2002). Genel şartlarda kanatlı hayvanlarda suni tohumlama yönteminin rutin ve başarılı bir şekilde uygulayabilmek için kanatlı spermasının en iyi şekilde ve en uzun süre koruyabilecek sulandırıcılara ve kriyoprotektanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Sulandırıcı ve kriyoprotektanlar için bir yandan düşük maliyetli diğer yandan daha uzun süre ve yüksek fertilitte sağlayabilecek duruma getirilmesi için çalışmaların devam etmesi gerekmektedir. (Sexton ve Giesen, 1982; Siudzinska ve Lukaszewicz, 2008; Iaffaldano ve ark., 2009).

Kriyoprezervasyon (dondurarak saklama); hücre ve dokuların çok düşük sıcaklıktaki ısılarına kadar soğutularak gelecekte kullanılmak amacıyla hücrenin bütün biyolojik aktivitelerini durdurmasıdır. Dondurma işlemlerindeki amaç bir hücrenin veya dokunun minimum hasarla ve herhangi bir fonksiyon kaybı olmadan uzun süreli

saklanmasıdır (Tarvis, 2013; Tunalı, 2014). Shaffner ve ark. (1941), kuşlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada hiçbir civciv elde edilememesine rağmen dondurulmuş spermden suni tohumlama ile verim alınabileceği fikrini ortaya atmıştır (Blesbois, 2007; Blesbois ve Brillard, 2007). İlk olarak kanatlı spermasının dondurulması Polge ve ark. (1949), tarafından tesadüfî bir şekilde keşfedilmiştir. Bu çalışmada sperma %20 gliserol içeren Ringer solüsyonu ile -79°C ' deki kuru buz üstünde dondurularak yapılmıştır ve eritildikten sonra motilitenin devamı sağlandığı görülmüştür (Polge ve ark., 1949; Lake, 1986; Alaçam, 1994; Donoghue ve Wishart, 2000). Polge ve ark. (1949), tarafından yapılan bu çalışmadan sonra birçok türde sperm dondurma işlemleri yapılmış ve daha çok evcil hayvan türü ele alınmıştır. Bu gelişmelere rağmen yöntemin maliyetinin yüksek olması nedeniyle kanatlı sektöründe kullanılmasına engel teşkil etmiş ve çalışmalar yavaşlamıştır (Blesbois and Brillard, 2007; Blesbois, 2007; Graham, 2007).

Dondurma işlemi sürecinde, hücrenin hasarı minimum seviyede olmalı, hücrenin bütünlüğü korunmalı ve fonksiyonel özellikleri korunmalıdır. Canlılığı korumanın en önemli noktaları dondurma, çözündürme ve fizyolojik ortamın sağlanmasıdır. Dondurma safhası için en ideal seviye -196°C ' lik sıvı nitrojendir. Bu seviyeye ulaşıldığında geçen sürenin canlılık üzerine herhangi bir etkisi yoktur (Tarvis, 2013; Tunalı, 2014).

Kanatlı sperması, iç buz kristallerinin oluşmasına karşı çok düşük bir dirence sahiptir. İyi bir donma eğrisinin en hassas noktalarından biri sıcaklıklar arası geçişlerdir ve bu geçişler spermlerin yavaş hızda dondurulmasıyla uygulanır, daha hızlı dondurma ise daha çok balıklarda ve memelilerde uygulanır (Seigneurin ve Blesbois, 1995; Iaffaldano ve ark., 2009). Uygun zaman, düzgün soğutma, dengeleme sıcaklığı, seyrelticinin kullanılabilirliği ve kriyoprotektan uygunluğu gibi faktörler açısından farklılık gösterebilir (Donoghue ve Wishart, 2000; Lukaszewicz, 2001a; Blesbois, 2007; Graham, 2007). Ayrıca kanatlı hayvan sperması memeli hayvan spermalarına göre morfolojik farklılıklar göstermektedir. Kanatlı spermasındaki baş kısmı ile kuyruk kısmının yakın genişlikte olmasıyla birlikte (yaklaşık 0,5 mikron) kuyruk boyu memeli sperma kuyruğuna göre oldukça uzundur (boğalarda yaklaşık 50 mikron, kanatlılarda yaklaşık 100 mikron) (Donoghue ve Wishart, 2000; Akçay ve ark., 2007). Kanatlılarda sperm zarı kendi karakteristik

yapısı nedeniyle diğer canlılara oranla en düşük toleransa sahiptir (Blesbois ve ark., 2005) ve her kanatlı türü için de ayrı stratejiler uygulanmalıdır (Donoghue ve Wishart, 2000; Long ve ark., 2014).

Başarılı bir dondurma işlemi kriyoprotektanların ve suyun membrandan hızlı difüzyonu ile gerçekleşir. Kullanılan kriyoprotektanların toksik etkisini azaltmak için, hücrenin kriyoprotektaanlara maruz kalma sürelerinin azaltılması, etkiyi azaltabilecek sulandırıcılar ve ayrıca permeabl özelliği olmayan kriyoprotektanların kullanılması önerilmektedir (Massip, 2001; Tarvis, 2013).

Kriyoprotektanlar, hücre dondurulması sonucu oluşabilecek intrasellüler kristal oluşumu, soğuk şokuna, dondurma-çözme sonrası dekrizalizasyonuna ve membransal destabilizasyona karşı koruyucu olarak kullanılır. Dondurulma öncesi kriyoprotektanlar kullanılarak hücre inkübasyona tabi tutulur ve hücrenin intrasellüler olarak dengeye gelmesi sağlanır. Kriyoprotektanlar düşük molekül ağırlığına sahip olmasıyla oldukça önem arz etmektedir ve toksik etkisinin olmasına rağmen belirli oranlara kadar kullanılabilirler (Palasz ve Mapletopt, 1996; Blesbois ve Brillar, 2007; Bucak ve Tekin, 2007; Tarvis, 2013; Tunalı, 2014). Dondurma-çözme uygulamaları sırasında maddelerin yoğunluk değişimlerinden dolayı hücrede sıvı kaybı meydana gelebilir. Meryman ve ark. (1977), her hücrenin bir maksimum sıvı kaybetme kapasitesine sahip olduğunu, bu kapasitenin aşılması durumunda hücrenin ölebileceğini “Minimum hücre teorisi” ile açıklamıştır. Ayrıca ortaya çıkan faz değişimleri enzim aktivitelerinde değişime yol açması sonucu dondurma-çözme sonrası canlılık oranını düşürmektedir. Bu duruma soğutma zararı (cryoinjury) olarak adlandırılmaktadır (Mcgann, 1978; Watson, 1995; Palasz ve Mapletopt, 1996; Holt, 2000b; Watson, 2000; Bucak ve Tekin, 2007; Tarvis, 2013).

Bu çalışma ile Ahi Evran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Kümes Hayvanları Ünitesinde yetiştirilen 5 adet Amerikan bronz hindiden alınan semenin DMSO kriyoprotektanı kullanılarak 4 farklı sulandırıcının dondurma-çözme sonrası yapılacak değerlendirme ile hindi semeninin uzun süreli muhafaza yöntemlerinin araştırılması ve geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, hindilerden alınan semnelere ait nativ sperma değerleri, sulandırma sonrası sperma değerleri ve dondurma-çözme sonrası sperma değerleri araştırılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. KONU İLE İLGİLİ YAPILAN ÇALIŞMALAR

Sexton ve Giesen (1982), yaptıkları bu çalışmada kullanılan BPSE (Beltsville Poultry Semen Extender) sulandırıcısının farklı pH (6,5 ve 7,5) ve mOsm (280 ve 355) kombinasyonlarında spermanın kısa süreli saklanması incelediler. Sulandırılmış sperm 6 saat boyunca 15°C’ de 6 saat boyunca bekletilmiş ve suni tohumlama yapılarak fertilité oranları karşılaştırılmıştır. Kullanılmak üzere BPSE’ den pH: 6, mOsm: 280 ve pH: 7,5, mOsm: 280 değerlerinde iki sulandırıcı kullanıldı ve pH değeri yüksek olan sulandırıcının daha verimli olduğu saptandı. Osmolaritesi 350 olarak ayarlanan sulandırıcı için ise pH farklılığı önemli bulunmamıştır. Fakat saklanmış ve saklanmamış semenlerde motilité değerleri pH’ ı 7,5 olan sulandırıcı pH’ı 6,5 olan sulandırıcıdan daha verimli bulunmuştur. Ayrıca 6 saat boyunca 15°C’ de depolanan pH: 7,5 değerli sulandırıcı, depolanmadan kullanılan semenlere göre daha az fertilizasyona sahip olmuştur. Her iki durumda da fertilitesi değişmeyen pH:6,5 değerindeki sulandırıcıdır. Sonuç olarak, osmolarite ve pH farklılıklarının motilité ve fertilité üzerinde etkili olduğu saptanmıştır. Semenlerin saklanması için 6,5 pH değerinin ideal olduğu belirtilmiştir.

Keskin ve ark. (1995), yaptıkları bu çalışmada Erbro ırkı horozlara ait spermaların dondurma-çözme sonrası spermatolojik özelliklerine farklı sulandırıcıların etkisini araştırmışlardır. Spermatolojik özellikleri 1) ejakülat miktarı 0,5±0,6 ml 2) motilité %87,7±0,9 3) sperma yoğunluğu 2,2x10⁹±0,1 sp/ml 4) anormal spermatozoa %5,0±0,6 ve 5) pH 7,4±0,1 şeklinde tespit edilmiştir. BPSV-I sulandırıcısına eklenmiş % 5 Gliserol ve % 5 DMSO kriyoprotektanlı denemede motilité ve anormal sperm oranları sırasıyla % 36,7±2,6 ve % 17,4±2,1 olarak bulunmuştur. Diğer taraftan % 8 Gliserol ve % 4 DMSO kriyoprotektanı içeren BPSV-II sulandırıcısı için %41,7±2,1 ve %21,7±2,8 olarak bulunmuştur. Eşit oranlarda Gliserol ve DMSO eklenmiş Ringer-I ve Ringer-II sulandırıcılar için motilité ve anormal sperm değerleri sırasıyla %46,7±1,9, %18,2±1,1 ve %44,2±1,9, %23,8±2,9 olarak bulunmuştur. Motilité bitiş süreleri ise termorezistens uygulamasında BPSV-I ve II için 2-2,5 saatte gerçekleşirken Ringer-I ve II için 4.

saatte gerekleŒmiŒ olup kontrol amaçlı yer alan nativ sperma motilitesi 6. saatte son bulmuŒtur.

Seigneurin ve Blesbois (1995), yaptıkları alıŒmada kumes hayvanları semeninin dondurma-çözme iŒlemleri için geliŒtirilmiŒ olup kriyoprotektan olarak Gliserol kullanmıŒlardır. Dondurma oranının etkileri, motilite, vitalite, sperm morfolojisi ve fertilite oranları hesaplanmıŒtır. Değerlendirmeler aŒılama sonrası 2, 3 ve 4 günlerde yapılmıŒtır. Genel olarak tohumlama, 5-6 haftalarda ikiŒer kez ardıŒık bir Œekilde uygulanmıŒtır. Deney 1: -1, -5, -10 ve -15°C/dk'ya alınarak 4 parametre üzerinden değerlendirilmiŒtir. En iyi sonuçlar -5 ve -10°C/dk oranlarında elde edilmiŒtir. Deney 2: spermlerin fertilite yeteneği için -5, -7 ve -10°C/dk oranlarında dondurma iŒlemi uygulanmıŒ ve en iyi fertilite -7°C/dk ile elde edilmiŒtir. DondurulmuŒ-özölmüŒ spermlerin dölleme yeteneği önemli ölçüde yeterli bulunmuŒtur (%76 döllemiŒ oosit). Sonuç olarak, gliserol kullanılarak yapılan ve yaklaŒık ±300 milyon spermin aŒılandığı bu alıŒmada vitalite ve fertilite oranlarının oldukça yüksek olduğu saptanmıŒtır.

Akçay ve ark. (1997), California ırkı geniŒ göğüslü 32 haftalık yaŒta beyaz hindilerden 5 adet kullanmıŒlardır. Buna göre ortalama ejakülat miktarı 0.24±0.02 ml, ortalama motilite % 75.22±1.90, ortalama sperm yoğunluğu 5.36±0.42 x10⁹/ml, ortalama anormal spermatozoa oranı % 8.29±0.65 ve sperm ortalama pH değeri 7.87±0.04 olarak belirlenmiŒtir. S-2, Ringer, Avian, FTS ve yağsız süt sulandırıcıları ile sulandırılmıŒ spermalar +4°C' de bekletilmiŒtir. Bekletilen sulandırılmıŒ spermalar 7 saat sonra ıkarılmıŒ ve ortalama motilite değeri sırasıyla % 29.0±5.26, % 41.0±1.80, % 7.0±2.71, % 32.5±5.01, % 2.0±1.11 olarak belirlenmiŒtir. Kontrol amaçlı bekletilen sulandırılmamıŒ spermanın ortalama motilite değeri ise % 6.0±6.0 olarak bulunmuŒtur. Sulandırıldıktan sonra +4°C' de 7 saat bekletilmiŒ spermelere ait pH değeri ise 7.45±0.09, 6.37±0.05, 7.21±0.21, 6.46±0.08, 6.43±0.05 olarak bulunmuŒtur. Sulandırılmadan bekletilen sperm için pH değeri 7.47±0.08 olarak belirlenmiŒtir.

Chalah ve Brillard (1998), kumes hayvanlarına ait spermaların in vitro koŒullarda uzun vadeli ve kısa vadeli depolama tekniklerini araŒtırmak amacıyla iki farklı boyama tekniği kullanarak incelemiŒtir (eosin-nigrosin ve SYBR-14/PI).

Alınan semenler dondurma-çözme sonrası ve taze semenin in vitro koşullarda (4°C)' de 0 dk, 30 dk, 2 saat, 4 saat ve 24 saat (T0, T30, T2, T4 ve T24) olmak üzere farklı bekletme süreleri uygulanarak yapılan çalışmada elde edilen verilere göre; 0°C' de dondurulmamış ejakülat, ilk aşamalarda (30 dk) semen viabilite ve motalitesi SYBR-14/PI boyasının eosin-nigrosin (P<0,05) boyasından daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. Çözdürme sonrası her iki teknik karşılaştırılabilir fakat 4 saat (T4) için çözdürme sonrası in vitro depolamada cansız sperma sayısı SYBR-14/PI tekniğinde oldukça yüksek olduğu (P<0,05) gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, her iki tekniğin karşılaştırılabilir sonuçlarını elde edebilmek için dondurma-çözme sonrası in vitro bekleme süresi 24 saat sonrasında yapılabilmiştir. Bu sonuçlara göre, her iki prosedür için taze semen ve dondurma-çözme uygulanmış, SYBR14/PI prosedürünün eosin-nigrosin prosedürüne göre daha etkili (ya da daha hızlı) olduğu gözlemlenmiştir.

Tselutin ve ark. (1999), yaptıkları bu çalışmada kümes hayvanları semeninin dondurulmasında kriyoprotektan olarak kullanılan Gliserol, DMA ve DMSO koruyucularını kullanmışlardır. Semen dondurulması payetlerde veya pelet şeklinde olup Gliserol veya DMA kullanılmıştır. En yüksek fertilitte oranı doğrudan sıvı azot içine konulmuş pelet şeklindeki DMA kullanılan semende görülmüştür. DMA kullanılan semenler -6°C' den (%92,7) veya 5°C' den (%84,7) alınarak ilave edilmiştir. Gliserol kullanılan ve payet içinde dondurulmuş semende yüksek fertilitte oranları saptanmıştır. 1dk ve 30dk ekilibrasyona alındıktan sonra dondurulmuş ve sırasıyla %53,7 ile %63,9 oranlarında fertilitte sağlanmış fakat pelet halinde DMA içeren semene oranla daha düşük değerler elde edilmiştir. En düşük fertilitte oranı ise DMA içeren ve payet içinde dondurulan semende görülmüştür (%26,7). Fertilitte oranlarına göre pelet halinde dondurulan spermelerde daha yüksek oranlar elde edilmiş olup DMA, gliserola göre daha üstün bir kriyoprotektan olduğu sonucuna varılmıştır. Karşılaştırmaya göre payet içerisinde dondurulmuş gliserol içeren semenden yüksek fertilitte oranı elde edilmesine rağmen pelet halinde dondurulmuş DMA içeren semen daha yüksek fertilitte oranı vermiştir. Sonuç olarak, DMA içeren pelet halinde dondurulmuş semende fertilitte oranı daha yüksek olmasına rağmen sperm bankaları için en güvenli yöntem Gliserol içeren semenin payet içinde dondurulmasıdır.

Blanco ve ark. (2000), yaptıkları çalışmada yerli tavuk (*Gallus domesticus*), yerli hindi (*Meleagris gallopavo*), kaya kartalı (*Aquila chrysaetos*), tavşancıl (*Hieraaetus fasciatus*), şah kartal (*Aquila adalberti*) ve gökdoğan (*Falco peregrinus*) türlerini kullanmışlardır. Bu çalışmada kriyoprotektanların osmotik stres, farklı konsantrasyonlarda dimetilasetamid (DMA), 1 saat ve 4 saat olmak üzere iki farklı ekilibrasyon süresi, 4°C ve 21°C olmak üzere iki farklı ekilibrasyon sıcaklığı ve ayrıca hızlı ve yavaş dondurma işlemleri yapılarak standart çözme protokolü uygulanmıştır. Bu boyamada, ≥ 800 mOsm' da yabancı türlere ($P < 0.05$) göre kümes hayvanlarında daha fazla canlılık olduğu gözlemlenmiştir. Farklı olarak yüksek ozmolarite (3000 mOsm) uygulanmış ve akabinde izotonik ortama alınıp incelendikten sonra şah kartal ve gökdoğanda normal değerler elde edilirken tavuk, hindi, kaya kartalı ve tavşancıl türlerinde vitalite değerlerinde azalma ($P < 0.05$) olduğu gözlenmiştir. Semenler, seyreltilmiş DMA (≥ 2.06 M) kullanılarak 4°C'de 1 saat süreyle ekilibrasyona tabi tutulmuş, kaya kartalı ve gökdoğan dışında diğer türlerde düşük vitalite ($P < 0.05$) gözlemlenmiştir. Sonuç olarak; hızlı ve yavaş dondurma, osmotik değişiklik, dengeleme süresi ve ekilibrasyon sıcaklığı gibi etkenlerin farklı kuş türlerinin değişik açılardan ele alınması gerektiği vurgulanmıştır.

Lukaszewicz (2001a), yaptığı çalışmada dondurma işlemi öncesinde filtrasyon ve seyreltici kullanılarak, semenin dış etkenlerden dolayı kirlenmesini minimum seviyeye düşürmek ve sperm motilitesi, morfolojisi ve fertilitesi üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Alınan semenler ikiye bölünerek bir kısmı filtre edildi. Her iki kısım semen EK sulandırıcısı ile 1:1 veya 1:0,5 oranlarında sulandırılmıştır. +4°C' de 15 dk boyunca ekilibrasyona tabi tutulmuştur. Son olarak %6 (v/v) oranında DMA kriyoptektanı eklenerek -140°C' de dondurulmuştur (60°C/dk). Yapılan çalışmada dondurma-çözme işlemi sonrası ortalama %35-42 arasında canlı sperm ve ışık mikroskobu altında hiç hasar görmeyen sperm oranı %10-15 olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre filtre edilmiş semenin filtre edilmemiş semene göre daha verimli olduğu saptanmıştır.

Lukaszewicz (2001b), yaptığı bu çalışmada 2 ve 3 yaşlarında Beyaz İtalyan kazlar kullanmış ve %6 DMF eklenmiş EK sulandırıcı ile dondurma işlemini

yapmıştır. Bu çalışmadaki amaç DFM kriyoprotektanının dondurma-çözme işlemlerinde farklı yaşlardaki kaz spermine etkisi ve fertilite üzerine etkisini araştırmaktır. Elde edilen sonuçlara göre kriyoprotektanın farklı yaş gruplarındaki kaz spermalarına etkisi önemsiz bulunmuş olup gruplar arasındaki herhangi bir fark bulunmamıştır. Ayrıca DMF kriyoprotektanının fertilite üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı saptanmıştır. 2 ve 3 yaşındaki kazlar için dondurma-çözme sonrası vitalite değerleri sırasıyla % 67,61±7,87 ve % 68,61±12,34 olarak bildirmişlerdir. Ayrıca kriyoprotektan kullanılarak dondurma-çözme sonrası ve kriyoprotektan kullanılmadan sulandırılıp aynı sperm oranlarından yapılan döllemelerde sırasıyla %92,9 ve %87,2 oranında fertilite elde edilmiştir.

Lukaszewicz (2002), dondurma yönteminin verimliliği üzerine yaptığı çalışmada beyaz İtalyan kaz semeni kullanmış olup, taze ve dondurma-çözme sonrası semenlerin motilite, sperm morfolojisi ve fertilite oranlarını değerlendirmiştir. Araştırmada 25 erkek kazdan dorso-abdominal yöntemle alınan semenler birleştirilmiş ve aynı cinsten 10 dişi kaz, 80µl' lik dozlarla aşılacaktır. Geriye kalan semenler %6 DMF eklenmiş EK sulandırıcısı ile 1:0,5 oranında sulandırılmış ve 15dk +4°C' de ekilibrasyona tabi tutulmuş olup dakikada 60°C olmak üzere -140°C' ye düşürülerek dondurulmuştur. Yapılan gözlemler sonucu taze spermada %50-60 pozitif yönde hareketlilik görülürken bu oran dondurma-çözme sonrası semende %40 civarındadır. Taze semenin ortalama toplam canlı sperma ve normal canlı sperma oranları sırasıyla %92,2-%68,4 iken dondurma-çözme sonrası oranlar %34,7-%14,1 olmuştur. Taze semenin aşılması sonrası haftalık 12 milyon sperm aşılacaktır ve bu spermler %88,24 dölleme yeteneğine sahiptir. Kuluçkalık yumurta oranı da %80,88 iken verimli yumurta oranı %91,67 olmuştur. Bu sonuçlara göre dondurulmuş spermlerin taze sperm kadar etkili olmadığı fakat haftada ikize uygulanmasıyla doğal aşılara benzer sonuçlar alınabileceği ve doğal aşım için yardımcı bir uygulama olabileceği vurgulanmıştır.

Lukaszewicz ve ark. (2003), farklı yaşlardaki beyaz İtalyan kazlar (*Anser anser* L.) üzerinde yaptıkları çalışmada, farklı yaşlardaki (1 yaş [n=11], 2 yaş [n=7], 3 yaş [n=9]) kazlara ait spermlerin dondurma-çözme prosedürüne uygunluğu ve duyarlılığını araştırmışlardır. EK ile seyreltilmiş semen, payetlere çekilerek %6'lık

dimetil-formamid içerisinde -140°C ' de 60dk dondurulmuş ve azot tankına alınmıştır. Çözdürme işleminde 60°C ' lik su banyosu kullanılmıştır. Semen alımları sonucuna göre ejakülat miktarları yaş ile ters orantılı olup yaş ilerledikçe ejakülat miktarı da düşmektedir (1 yaş: 0.21 ml, 2 yaş: 0.18 ml, 3 yaş: 0.14). Fakat sperm yoğunluğu ise yaş ile doğru orantılı olup yaş ilerledikçe sperm yoğunluğunun arttığı gözlemlenmiştir (1 yaş: $327 \times 10^6/\text{ml}$, 2 yaş: $431 \times 10^6/\text{ml}$, 3 yaş: $547 \times 10^6/\text{ml}$). Vitalite değerleri ise, 1 yaştaki kazlarda düşük oranlarda bulunmuş fakat 2 ve 3 yaşındaki kazlarda önemli oranlarda olduğu saptanmıştır (1 yaş: %26.61, 2 yaş: %41.54, 3 yaş: %35.9). Dondurma-çözme sonrası normal sperm değerleri ise sırasıyla şöyledir: 1 yaş: %37.7, 2 yaş: %43.3, 3 yaş: %40.9. Sonuç olarak, yaşlı bireylerde motilite, vitalite ve normal sperm değerleri 1 yaşındaki bireylere göre daha anlamlı ($P < 0.01$) bulunmuştur.

Han ve ark. (2005), ördek semeninin ticari amaçlı kullanılması, yerli genetik kaynakların korunması ve ıslah çalışmalarında kullanılmak amacıyla yaptıkları bu çalışmada, semenin dondurulması için uygulanan kriyoprotektanlar, ekilibrasyon süresi ve çözme sıcaklığı gibi etkenler göz önünde bulundurularak optimum sulandırıcılar belirlemeyi amaçlamışlardır. Bu çalışmada 7 farklı sulandırıcı, 8 farklı çözme sıcaklığı, 4 farklı ekilibrasyon süresi denenmiştir. 1. denemede, %14 potasyum sitrat, %1,4 sodyum glutamat, %0,9 disodyum hidrojen fosfat, %0.21 sodyum dihidrojen fosfat, %0,7 glikoz ve %0,7 inositol içeren sulandırıcının diğer altı sulandırıcıdan daha iyi sonuç verdiği görülmüştür. 2. denemede, dondurarak saklama işlemlerinde en iyi kriyoprotektanı belirlemek için farklı oranlarda gliserol, DMSO, DMA ve DMF koruyucuları kullanılmış ve en iyi sonucu %10 DMSO içeren sulandırıcı vermiştir. 3. denemede, farklı sürelerde ekilibrasyon ve farklı sıcaklıklarda çözme denenmiş olup en iyi sonuç 15dk ekilibrasyon süresi ve 40°C çözme sıcaklığı en iyi sonucu vermiştir.

Tuncer ve ark. (2006), yaptıkları bu çalışmada 31 adet Denizli horozu kullanmış ve haftada iki kez olmak üzere alınan spermaların belirli özelliklerini in vitro ortamda incelemişlerdir. Alınan spermalarda ejakülat miktarı, sperma yoğunluğu, sperm motilitesi, anormal spermatozoa oranı, ölü spermatozoa oranı ve semen pH değerlerini sırasıyla $0,70 \pm 0,01$ ml, $2,38 \pm 0,03 \times 10^9/\text{ml}$, % $72,32 \pm 0,80$, %

7,33±0,18, % 21,65±0,81 ve 7,68±0,01 olarak bulmuşlardır. Çalışma boyunca toplamda 558 sağım yapılmıştır. Bu sağımlarda anormal spermatozoa tipleri, akrozom %0,39±0,03, baş kısmı % 1,06±0,03, orta kısım % 2,32±0,05 ve kuyruk bozuklukları % 2,53±0,04 olarak belirlenmiştir.

Akçay ve ark. (2007), yaptıkları bu çalışmada 5 adet hindi kullanılmış ve haftada iki defa olmak üzere masaj yöntemiyle sağım yapılmıştır. Bu çalışmanın amacı farklı sulandırıcılar kullanarak sulandırıcıların sperm motilitesi üzerindeki etkilerini incelemektir. Spermatolojik özelliklerden ortalama ejakülat miktarı 0.28±2.8 ml, sperm yoğunluğu $5.1±0.34 \times 10^9$ sp/ml, motilite ise % 84.8±1.12 olarak bulunmuştur. Spermatolojik özellikler belirlendikten sonra semenler birleştirilmiş ve 4 ayrı parçaya bölerek % 10 DMSO kriyoprotektanı içeren Graham sulandırıcısı, Glikoz, Ringer ve Tris-Glikoz sulandırıcıları kullanılmıştır. Sulandırılan semenler +4°C' de 90dk alışıma bırakıldıktan sonra -120°C azot buharında 15 dakika boyunca dondurulmuş ve -196°C' lik sıvı azot içerisinde depolanmıştır. Dondurma-Çözme sonrası motilite değerleri Graham % 31±2.4, Glikoz % 40.5±2.8, Ringer % 17±2.0, Tris-Glikoz % 11±1.4 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre dondurarak saklama yönteminde Glikoz sulandırıcısının diğer sulandırıcılardan daha verimli olduğu tespit edilmiştir (p<0.001).

Blanco ve ark. (2008), hindi (*Meleagris gallopavo*) ve Kanada turnası (*Grus canadensis*) türleri üzerinde yaptıkları bu çalışmada hipertonic koşullar altında sperm canlılığını etkileyen potansiyel faktörleri incelemişlerdir. Sperm osmotoleransı (300-3000 mOsm/kg) değerlendirilmeden önce: 1) 4°C ve 21°C'de olmak üzere 2dk, 10dk, 45dk ve 60dk için dört farklı süre boyunca ekilibasyon uygulaması 2) ön ekilibasyonda 4°C ve 21°C'de DMA ile DMSO kullanılmıştır. 3) membranın Na⁺/K⁺ ile Na⁺/H⁺ iyonik geçişleri çift yönlü olarak engellenmiştir. Turna spermi yüksek hipertonsite (3000 mOsm/kg) koşullar altında canlı kalabilirken hindi sperması normal hipertonsitede (500 mOsm/kg) canlı kalabilmiş ve bu durumda türlere özgü farklılıkların etkisi gözlemlenmiştir. Hindi sperm osmotoleransı 4°C ile 21°C arası denemelerde, düşük inkübasyon sıcaklıklarında daha az gelişmiş olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak, hipertonic şartlar altında hindi ve turna arasındaki osmotolerans farkının türlere özgü olduğu, bunun yanı sıra maruz kalınan sıcaklık ve

sürenin canlılığı etkilediği gözlemlenmiştir. Farklılık olarak bu türlerde osmotik geçişlerin rolü bağımsızdır.

Siudzinska ve Lukaszewicz (2008), dört farklı kanatlı hayvan ırkı üzerinde yaptıkları çalışmada, sulandırıcıların ve depolama sürelerinin sperm morfolojisi üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Sulandırıcı olarak; Lake sulandırıcısı, Lukaszewicz EK sulandırıcısı ve Tselutin ve ark. tarafından kullanılan sulandırıcı kullanılmıştır. Hayvan materyali olarak yeşil bacaklı keklik, siyah minorca, beyaz tepeli siyah fizan tavuğu ve İtalyan kekligi kullanılmıştır. Taze semenin spermatolojik özellikleri saptandıktan sonra 1:4 sulandırılarak 3, 6 ve 24 saat için 4°C’ de saklanmıştır. Depolama sonrası yapılan incelemelerde ölü spermalarda artış, sperma ve kuyruklarında bükülmede artış ve canlı oranında düşüş gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, EK sulandırıcısı normal şartlarda kaz semeni için kullanılmasına rağmen diğer kanatlı hayvanlarda da kullanılabileceği ve canlı sperma oranında en yüksek oranı verdiği saptanmıştır.

Makhafola ve ark. (2009), farklı ırklar kullanarak yaptıkları bu çalışmada kriyoprotektanların horoz sperminin motilite ve canlılığı üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Bu amaçla Beyaz Leghorn, Ovambo, Plymuth ırklarına ait horozlardan masaj yöntemiyle sperm sağımı yapılmıştır. Semenler sitratlı yumurta sarısı (EYC) ve EYC + %5 DMSO olmak üzere iki farklı sulandırıcı ile 1:2 oranında sulandırmışlardır. Sulandırma sonrasında 2 saat süreyle 5°C’ de ekilibrasyona bırakmışlardır. Ekilibrasyon sonrası payetler azot buharında (-80°C) 5 dakika boyunca donduruldu ve direkt olarak sıvı azot içerisine daldırıldı. Dondurulmuş payetler 5°C’ de çözüldü ve 0, 30, 60 ve 90dk süreyle bekletilen semenler değerlendirildi. Alınan sonuçlara göre tüm ırklar için taze-sulandırılmış semenlerde ve dondurma-çözme işlemi sonrası 30 ve 90dk bekletilmiş semenlerde sulandırıcıların anlamlı bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir. Fakat sonuç olarak dondurma-çözme işlemlerinin bütün ırklar üzerinde olumsuz etkiye neden olduğu belirtilmiştir.

Uysal ve ark. (2011), yaptıkları bu çalışmada kahverengi yumurtacı 6 saf hattan toplamda 42 adet olmak üzere 35 haftalık horozlar kullanılmıştır. Bu çalışmada ortalama ejakülat miktarları Line 54 için 0.7 ± 0.2 ml, Barred Rock 1 için

0.9±0.2 ml, Colombian Rock için 0.9±0.2 ml, Barred Rock 2 için 0.6±0.2 ml, için 0.8±0.2 ml ve Rhode Island Red 1 için 0.7±0.1 ml olarak bulunmuştur. Ortalama spermatozoa motilitesi ise Line 54 için % 85.1±8.2, Barred Rock 1 için % 87.6±7.7, Colombian Rock için % 87.6±12.2, Barred Rock 2 için % 87.6±7.0, Rhode Island Red 2 için % 84.4±10.4 ve Rhode Island Red 1 için % 85.0±9.0 olarak bulunmuştur. Spermatozoa yoğunluğu ise sırasıyla 3.1±1.0x10⁹/ml, 3.6±1.0x10⁹/ml, 2.8±0.8x10⁹/ml, 3.3±1.2x10⁹/ml, 3.3±1.1x10⁹/ml, 3.2±0.7x10⁹/ml olarak tespit edilmiştir. Ölü sperm oranı ise sırasıyla, % 14.0±7.0, % 13.5±5.9, % 14.6±9.5, % 12.0±3.9, % 15.2±7.1 ve % 14.7±6.4 iken anormal spermatozoa oranı sırasıyla %3.1±2.7, %3.0±2.1, %4.9±3.4, %4.5±3.5, %3.2±2.6, %4.8±4.3 olarak elde edilmiştir. Elde edilen semen pH değerleri ise sırasıyla 7.0±0.3, 7.0±0.2, 7.1±0.3, 7.0±0.3, 6.9±0.3, 7.0±0.3 olarak bulunmuş olup denemede çıkan bulgular bütün hatlardaki spermatolojik değerlerin normal sınırlar içerisinde olduğu ve sperm kalitelerinin iyi olduğu sonucuna varılmıştır.

Pandian ve Prabakaran (2012), yerli, BSW ve melez hindi ırklar kullanarak yaptıkları çalışmada 3 farklı kriyoprotektan kullanmışlardır. Çalışmada 0,25 ml' lik payetler kullanılmış ve semenler 5°C' de 1 saat ekilibrasyona bırakılmıştır. Sulandırma sonrası nativ sperma motilitesi ve dondurma-çözme sonrası motilitelerini karşılaştırmışlardır. %5 Gliserol kriyoprotektan kullanılan grupta dondurma öncesi %72,18±0,20, dondurma-çözme sonrası ise %28,88±0,09 ortalama motilite elde etmişlerdir. %5 Etilen glikol kullanılan grupta dondurma öncesi %68,71±0,12, dondurma-çözme sonrası ise % 16,47±0,10 ortalama motilite elde etmişlerdir. %7 Etilen Glikol kullanılan grupta ise dondurma öncesi % 65,08±0,07, dondurma-çözme sonrası ise % 19,77±0,09 ortalama motilite elde etmişlerdir. Dondurma-çözme sonrası sonuçlara göre kullanılan kriyoprotektanlar arası istatistik farklılık p<0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur.

Roushdy ve ark. (2014), iki tavuk ırkı (El-Salam ve Dokki-4) üzerinde yaptıkları çalışmada iki farklı sulandırıcı ve iki farklı kriyoprotektan kullanmışlardır. Sulandırıcı olarak Tris-yumurta sarısı ve sitratlı yumurta sarısı, kriyoprotektan olarak ise Gliserol ve DMA kriyoprotektanlarının 3 farklı oranlarını (% 3, % 7 ve % 10) kullanmışlardır. Tris-yumurta sarısı sulandırıcısı sitratlı yumurta sarısı

sulandırıcısından daha iyi sonuç vermiş olup dondurma-çözme sonrası motilite % 29.93 ± 0.53 ve vitalite 31.20 ± 0.52 olarak tespit edilmiştir. En iyi kriyoprotektan oranı ise her iki ırk için % 7 Gliserol ve % 3 DMA olarak tespit edilmiştir. Yapılan aşılama sonucunda ise % 3 DMA fertilite oranı % 28.42 iken % 7 Gliserol fertilite oranı ise % 37.76 bulunmuştur (El-Salam). Cıvciv çıkarma oranlarında ise % 3 DMA için % 88 iken % 7 Gliserol için % 37,76 olarak sadece El-Salam ırkında verim alınabilmiştir. Dokki-4 ırkı için herhangi bir cıvciv çıkışı olmadığını bildirmişlerdir.

3. MATERYAL METOD

3.1. MATERYAL

3.1. 1. Hayvan Materyali

Çalışmada Ahi Evran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Kümes Hayvanları ünitesinde yetiştirilen 5 adet 1 yaşındaki Amerikan bronz hindi (*Meleagris gallopavo*) kullanılmıştır. Hindiler 2m x 6m' lik kafeste barındırılıp damızlık hindi rasyonu ile beslendiler.



Şekil 3. 1. Denemede Kullanılan Hindilerden Bir Görünüm

3.1.2. Deneme Yeri ve Yılı

Deneme, Ahi Evran Üniversitesi Ziraat Fakültesi bünyesinde bulunan Histoloji-Embriyoloji laboratuvarı ve Ziraat Fakültesi Kümes Hayvanları Ünitesi hindi yetiştirme kafeslerinde gerçekleştirilmiştir.

3.1.3. Denemede Kullanılan Malzemeler

Azot Tankı (International Cryogenics; IC 20D): Sperm dondurma işlemleri için gerekli olan sıvı azotun taşınması ve depolanmasında kullanılmıştır.

Mikroskop (Leica DM750): Yapılan bu çalışmada, elde edilen spermlere ait bütün spermatolojik özelliklerin (ejekülat miktarı hariç) mikroskopik incelenmesi amacıyla kullanılmıştır.

Isıtma Tablası (Type D, Leica Mats) : Sperma motilite değerlerinin saptanabilmesi amacıyla mikroskop ek materyali olarak kullanılmıştır.

Eosine-Y Boyası: İncelenen spermatozoaların canlı-ölü oranını saptamak amacıyla kullanılmıştır (Merck; C.I. 45380).

DMSO (Dimethyl sulfoxide): Dondurma işlemleri amacıyla hazırlanan sulandırıcılara eklenmek üzere kriyoprotektan olarak kullanılmıştır (8.02912.1000; Merck, Darmstadt, Germany).

Poly (vinyl alcohol): Payetlerin açık ucundan sıvı giriş çıkışının engellenmesi amacıyla tıkaçıcı olarak kullanılmıştır (P8136-250G; Sigma-Aldrich).

Glikoz (D(+)-Glucose-monohydrate): Sulandırıcı hazırlamak için kimyasal olarak kullanılmıştır (1.08342.1000; Merck, Darmstadt, Germany).

Tris(hydroxymethyl)-aminomethane: Sulandırıcı hazırlamak için kimyasal olarak kullanılmıştır (1.08387.0500; Merck, Darmstadt, Germany).

Laktatlı Ringer: Sulandırıcı hazırlamak için kimyasal olarak kullanılmıştır (Eczacıbaşı-Baxter H.Ü. San. Ve Tic. A.Ş.).

SF (Serum Fizyolojik): Nativ spermaya ait spermatolojik özelliklerin saptanması amacıyla seyreltici ve fizyolojik ortam olarak kullanılmıştır (İzotonik Sodyum Klorür, Eczacıbaşı-Bakster H.Ü. San. Ve Tic. A.Ş.).

Hayem Solüsyonu: Sperm yoğunluğunun belirlenmesi esnasında homojen bir dağılımın sağlanması amacıyla seyreltici olarak kullanılmıştır (Norateks Kimya San. Tic. Ltd. Şti.).

Etil Alkol: Kullanılan malzemelerin sterilizasyonu amacıyla kullanılmıştır (Crystalline Chemical Industries Pvt. Ltd. 146-M Gulberg III, Lahore, Pakistan).

3.1.4. Denemede Kullanılmak Üzere Hazırlanan Sulandırıcılar ve Eosine-Y Boyası

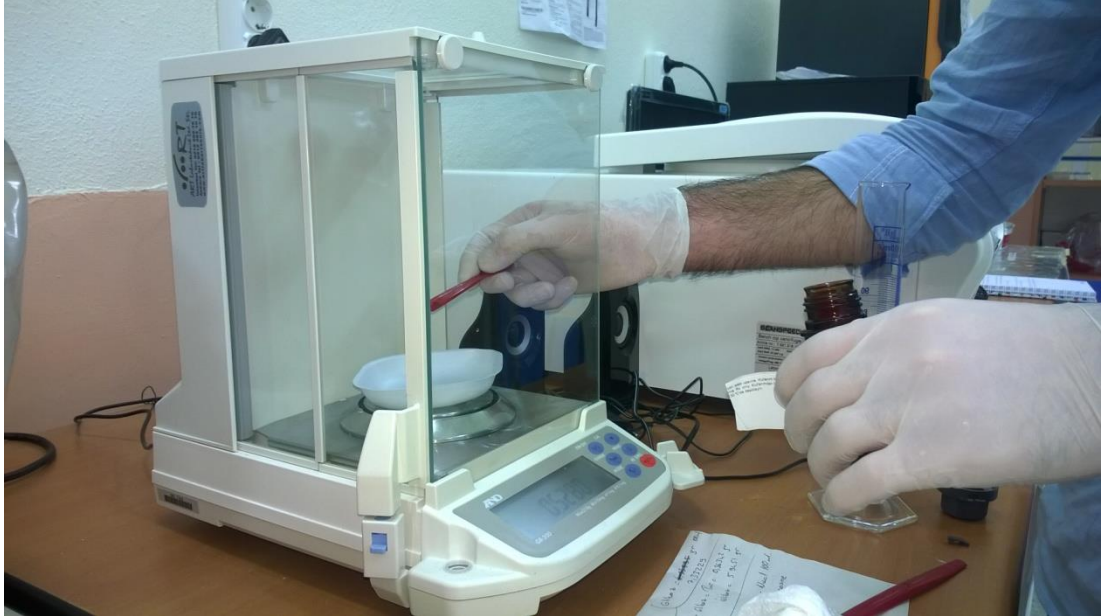
Glikoz Sulandırıcısı: %5(v/v) DMSO kriyoprotektanı içeren Glikoz (0,37M (D(+)-Glucose-monohydrate), 370 mOsm/L)

Tris-Glikoz Sulandırıcısı: %5(v/v) DMSO kriyoprotektanı içeren Tris-Glikoz (30mM/L Tris (hydroxymethyl)-aminomethane + 300mM/L D(+)-Glucose-monohydrate) (Akçay ve ark., 2007).

Laktatlı Ringer Sulandırıcısı: %5(v/v) DMSO kriyoprotektanı içeren LG (0,03 g potasyum klorür, 0,02 g kalsiyum klorür, 0,31 g sodyum laktat, 0,60 g sodyum klorür, 100 ml distile su için)

Laktatlı Ringer-Glikoz Sulandırıcısı: %5(v/v) DMSO kriyoprotektanı içeren LR-Glikoz (0,03 g potasyum klorür, 0,02 g kalsiyum klorür, 0,31 g sodyum laktat, 0,60 g sodyum klorür, 1 g D(+)-Glucose-monohydrate, 100 ml distile su için)

Eosine-Y Boyası: İlk aşamada 0,9 g NaCl 100 ml saf su içinde çözdürüldü. İkinci aşamada 0,5 g Eosine-Y boyası, 100 ml % 0,9 NaCl içerisinde çözdürüldü (Kadioğlu, 2011).



Şekil 3. 2. Kimyasal Madde Tartımına Ait Bir Görünüm

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Spermanın Masaj Yöntemi İle Alınması

Hindilerin dorso-abdominal masaj yöntemiyle sperm vermeye alışabilmeleri amacıyla çalışmadan 3-4 hafta öncesinden sağım yapılmaya başlandı.

Araştırma, alınan nativ ve sulandırılarak dondurulmuş semenin spermatolojik özelliklerinin saptanması amacıyla yapılmış olup 1 yaşındaki hindilerden haftada iki kez masaj yöntemi ile sperm sağımı yapıldı.

Sağım işlemi, hindi kafeslerinde gerçekleştirilmiş olup iki araştırmacı tarafından yapılmıştır. Sağım işleminin daha kolay yapılabilmesi için bir adet werzalit sandalye sağıma uygun bir şekilde modifiye edildi. Sandalyeye oturan araştırmacı, hindiyi kendi kucağında karın üstü yatırarak hindinin daha rahat sperm vermesi sağlandı. Sağım işlemini yapan araştırmacı, elin baş ve işaret parmaklarını kloakın her iki tarafına yerleştirdi. Diğer el ile abdomenin dorsal kısmına masaj yapıldı. Ereksiyona uğrayan papilladan daha önce kloakın her iki tarafına yerleştirilmiş olan baş ve işaret parmaklarıyla çok hafif sıkılarak sağım gerçekleştirildi. Sağılan sperma ikinci bir araştırmacı tarafından dışkı ile karışmayacak şekilde toplandı. Toplanan semenler sulandırma işlemine kadar 37°C'lik ortamda muhafaza edildi. Spermatolojik çalışmalar süresince hindilerden toplam 44 kez sperma alındı.



Şekil 3. 3. Sperm Sağımına Ait Görünümler

3.2.2. Spermatolojik Özelliklerin Belirlenmesi

3.2.2.1. Ejekülat Miktarı

5 adet hindiden masaj yöntemiyle elde edilen ejakülatlar 1 ml hacimli özel dereceli enjektör ile toplandı ve ejakülat miktarı ml cinsinden 0,1 ml hassasiyet ile ölçüldü. Sperm sağımı yapılırken ejakülat miktarını etkileyecek dışkı karışımı ve herhangi bir katı veya sıvı ve kan karışımının engellenmesi için azami özen gösterildi.



Şekil 3. 4. Sperm Sağımına Ait Bir Görünüm

3.2.2.2. Motilite

Sağımdan sonra elde edilen ejakülatlardan bir miktar semen küçük bir tüpe alınarak daha iyi gözlenebilmesi amacıyla 1:2 oranında SF ile sulandırıldı. Sulandırma sonrası ve dondurma-çözme sonrası motilite ölçümlerinde ekstra sulandırmaya ihtiyaç duyulmadı. Spermanın ısı şokuna karşı korunması için önceden ısıtılmış bir lam üzerine 5µl sulandırılmış semen konularak üzeri lamel ile kapatıldı.

Motilite, ısıtma tablalı mikroskopta x40 büyütme ile spermaların hareket kabiliyeti ve farklı şekilde hareket etmeleri göz önünde bulundurularak her birinden en az 200 sperm sayılmak suretiyle 3 farklı mikroskop sahasında incelendi ve % olarak ifade edildi.



Şekil 3. 5. Spermanın Mikroskopik İncelenmesi Sırasında Bir Görünüm

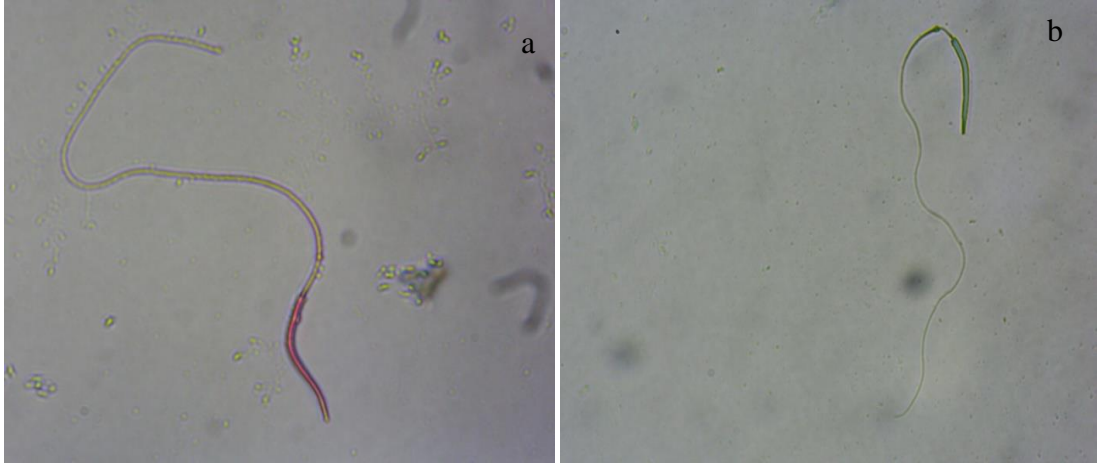
3.2.2.3. Sperm Yoğunluğu

Elde edilen ejakülatların birim hacimdeki sperm miktarı Hemositometrik yöntemle ölçüldü. Alınan bir miktar semen 1:500 olacak şekilde Hayem (Tekin, 1990) solüsyonu ile sulandırıldı. Sperm yoğunluğunun hemositometrik yöntemle ölçülebilmesi amacıyla Thoma lamı kullanılmıştır. Thoma lamı üzerinde bulunan iki sayım sahasından her birinden 5, toplamda 10 büyük karede sperm sayımı yapıldı. Sperma yoğunluğu $\times 10^9$ sp/ml olmak üzere Hemositometrik sayım denklemi ile hesaplandı. Hemositometrik sayım denklemi şöyledir:

$$Yoğunluk (\mu l) = \frac{\text{Sayılan Spermatozoa Sayısı}}{\text{Büyük Kare Alanı X Büyük Kare Yüksekliği X Sulandırma Oranı}}$$

3.2.2.4.Vitalite

Ejekülattaki canlı/ölü sperma oranının incelenmesi eosine boyama yöntemi (Kadioğlu, 2011) ile yapıldı. Preparatın incelenebilmesi için lam üzerinde 5µl sperm örneği 1:1 oranında eosin boyasıyla karıştırılarak üzeri lamel ile kapatıldı. Hazırlanan preparat 30 sn bekletildikten sonra faz-kontrat mikroskopta x100 büyütme ile 3 sahada olmak üzere her birinde en az 200 sperm sayılmasıyla canlı/ölü oranı hesaplandı ve vitalite oranı % olarak ifade edildi. Canlı spermalarda herhangi bir renk değişimi olmazken, ölü spermalarda Eosin-Y boyasının baş kısmını boyamasıyla tespit edildi. Vitalite değerleri nativ sperma, sulandırma sonrası ve dondurma-çözme sonrası olmak üzere 3 farklı şekilde değerlendirildi.



Şekil 3. 6. Boyanmış (a) ve Boyanmamış (b) Spermaların Mikroskobik Görünümü

3.2.3. Spermanın Sulandırılması ve Ekilibrasyon

Her bir hindiye ait nativ spermaların genel spermatolojik özellikleri ayrı ayrı belirlendikten sonra bütün semenler birleştirildi (pooling). Birleştirilen semenler hacimleri eşit olmak üzere 4 farklı tüpe alındı. Önceden hazırlanmış %5 DMSO içeren Glikoz, Tris-Glikoz, Laktatlı Ringer ve Glikoz-Laktatlı Ringer sulandırıcıları her bir tüpe 1:3 oranında (Akçay ve ark., 2007) (1 kısım semen: 3 kısım sulandırıcı) eklendi. Semenler sulandırıldıktan sonra, sulandırma sonrası motilite ve vitalite değerleri kayıt edildi ve payetlere alınarak +4°C' de 90dk süreyle ekilibrasyona tabi tutuldu.

3.2.4. Spermmanın Dondurulması Ve Çözülmesi

Sulandırılmış semenler payetler içerisinde 90dk boyunca $+4^{\circ}\text{C}$ ' de bekletildikten sonra 5dk süreyle -80°C ' ye kadar azot buharında donduruldu. Azot buharından çıkarılan payetler -196°C de sıvı azot içerisinde depolandı. Dondurma işleminden sonra payetler sıvı azot içerisinden çıkarılarak 30 sn boyunca 37°C ' lik su banyosunda tutularak çözündürme işlemi yapıldı.



Şekil 3. 7. Sperm Dondurma İşlemi Sırasında Bir Görünüm

3.4. VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Hindi spermının uzun süreli muhafaza yöntemlerinin araştırıldığı bu çalışmada nativ sperma özelliklerinden ejakülat miktarı, sperm yoğunluğu, motilite ve vitalite zaman bakımından ortalamaları arasındaki tanıtıcı değerler istatistik olarak

farklılık olup olmadığı tek faktörlü tekrarlanan deneme düzeni kullanılmıştır. Denemede kullanılan matematiksel model aşağıdaki gibidir;

$$Y_{ij} = \mu + \Pi_i + \alpha_j + \varepsilon_{ij}$$

Burada;

- μ : genel populasyon ortalaması,
- Π_i : i. deney ünitesinin rastgele (random) etkisi,
- α_j : j. periyodun etkisi
- ε_{ij} : j. muameledeki i. deney ünitesinin rastgele etkisidir (deney hatası).

Nativ spermatolojik özelliklerin saptanmasını takiben seyreltici olarak kullanılan farklı sulandırıcılar için sulandırma sonrası ve dondurma-çözme sonrası motilite ve vitalite değerleri zaman ve sulandırıcı faktörüne göre ortalamaları arasında tanıtıcı değerler hesaplanmıştır. İstatistik olarak farklılık olup olmadığı iki faktörlü, faktörlerden biri tekrarlanan deneme düzeni kullanılarak yapılmıştır. Denemede kullanılan matematiksel model aşağıdaki gibidir;

$$Y_{ijm} = \mu + \alpha_i + \Pi_{m(i)} + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \beta\Pi_{jm(i)} + \varepsilon_{l(ijm)}$$

(i=1,2,...,k ; j=1,2,...,p ve m=1,2,...,n_i)

Burada;

- μ : Genel ortalama ve populasyon ortalaması,
- α_i : A faktörünün i. seviyesinin etkisi
- $\Pi_{m(i)}$: A faktörünün i. seviyesinde yer alan m. deney ünitesinin rastgele etkisi,
- β_j : B faktörünün j. seviyesinin etkisi,
- $\alpha\beta_{ij}$: A ve B faktörleri arasındaki interaksiyon etkisi,
- $\beta\Pi_{jm(i)}$: A faktörünün i. seviyesinde yer alan, B faktörü ile deney ünitesi arasındaki interaksiyon ve
- $\varepsilon_{l(ijm)}$: rastgele hata etkisidir.

Hangi grup ortalamalarının farklı olup olmadığı Duncan çoklu karşılaştırma yöntemiyle harflendirilerek gösterilmiştir (Duncan, 1955; SPSS, 2008).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. NATİV SPERMA

4.1.1. Ejekülat Miktarı

Araştırmada kullanılan 5 adet Amerikan bronz hindilerden toplamda 44 kez sağım yapılmıştır. Ejekülat miktarlarına ait tanımlayıcı değerler Tablo 4.1.' de verilmiştir.

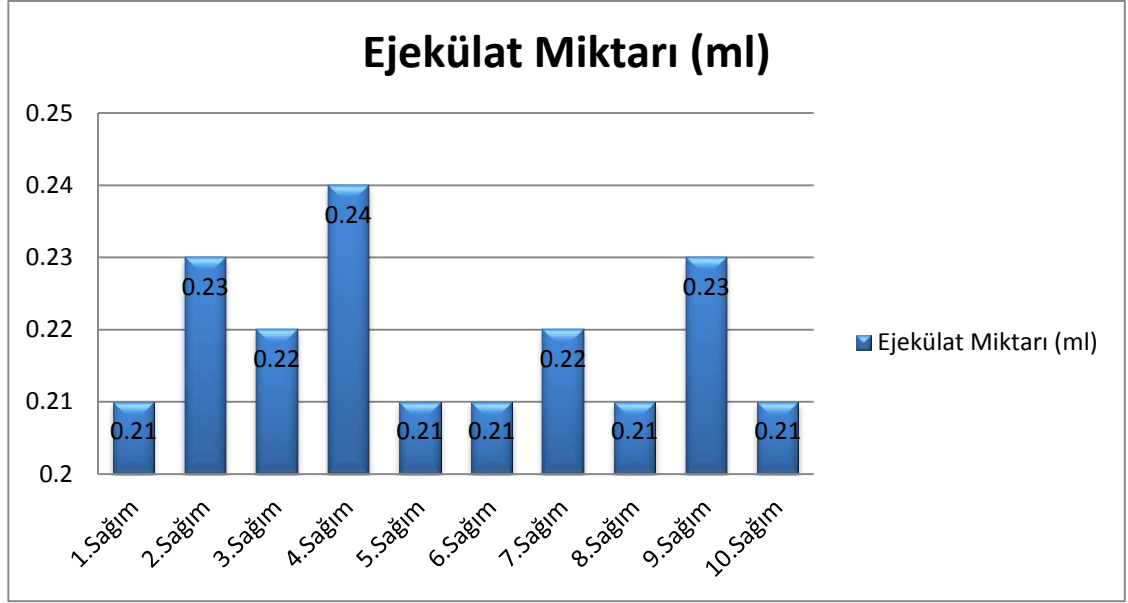
Tablo 4.1. Nativ Sperma Ejekülat Miktarlarına Ait Değerler

Zaman	N	$\bar{x} \pm S_x$	Min.	Max.	CV
1.Sağım	5	0,21±0,34	0,17	0,26	16,32
2. Sağım	5	0,23±0,42	0,18	0,28	18,19
3. Sağım	5	0,22±0,40	0,16	0,26	18,46
4. Sağım	5	0,24±0,47	0,18	0,31	19,25
5. Sağım	5	0,21±0,45	0,16	0,27	21,87
6. Sağım	5	0,21±0,21	0,18	0,23	10,07
7. Sağım	5	0,22±0,41	0,16	0,27	18,46
8. Sağım	3	0,21±0,00	0,21	0,21	0,00
9. Sağım	3	0,23±0,59	0,19	0,30	25,11
10. Sağım	3	0,21±0,23	0,20	0,24	10,83
Genel Ort.	44	0,22±0,04	0,16	0,31	16,75

Zaman: F=0,488; p=0,864

Nativ sperma ejekülat miktarları sağım zamanları bakımından istatistik olarak $p>0,05$ düzeyinde önemli bulunmamıştır (Tablo 4.1).

Çalışmada kullanılan hindi semeni ejekülat miktarlarına ait ortalama değerler Şekil 4.1.' de verilmiştir.



Şekil 4. 1. Nativ Sperma Ejekülat Miktarı Ortalama Değerleri

Hindilerden elde edilen spermalara ait ejakülat miktarları arasındaki istatistik fark zaman bakımından $p>0,05$ düzeyinde önemsiz bulunmuştur. Yapılan sağımlarda elde edilen verilere göre ejakülat miktarı genel ortalaması $0,22\pm0,04$ ml olarak tespit edilmiştir. En yüksek ejakülat miktarı 4. sağımda $0,24\pm0,47$ ml olarak tespit edilirken bunu $0,23\pm0,42$ ml ve $0,23\pm0,59$ ml değerleri ile 2. ve 9. sağımlar, $0,22\pm0,40$ ml ve $0,22\pm0,41$ ml değerleri ile 3. ve 7. sağımlar takip etmektedir. En düşük ejakülat miktarı ise $0,21\pm0,34$, $0,21\pm0,45$, $0,21\pm0,21$, $0,21\pm0,0$, $0,21\pm0,23$ ml ile 1, 5, 6, 8, ve 10. sağımlarda tespit edilmiştir.

Woodard ve Alplanalp (1967), hindilerden elde ettiği ejakülat miktarını 0,5-0,18 ml olarak bildirmiştir. Lake ve Stewart (1978) ise ağır hindilerden 0,1-0,33 ml, hafif hindilerden ise 0,08-0,3 ml olarak bildirmişlerdir. Ayrıca Ilgaz ve Tekin (1990), aynı ırklardan elde ettiği ejakülat miktarını $0,16\pm0,05$ ml, Akçay ve ark. (2007) ise $0,28\pm2,8$ ml olarak bildirmişlerdir. Besulin (1981), geniş göğüslü hindilerden ortalama ejakülat miktarı 0,29 ml, Nestor ve Brown (1971), iki gün arayla aldıkları ejakülatlarda ortalama 0,15, 3-4 gün aralıklarla aldıkları ejakülatlarda 0,21-0,24 ml değerlerini elde etmişlerdir. Akçay ve ark. (1997), ejakülat miktarını $0,24\pm0,02$, Surai ve Wishart (1996) ise 0,25-0,4 ml olarak bildirmişlerdir. Bu denemede elde edilen ortalama ejakülat miktarı $0,22\pm0,04$ ml olup, Woodard ve Alplanalp (1967), Lake ve Stewart (1978), Ilgaz ve Tekin (1990) ve Nestor ve Brown (1971)

araştırmacılarının elde ettikleri bulgular ile uyumlu bulunmuştur. Akçay ve ark. (2007), Besulin (1981), Akçay ve ark. (1997) ve Surai ve Wishart (1996) araştırmacılarının elde ettikleri bulgulardan daha düşük değerlerde bulunmuştur. Birçok araştırmacının belirttiği üzere ejakülat miktarlarındaki farklılıklar yaş, ırk, sağım sıklığı, ısı, ışık, nem ve genetik gibi etkenlere göre değişebildiğini bildirmişlerdir (Ashizawa ve Sano, 1990; Keskin ve ark., 1995; Donoghue ve Wishart, 2000; Türkoğlu ve ark., 2005; Bakst ve Dymond, 2013).

4.1.2. Sperm Yoğunluğu

Araştırma boyunca kullanılan 5 hindiden elde edilen semenlere ait sperm yoğunluğuna ait tanımlayıcı değerler Tablo 4.2.'de verilmiştir.

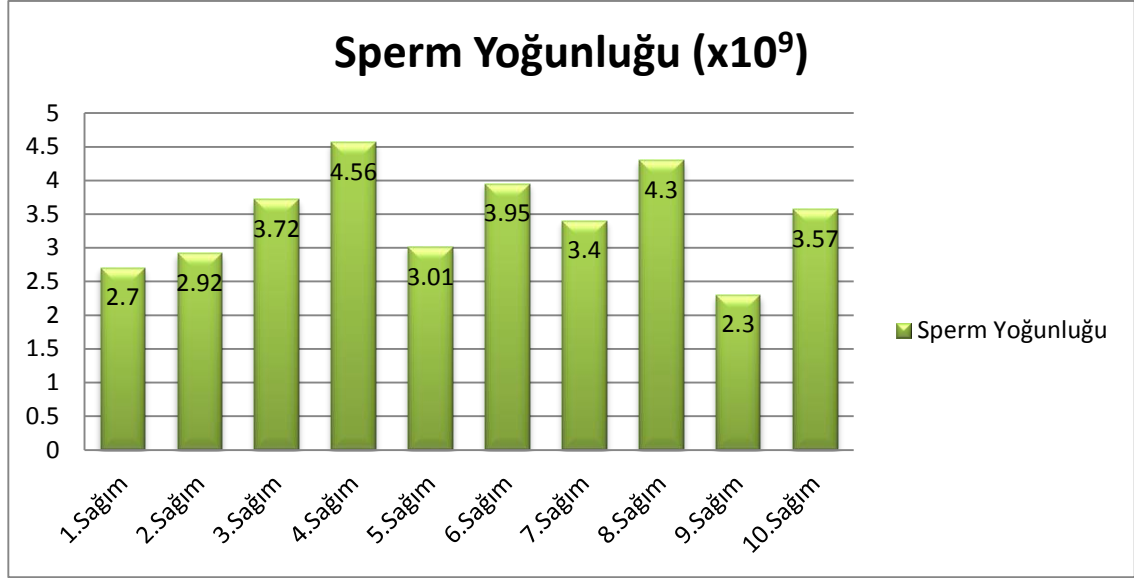
Tablo 4.2. Nativ Spermaya Ait Sperm Yoğunluğuna Ait Değerler

Zaman	N	$\bar{x} \pm S_x$	Min.	Max.	CV
1.Sağım	5	2,70±0,99	1,49	3,67	36,80
2. Sağım	5	2,92±0,22	2,64	3,25	7,59
3. Sağım	5	3,72±0,59	3,21	4,49	15,91
4. Sağım	5	4,56±0,95	3,42	6,04	20,90
5. Sağım	5	3,01±0,94	2,06	4,27	31,12
6. Sağım	5	3,95±1,57	2,21	5,33	39,81
7. Sağım	5	3,40±1,65	2,17	6,22	48,50
8. Sağım	3	4,30±1,30	3,45	5,79	30,19
9. Sağım	3	2,97±0,37	2,65	3,38	12,62
10. Sağım	3	3,57±0,83	2,89	4,50	23,29
Genel Ort.	44	3,5±1,13	1,49	6,22	32,18

Zaman: F=1,143; P=0,384

Nativ Sperma Sperm Yoğunluğu için sağım zamanları bakımından istatistik olarak $p>0,05$ düzeyinde önemli bulunmamıştır (Tablo 4.2).

Çalışmada kullanılan hindi semeni sperm yoğunluğuna ait ortalama değerler Şekil 4.2.'de verilmiştir.



Şekil 4. 2. Nativ Spermalara Ait Sperm Yoğunluğu Ortalama Değerleri

Elde edilen spermalara ait sperm yoğunluğu sağım zamanları arasındaki istatistik farkı $p > 0,05$ düzeyinde önemsiz bulunmuştur. Bu sonuçlara göre sperm yoğunluğu genel ortalaması $3,5 \pm 1,13 \times 10^9$ sp/ml olarak bulunmuştur. En yüksek sperm yoğunluğu $4,56 \pm 0,95 \times 10^9$ sp/ml ile 4. sağımda tespit edilmiştir. Bunu $4,30 \pm 1,30 \times 10^9$, $3,95 \pm 1,57 \times 10^9$, $3,72 \pm 0,59 \times 10^9$, $3,57 \pm 0,83 \times 10^9$, $3,40 \pm 1,65 \times 10^9$, $3,01 \pm 0,94 \times 10^9$, $2,92 \pm 0,22 \times 10^9$, $2,97 \pm 0,37 \times 10^9$ ile 8, 6, 3, 10, 7, 5, 2 ve 9. sağımlar takip etmektedir. En düşük sperm yoğunluğu ise 1. sağımda $2,70 \pm 0,99 \times 10^9$ sp/ml olarak tespit edilmiştir.

Akçay ve ark. (2007), yaptığı çalışmada sperm yoğunluğunu $5,1 \pm 1,12 \times 10^9$ sp/ml, Ilgaz ve Tekin(1990), sperm yoğunluğunu $5,03 \pm 0,34 \times 10^9$ sp/ml, Woodard ve Alplanalp (1967) ise sperm yoğunluğunu $3,5-10,2 \times 10^9$ sp/ml olarak bildirmişlerdir. Ayrıca Mc-Cartney ve Brown (1958), bronz hindi, büyük beyaz hindi ve küçük beyaz hindi ırklarında elde ettiği sperm yoğunluklarını sırasıyla $7,0 \times 10^9$, $6,2 \times 10^9$ ve $6,8 \times 10^9$ sp/ml olarak bildirmişlerdir. Akçay ve ark. (1997), sperm yoğunluğunu $5,36 \times 10^9$ sp/ml olarak, Surai ve Wishart (1996) sperm yoğunluğunu $5,0-8,0 \times 10^9$ sp/ml olarak bildirmişlerdir. Elde edilen bulgular neticesinde ortalama sperm yoğunluğu genel ortalaması $3,5 \pm 1,13 \times 10^9$ sp/ml olarak bulunmuş olup, Woodard ve Alplanalp (1967) tarafından elde edilen bulgular ile uyumlu bulunurken diğer araştırmacıların elde ettiği sonuçlardan düşük olduğu saptanmıştır.

4.1.3. Nativ Sperma Motilitesi

Araştırma boyunca hindilerden elde edilen nativ spermalara ait motilite tanımlayıcı değerleri Tablo 4.3.' te verilmiştir.

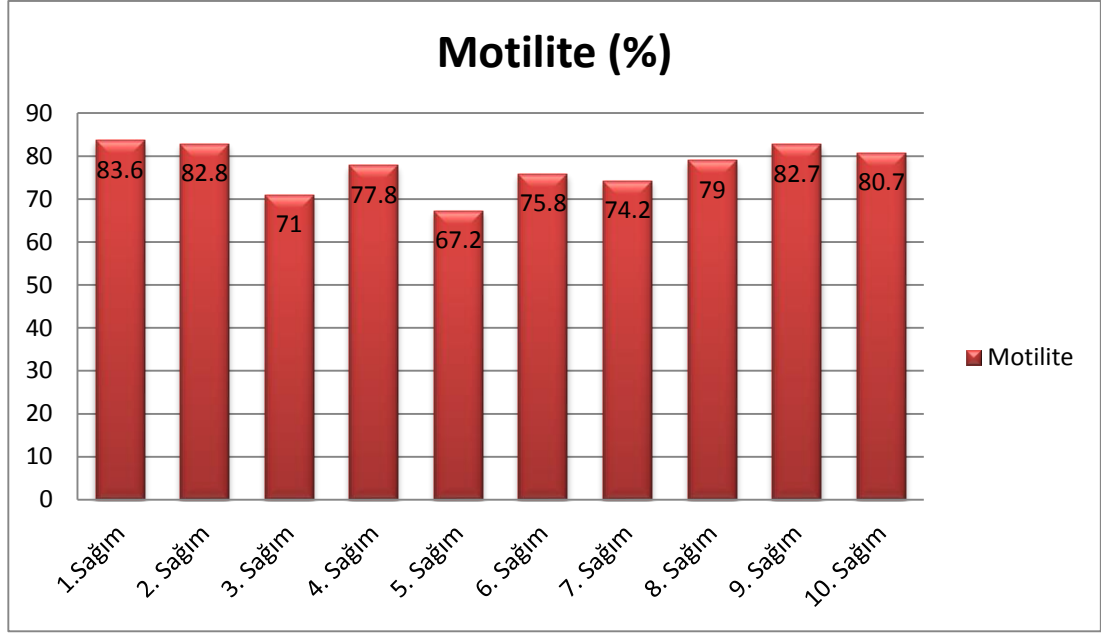
Tablo 4.3. Nativ Spermaya Ait Motilite Değerleri

Zaman	N	$\bar{x} \pm S_x$	Min.	Max.	CV
1. Sağıım	5	83,6±7,23	74,0	91,0	8,65
2. Sağıım	5	82,8±2,59	80,0	87,0	3,13
3. Sağıım	5	71,0±9,90	60,0	86,0	13,94
4. Sağıım	5	77,8±7,82	67,0	88,0	10,06
5. Sağıım	5	67,2±12,83	55,0	88,0	19,10
6. Sağıım	5	75,8±13,44	54,0	91,0	17,73
7. Sağıım	5	74,2±8,53	65,0	82,0	11,49
8. Sağıım	3	79,0±3,61	75,0	82,0	4,56
9. Sağıım	3	82,7±4,51	78,0	87,0	5,45
10. Sağıım	3	80,7±6,03	75,0	87,0	7,47
Genel Ort.	44	77,0±9,56	54,0	91,0	12,41

Zaman: F=1,178; P=0,365

Nativ Sperma Motilite değerleri için sağıım zamanları bakımından istatistik olarak $p>0,05$ düzeyinde önemli bulunmamıştır (Tablo 4.3).

Çalışmada kullanılan hindilere ait nativ sperma motilite ortalama değerleri Şekil 4.3.' de verilmiştir.



Şekil 4. 3. Nativ Sperm Motilitesi Ortalama Değerleri

Nativ spermalara ait motilite değerlerinin sağım zamanları arasındaki fark istatistik olarak $p>0,05$ düzeyinde önemsiz bulunmuştur. Nativ Sperm motilite genel ortalaması % $77,0\pm9,56$ olarak tespit edilmiştir. En yüksek motilite değeri % $83,6\pm7,23$ ile 1. sağımda elde edilmiştir. Bunu % $82,8\pm2,59$, % $82,7\pm4,51$, % $80,7\pm6,03$, % $79,0\pm3,61$, % $77,8\pm7,82$, % $75,8\pm13,44$, % $74,2\pm8,53$ ve % $71,0\pm9,90$ ile 2, 9, 10, 8, 4, 6, 7 ve 3. sağımlar takip etmektedir. En düşük nativ sperma motilite değeri ise % $67,2\pm12,83$ ile 5. sağımda elde edilmiştir.

Akçay ve ark. (2007), nativ sperma motilitesini % $84,8\pm0,34$ motilite, Besulin (1981), ayrı iki gruptan %90 ve %89 motilite ve Ilgaz ve Tekin (1990), % $67,69\pm2,36$ motilite olarak bildirmişlerdir. Stenova ve ark. (1983), üç farklı hibrit hindi hattından % $66,0\pm8,4$, % $75,6\pm6,0$ ve % $83,9\pm4,7$ olarak bildirmişlerdir. Ansah ve ark. (1984) ise, hindilerden haftalık 1, 3 ve 5 kez yapılan sağımlarda sırasıyla % $82,87\pm0,60$, % $80,39\pm0,76$ ve % $75,56\pm1,18$ motilite elde ettiklerini bildirmişlerdir. Akçay ve ark. (1997), nativ sperma motilitesini % 75,22 olarak bildirmiştir. Bu araştırmada elde edilen ortalama motilite % $77,0\pm9,56$ olup, Ilgaz ve Tekin (1990), Stenova ve ark. (1983), Ansah ve ark. (1984) ve Akçay ve ark. (1997) araştırmacılarının elde ettikleri bulgular ile benzerlik göstermektedir. Elde edilen sonuç Akçay ve ark. (2007) ve Besulin (1981) araştırmacılarının elde ettikleri sonuçlardan ise düşük bulunmuştur.

4.1.4. Nativ Sperma Vitalitesi

Araştırmada kullanılmak üzere hindilerden elde edilen nativ sperma vitalite tanımlayıcı değerleri Tablo 4.4.' da verilmiştir.

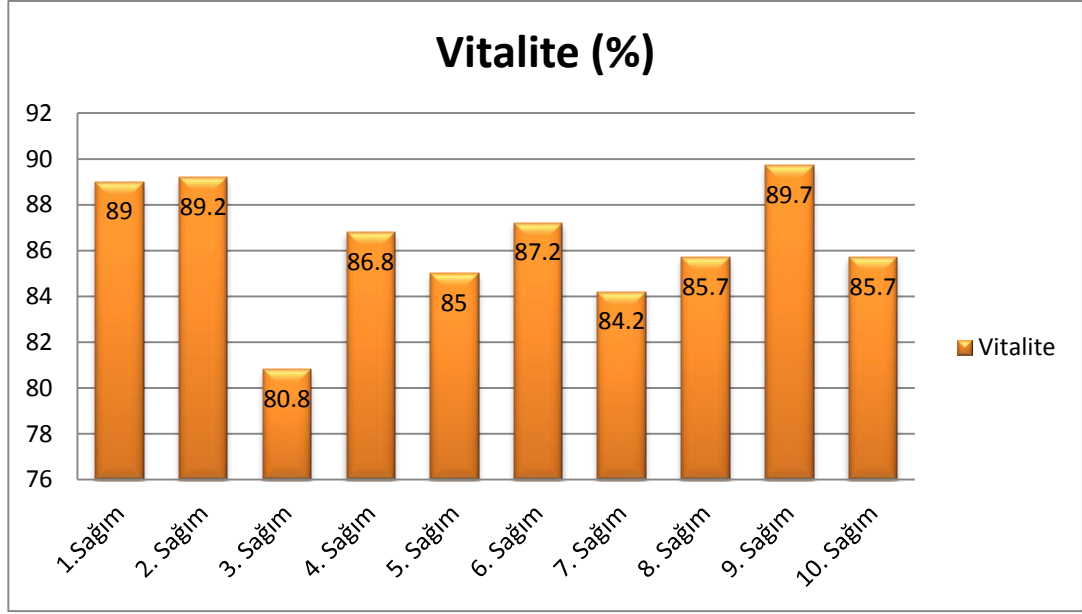
Tablo 4.4. Nativ Spermaya Ait Vitalite Değerleri

Zaman	N	$\bar{x} \pm S_x$	Min.	Max.	CV
1.Sağım	5	89,0±5,61	83,0	94,0	6,31
2. Sağım	5	89,2±1,79	87,0	91,0	2,01
3. Sağım	5	80,8±6,02	75,0	91,0	7,45
4. Sağım	5	86,8±7,69	77,0	95,0	8,86
5. Sağım	5	85,0±7,84	76,0	93,0	9,23
6. Sağım	5	87,2±7,63	75,0	96,0	8,75
7. Sağım	5	84,2±7,76	74,0	94,0	9,21
8. Sağım	3	85,7±5,13	80,0	90,0	5,99
9. Sağım	3	89,7±1,53	88,0	91,0	1,70
10. Sağım	3	85,7±7,02	79,0	93,0	8,20
Genel Ort.	44	86,2±6,28	74,0	96,0	7,29

Zaman: F=0,554; P=0,816

Nativ Sperma Vitalite değerleri için sağım zamanları bakımından istatistik olarak $p>0,05$ düzeyinde önemli bulunmamıştır (Tablo 4.4).

Çalışmada kullanılan hindilere ait nativ sperma vitalite ortalama değerleri Şekil 4.4.' de verilmiştir.



Şekil 4. 4. Nativ Sperm Vitalitesi Ortalama Değerleri

Nativ spermalara ait vitalite değerleri ise sağıım zamanları bakımından istatistik olarak $p>0,05$ düzeyinde önemsiz bulunmuştur. Nativ sperma genel vitalite ortalaması $\% 86,2\pm6,28$ olarak tespit edilmiştir. En yüksek vitalite değeri $\% 89,7\pm1,53$ ile 9. sağıımda elde edilmiştir. Bunu $\% 89,2\pm1,79$, $\% 89,0\pm5,61$, $\% 87,2\pm7,63$, $\% 86,8\pm7,69$, $\% 85,7\pm5,13$, $\% 85,7\pm7,02$, $\% 85,0\pm7,84$ ve $\% 84,2\pm7,76$ ile 2, 1, 6, 4, 8, 10, 5 ve 7. Sağıım takip etmiştir. En düşük nativ sperma vitalite değeri ise 3. sağıımda $\% 80,8\pm6,02$ olarak tespit edilmiştir.

Tai ve ark. (2001), kaz spermasının dondurulması üzerine yaptıkları çalışmada nativ sperma vitalite değerini $\% 83,0\pm4,5$ olarak bildirmişlerdir. Tselutin ve ark. (1999), yaptıkları çalışmada kümes hayvanlarına ait nativ spermaları Lake sulandırıcısı ile sulandırarak en yüksek vitalite değerini $\% 94\pm0,7$ olarak bildirmiştir. Rosato ve ark. (2012), hindilerden elde ettiği spermalardan $\% 84,48\pm0,45$ ortalama vitalite elde etmiştir. Elde edilen sonuçlara göre genel ortalama vitalite değeri $\% 86,2\pm6,28$ olup Tai ve ark. (2001) ve Rosato ve ark. (2012) araştırmacılarının elde ettikleri sonuçlardan yüksek veya uyumlu bulunurken Tselutin ve ark. (1999) elde ettikleri sonuçlardan daha düşük bulunmuştur.

4.2. SULANDIRMA SONRASI

4.2.1. Sulandırma Sonrası Motilitesi

Elde edilen nativ spermanın 4 farklı sulandırıcı ile sulandırma sonrasına ait motilite tanımlayıcı değerleri Tablo 4.5.' te verilmiştir.

Tablo 4.5. Sulandırma Sonrası Farklı Sulandırıcılara Ait Motilite Değerleri

Zaman	Glikoz					Tris-Glikoz					Laktatlı Ringer					L. Ringer-Glikoz					Genel				
	N	$\bar{x} \pm S_x$	Max	Min	CV	N	$\bar{x} \pm S_x$	Max	Min	CV	N	$\bar{x} \pm S_x$	Max	Min	CV	N	$\bar{x} \pm S_x$	Max	Min	CV	N	$\bar{x} \pm S_x$	Max	Min	CV
1. Sağım	3	78,0±3,61	82,0	75,0	4,62	3	56,7±5,69	63,0	52,0	10,03	3	78,3±12,58	90,0	65,0	16,06	3	77,3±0,58	78,0	77,0	0,75	12	72,6±11,37	90,0	52,0	15,67
2. Sağım	3	81,7±2,08	84,0	80,0	2,55	3	52,3±5,86	59,0	48,0	11,20	3	75,3±9,29	83,0	65,0	12,33	3	65,3±12,10	79,0	56,0	18,52	12	68,7±13,54	84,0	48,0	19,72
3. Sağım	3	84,3±4,16	89,0	81,0	4,94	2	56,5±13,44	66,0	47,0	23,78	3	67,3±10,60	77,0	56,0	15,74	3	87,7±2,52	90,0	85,0	2,87	11	75,6±14,33	90,0	47,0	18,97
4. Sağım	3	76,0±8,54	85,0	68,0	11,24	3	58,0±8,72	68,0	52,0	15,03	2	77,0±0,0	77,0	77,0	0,0	3	86,0±3,46	88,0	82,0	4,03	11	74,0±12,46	88,0	52,0	16,84
5. Sağım	3	85,0±10,44	92,0	73,0	12,28	3	64,3±5,69	69,0	58,0	8,84	3	83,7±6,03	90,0	78,0	7,20	3	86,0±3,46	90,0	84,0	4,03	12	79,8±11,03	92,0	58,0	13,83
6. Sağım	3	63,0±9,85	74,0	55,0	15,63	3	57,7±10,07	67,0	47,0	17,46	3	90,7±6,66	95,0	83,0	7,34	3	84,0±12,17	92,0	70,0	14,48	12	73,8±16,73	95,0	47,0	22,65
7. Sağım	3	82,7±4,04	85,0	78,0	4,89	3	55,3±12,22	66,0	42,0	22,08	3	72,3±5,77	79,0	69,0	7,98	3	82,0±3,46	84,0	78,0	4,22	12	73,1±13,08	85,0	42,0	17,90
8. Sağım	3	71,7±13,80	82,0	56,0	19,25	3	51,0±4,00	55,0	47,0	7,84	3	90,3±1,53	92,0	89,0	1,69	3	85,0±6,56	92,0	79,0	7,71	12	74,5±17,23	92,0	47,0	23,13
9. Sağım	3	83,0±14,80	93,0	66,0	17,83	2	58,0±9,90	65,0	51,0	17,07	3	84,3±5,03	89,0	79,0	5,97	3	90,0±6,00	96,0	84,0	6,67	11	80,7±14,16	96,0	51,0	17,54
10. Sağım	2	87,5±7,78	93,0	82,0	8,89	3	62,7±11,15	71,0	50,0	17,79	3	88,0±5,00	93,0	83,0	5,68	3	91,3±3,06	94,0	88,0	3,34	11	81,9±13,89	94,0	50,0	16,96
Genel	29	79,0±10,26 ^a	93,0	55,0	12,98	28	57,3±8,29 ^b	71,0	42,0	14,48	29	80,9±9,87 ^a	95,0	56,0	12,20	30	83,5±9,04 ^a	96,0	56,0	10,83					

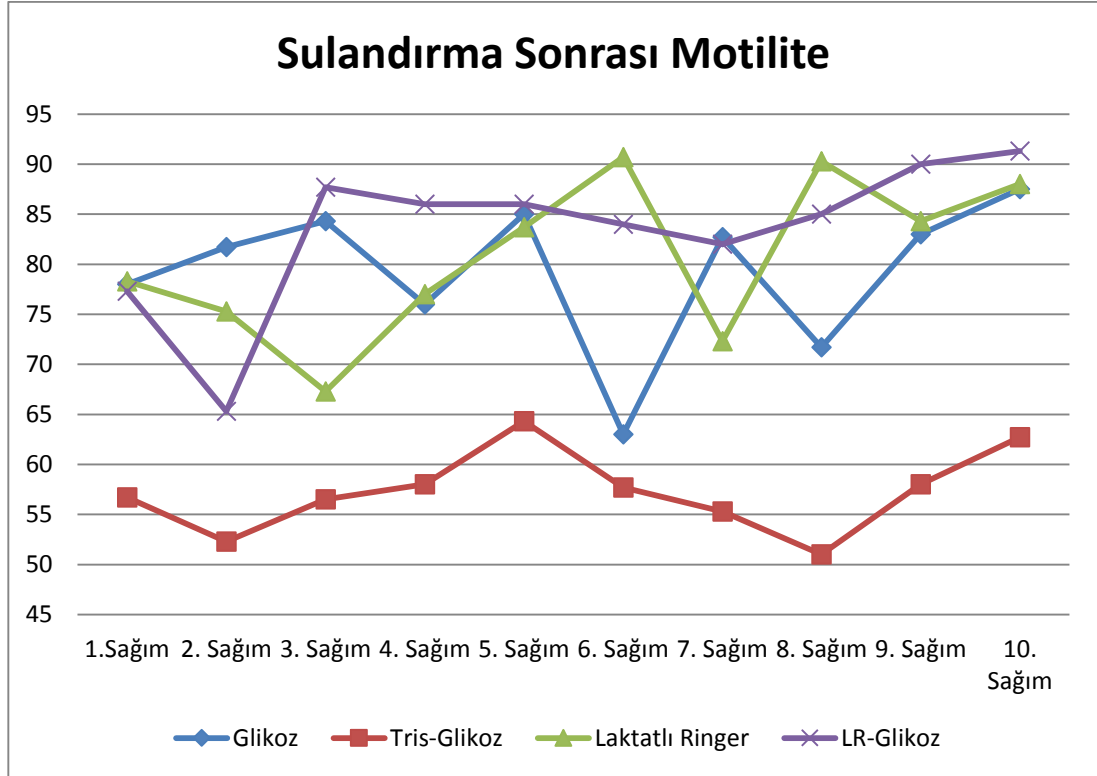
Zaman: F= 2,032; p=0,057 ZamanxSulandırıcı: F= 1,186; p=0,300 Sulandırıcı: F= 41,133; p=0,001**

**; 0,01 önem düzeyinde istatistik olarak önemlidir.

a-b: Aynı satırda da farklı harfi taşıyan sulandırıcı ortalamaları arasındaki fark istatistik olarak önemlidir.

Sulandırıcılar arasındaki fark istatistiksel açıdan $p < 0.01$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Zaman ve Zaman x Sulandırıcı arasındaki farklar istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır.

Sulandırma sonrası farklı sulandırıcılara ait ortalama motilite değerleri Şekil 4. 5.'de verilmiştir.



Şekil 4. 5. Farklı Sulandırıcılara Ait Sulandırma Sonrası Ortalama Motilite Değerleri

Yapılan sağımlar sonucu elde edilen semenler birleştirilmiş ve 4 farklı sulandırıcı ile sulandırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre Zaman ve Zaman x Sulandırıcı bakımından istatistik olarak bir fark bulunmamasına karşın Sulandırıcılar arasındaki fark $p < 0,01$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Bu sonuçlara göre en yüksek ortalama motilite değeri % $83,5 \pm 9,04$ ile L. Ringer-Glikoz sulandırıcısı olmuştur. Bu sulandırıcıyı takiben % $80,9 \pm 9,87$ ile L. Ringer ve % $79,0 \pm 10,26$ ile Glikoz sulandırıcısı olmuştur. En düşük ortalama motilite değeri ise % $57,3 \pm 8,29$ ile Tris-Glikoz sulandırıcısı olmuştur. İstatistiksel olarak Zaman açısından önemli bir fark olmamasına karşın en yüksek ortalama motilite değeri % $81,9 \pm 13,89$ ile 10. sağımda elde edilirken en düşük ortalama motilite değeri % $68,7 \pm 13,54$ ile 2.

sağımda elde edilmiştir. Sulandırıcılar içerisindeki istatistiksel fark ZamanxSulandırıcı açısından da önemli bulunmamıştır. Bu sonuçlara göre Glikoz sulandırıcısında en yüksek ortalama % 87,5±7,78 ile 10. sağımda iken en düşük ortalama motilite % 63,0±9,85 ile 6. sağımda elde edilmiştir. Tris-Glikoz sulandırıcısında en yüksek ortalama motilite % 64,3±5,69 ile 5. sağımda iken en düşük ortalama % 51,0±4,00 ile 8. sağımda elde edilmiştir. Laktatlı Ringer Sulandırıcısında en yüksek ortalama motilite değeri % 90,7±6,66 ile 6. Sağımda iken en düşük ortalama ise % 67,3±10,60 ile 3. sağımda elde edilmiştir. L. Ringer-Glikoz sulandırıcısında en yüksek ortalama motilite % 91,3±3,06 ile 10. sağımda iken en düşük ortalama % 65,3±12,10 ile 2. sağımda elde edilmiştir.

Akçay ve ark. (2007), %10 DMSO kullanarak yaptıkları çalışmada en yüksek sulandırma sonrası motilite değerini % 84±2,2 ile Ringer sulandırıcısında elde etmiştir. Han ve ark.(2005), 7 farklı sulandırıcı ve 4 farklı kriyoprotektan kullanarak yaptıkları çalışmada ördek semenlerine ait sulandırma sonrası motilite değerlerini her 7 sulandırıcı için %80 olarak tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Makhafola ve ark. (2009), üç farklı horoz ırkı üzerinde %5 DMSO kullanarak yaptığı çalışmada sulandırma sonrası motilite değerini Ovambo ırkında % 80±9,4, Potchefstroom Koekoek ırkında % 90±9,4 White Leghorn ırkında ise % 80±9,4 olarak bildirmişlerdir. Pandian ve Prabakaran (2012), yerli, beyaz ve melez hindilerde yaptıkları çalışmada, %9 Gliserol ile % 72,18±0,20, %5 Etilen Glikol ile %68,71±0,12, %7 Etilen Glikol ile % 65,08±0,07 ortalama motilite değerlerini bildirmişlerdir. Kowalczyk ve Lukaszewicz (2012), kazlarda yaptıkları çalışmada %6 DMF eklenmiş EK sulandırıcısı kullanılmış ve iki ayrı denemede %50,0 ±7,0 ve % 55,0±4,0 değerlerini saptamışlardır. Roushdy ve ark. (2014), farklı iki tavuk ırkı üzerine yaptıkları çalışmada en iyi sonucu %3 DMA ile % 59,23±0,54 olarak bildirmişlerdir. Gee ve ark. (1993), Amerikan Kerkenezi spermi ile yaptıkları çalışmada en iyi sonucu % 10 DMSO için % 77±9,0 olarak bildirmiştir. Akçay ve ark. (2006), yaptıkları çalışmada şeker bazlı sulandırıcılar kullanmış ve sulandırma sonrası en yüksek ortalama motilite değerini % 91,3±2,6 olarak bildirmiştir. Bakst ve Sexton (1979), BPSE ile sulandırılmış semenlerden hindiler için % 95 motilite elde etmiştir. Bu çalışmada en yüksek sulandırma sonrası motilite değeri % 83,5±9,04 ile LR-Glikoz sulandırıcısında bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek

sulandırma sonrası ortalama motilite değeri diğeri araştırmacıların elde ettikleri bulgular ile benzerlik göstermektedir.

4.2.2. Sulandırma Sonrası Vitalitesi

Araştırmada elde edilen spermalara ait sulandırma sonrası vitalite tanımlayıcı değeri Tablo 4.6.' de verilmiştir.

Tablo 4.6. Sulandırma Sonrası Farklı Sulandırıcılara Ait Vitalite Değerleri

Zaman	Glikoz					Tris-Glikoz					Laktath Ringer					L. Ringer-Glikoz					Genel				
	N	$\bar{x} \pm S_x$	Max	Min	CV	N	$\bar{x} \pm S_x$	Max	Min	CV	N	$\bar{x} \pm S_x$	Max	Min	CV	N	$\bar{x} \pm S_x$	Max	Min	CV	N	$\bar{x} \pm S_x$	Max	Min	CV
1.Sağım	3	86,0±7,21 ^{a-e}	92,0	78,0	8,39	3	80,7±2,52 ^{a-f}	83,0	78,0	3,12	3	82,0±7,21 ^{a-f}	90,0	76,0	8,79	2	84,5±0,71 ^{a-e}	85,0	84,0	0,84	11	83,2±5,21 ^{bc}	92,0	76,0	6,27
2. Sağım	3	89,7±2,52 ^{a-e}	92,0	87,0	2,81	3	77,7±9,02 ^{def}	87,0	69,0	11,61	3	82,3±9,81 ^{a-f}	88,0	71,0	11,92	2	70,0±0,0 ^f	70,0	70,0	0,0	11	80,8±9,35 ^c	92,0	69,0	11,57
3. Sağım	3	87,7±7,77 ^{a-e}	94,0	79,0	8,86	3	90,3±3,51 ^{a-e}	94,0	87,0	3,89	3	75,3±9,50 ^{ef}	85,0	66,0	12,62	3	92,0±3,00 ^{a-d}	95,0	89,0	3,26	12	86,3±8,82 ^{abc}	95,0	66,0	10,22
4. Sağım	3	82,7±4,93 ^{a-f}	86,0	77,0	5,97	3	91,7±5,77 ^{a-d}	95,0	85,0	6,30	3	84,0±5,29 ^{a-f}	90,0	80,0	6,30	2	91,5±2,12 ^{a-d}	93,0	90,0	2,32	11	87,1±6,04 ^{abc}	95,0	77,0	6,94
5. Sağım	2	90,0±2,83 ^{a-e}	92,0	88,0	3,14	3	88,7±10,97 ^{a-e}	95,0	76,0	12,37	3	88,3±6,43 ^{a-e}	93,0	81,0	7,28	2	91,0±1,41 ^{a-d}	92,0	90,0	1,55	10	89,3±6,18 ^{ab}	95,0	76,0	6,92
6. Sağım	2	75,5±16,30 ^{ef}	87,0	64,0	21,54	2	92,0±2,83 ^{a-d}	94,0	90,0	3,07	3	93,0±2,65 ^{abc}	96,0	91,0	2,84	3	88,7±5,51 ^{a-e}	94,0	83,0	6,21	10	88,0±9,24 ^{ab}	96,0	64,0	10,50
7. Sağım	3	86,7±7,51 ^{a-e}	94,0	79,0	8,66	3	84,7±9,87 ^{a-e}	96,0	78,0	11,65	3	78,3±11,50 ^{c-f}	90,0	67,0	14,69	3	88,7±3,51 ^{a-e}	92,0	85,0	3,96	12	84,6±8,40 ^{abc}	96,0	67,0	9,94
8. Sağım	3	78,7±7,64 ^{b-f}	87,0	72,0	9,71	3	90,0±0,0 ^{a-e}	90,0	90,0	0,0	3	95,3±0,58 ^a	96,0	95,0	0,61	3	90,3±2,08 ^{a-e}	92,0	88,0	2,30	12	88,6±7,22 ^{ab}	96,0	72,0	8,15
9. Sağım	3	87,0±6,93 ^{a-e}	91,0	79,0	7,96	3	91,0±5,29 ^{a-d}	95,0	85,0	5,81	3	90,0±5,00 ^{a-e}	95,0	85,0	5,56	3	94,3±1,16 ^a	95,0	93,0	1,22	12	90,6±5,11 ^a	95,0	79,0	5,64
10.Sağım	2	93,0±0,0 ^{abc}	93,0	93,0	0,0	3	90,3±7,37 ^{a-e}	96,0	82,0	8,16	3	90,7±4,04 ^{a-d}	95,0	87,0	4,46	3	93,7±3,21 ^{ab}	96,0	90,0	3,43	11	91,8±4,31 ^a	96,0	82,0	4,69
Genel	27	85,6±7,54	94,0	64,0	8,81	29	87,6±7,39	96,0	69,0	8,44	30	85,9±8,58	96,0	66,0	9,98	26	89,1±6,66	96,0	70,0	7,47					

Zaman: F= 5,161; p=0,000**, ZamanxSulandırıcı: F= 2,844; p=0,001** Sulandırıcı: F= 0,855; p=0,521

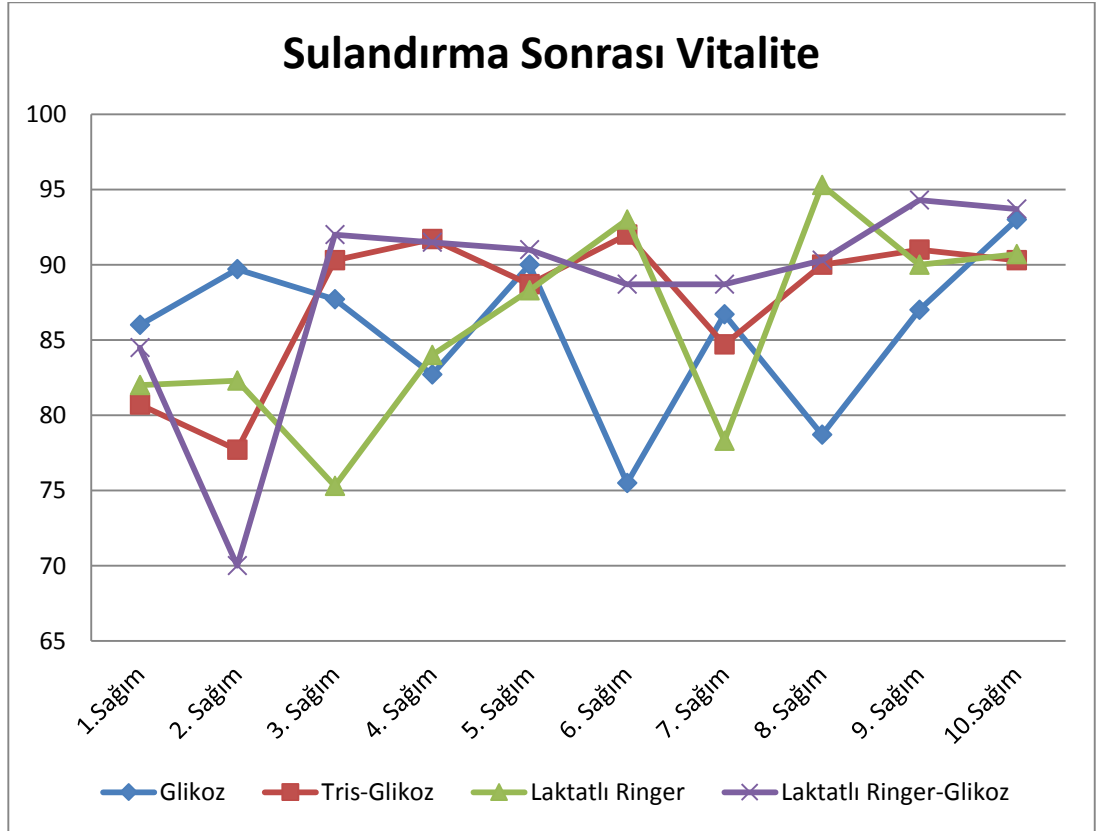
**; 0,01 önem düzeyinde istatistik olarak önemlidir.

a-c: Aynı sütunda farklı harfi taşıyan hafta ortalamaları arasındaki fark istatistik olarak önemlidir.

a-c: Aynı satırda farklı harfi taşıyan her hafta için sulandırıcı ortalamaları arasındaki fark istatistik olarak önemlidir.

Sulandırma sonrası farklı sulandırıcılara ait vitalite değerleri bakımından ZamanxSulandırıcı ve Zamanlar arasındaki fark istatistiksel açıdan $p<0.01$ düzeyinde önemli bulunurken, Sulandırıcılar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır.

Sulandırma sonrası farklı sulandırıcılara ait ortalama vitalite değerleri Şekil 4.6.' da verilmiştir.



Şekil 4. 6. Farklı Sulandırıcılara Ait Sulandırma Sonrası Ortalama Vitalite Değerleri

Sulandırma sonrası elde edilen verilere göre Sulandırıcılar arasındaki istatistik fark önemsiz bulunurken Zaman ve ZamanxSulandırıcı açısından istatistik fark $p<0,01$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Bu sonuçlara göre en yüksek ortalama vitalite değeri % $91,8\pm 4,31$ ile 10. sağıımda iken en düşük ortalama % $80,8\pm 9,35$ ile 2. sağıımda elde edilmiştir. İstatistiksel açıdan ZamanxSulandırıcı arasındaki fark önemli bulunmuş olup Glikoz sulandırıcısı için en yüksek ortalama vitalite değeri % $93,0\pm 0,0$ ile 10. sağıımda iken en düşük ortalama % $75,5\pm 16,30$ ile 6. sağıımda elde edilmiştir. Tris-Glikoz sulandırıcısı için en yüksek ortalama vitalite değeri %

92,0±2,83 ile 6. sađımda iken en dūřuk ortalama % 77,7±9,02 ile 2. sađımda elde edilmiřtir. Laktatlı Ringer sulandırıcısı için en yūksek ortalama vitalite deęeri % 95,3±0,58 ile 8. sađımda iken en dūřuk ortalama % 75,3±9,50 ile 3. sađımda elde edilmiřtir. L. Ringer-Glikoz sulandırıcısı için en yūksek ortalama vitalite deęeri % 94,3±1,16 ile 9. sađımda iken en dūřuk ortalama % 70,0±0,0 ile 2. sađımda elde edilmiřtir. Sulandırıcılar arasındaki fark ise istatistiksel açıdan önemli olmayıp en yūksek ortalama motilite deęeri % 89,1±6,66 ile L Ringer-Glikoz sulandırıcısı iken bunu takiben % 87,6±7,39 ile Tris-Glikoz, % 85,9±8,58 ile Laktatlı Ringer gelmektedir. En dūřuk ortalama vitalite deęeri ise % 85,6±7,54 ile Glikoz sulandırıcısı olmuřtur.

Makhafola ve ark. (2009), ũ farklı horoz ırkı ũzerinde %5 DMSO kullanarak yaptığı çalışmada sulandırma sonrası vitalite değerini Ovambo ırkında % 85±10,7, Potchefstroom Koekoek ırkında % 90±10,7, White Leghorn ırkında ise % 90±10,7 olarak bildirmişlerdir. Kowalczyk ve Lukaszewicz (2012), kazlarda yaptıkları çalışmada %6 DMF eklenmiş EK sulandırıcısı kullanılmış ve iki ayrı denemede % 83,2±7,0 ve % 80,7±7,4 değerlerini saptamışlardır. Roushdy ve ark. (2014), farklı iki tavuk ırkı ũzerine yaptıkları çalışmada en iyi sonucu % 3 DMA ile % 59,43±0,57 olarak bildirmişlerdir. Tselutin ve ark. (1999), yaptıkları çalışmada kũmes hayvanlarına ait nativ spermaları Lake sulandırıcısı ile sulandırarak Gliserol, DMA ve DMSO kriyoprotektanlarını eklemiş ve en yūksek sulandırma sonrası vitalite değerini % 4 Gliserol ile % 76±2,1 olarak bildirmiştir. Lukaszewicz (2001a), kazlar ũzerine yaptığı çalışmada DMA kriyoprotektanı ile filtrelenmiş spermada % 92,56±1,96, filtrelenmemiş spermada % 93,83±2,62 değerlerini bulmuştur. Elde edilen verilere göre en yūksek ortalama vitalite değeri %89,1±6,66 ile LR-Glikoz sulandırıcısında olup Makhafola ve ark. (2009), Kowalczyk ve Lukaszewicz (2012), Roushdy ve ark. (2014) ve Tselutin ve ark. (1999) araştırmacılarının elde ettikleri değerlerden yūksek veya benzer bulunmuştur.

4.3. DONDURMA-ZÖZME SONRASI

4.3.1. Dondurma-özme Sonrası Motilitesi

Elde edilen spermaların 4 farklı sulandırıcı ile dondurma-çözme sonrasına ait motilite tanımlayıcı değerleri Tablo 4.7.' de verilmiştir.

Tablo 4.7. Dondurma-Çözme Sonrası Farklı Sulandırıcılara Ait Motilite Değerleri

Zaman	Glikoz					Tris-Glikoz					Laktatlı Ringer					L. Ringer-Glikoz					Genel				
	N	$\bar{x} \pm S_x$	Max	Min	CV	N	$\bar{x} \pm S_x$	Max	Min	CV	N	$\bar{x} \pm S_x$	Max	Min	CV	N	$\bar{x} \pm S_x$	Max	Min	CV	N	$\bar{x} \pm S_x$	Max	Min	CV
1.Sağım	3	45,7±8,02	54,0	38,0	17,56	3	13,7±3,51	17,0	10,0	25,70	2	13,5±9,19	20,0	7,0	68,09	3	27,3±13,65	42,0	15,0	49,94	11	26,1±15,95	54,0	7,0	61,14
2. Sağım	3	42,3±2,52	45,0	40,0	5,94	3	10,7±3,79	15,0	8,0	35,49	3	9,3±2,52	12,0	7,0	26,96	3	23,7±4,93	27,0	18,0	20,84	12	21,5±14,19	45,0	7,0	66,0
3. Sağım	3	36,7±10,41	45,0	25,0	28,39	3	13,3±2,08	15,0	11,0	15,61	2	10,5±4,95	14,0	7,0	47,14	3	23,3±14,22	33,0	7,0	60,96	11	21,9±13,40	45,0	7,0	61,15
4. Sağım	3	44,0±8,00	52,0	36,0	18,18	3	8,3±0,58	9,0	8,0	6,93	3	15,0±3,00	18,0	12,0	20,0	3	25,0±8,66	35,0	20,0	34,64	12	23,1±14,98	52,0	8,0	64,90
5. Sağım	3	43,3±9,29	54,0	37,0	21,44	3	12,7±5,77	16,0	6,0	45,58	3	8,3±3,51	12,0	5,0	42,14	3	33,7±8,14	43,0	28,0	24,19	12	24,5±16,28	54,0	5,0	66,47
6. Sağım	2	40,0±0,0	40,0	40,0	0,0	3	15,7±4,04	20,0	12,0	25,80	3	13,0±3,00	16,0	10,0	23,08	3	21,7±9,45	29,0	11,0	43,62	11	21,0±11,09	40,0	10,0	52,81
7. Sağım	3	40,0±5,00	45,0	35,0	12,50	3	10,3±4,04	15,0	8,0	39,11	3	13,7±5,86	18,0	7,0	42,87	3	28,3±3,51	32,0	25,0	12,39	12	23,1±13,04	45,0	7,0	56,50
8. Sağım	3	49,7±15,70	62,0	32,0	31,60	3	9,3±3,21	13,0	7,0	34,44	3	14,7±7,51	22,0	7,0	51,17	3	18,3±5,51	22,0	12,0	30,04	12	23,0±18,23	62,0	7,0	79,24
9. Sağım	3	46,3±7,77	55,0	40,0	16,76	3	13,3±1,16	14,0	12,0	8,66	3	12,0±5,29	18,0	8,0	44,10	3	20,3±2,08	22,0	18,0	10,24	12	23,0±15,03	55,0	8,0	65,36
10.Sağım	3	44,0±15,10	60,0	30,0	34,32	3	14,7±2,08	17,0	13,0	14,19	3	15,7±5,69	22,0	11,0	36,30	2	24,5±3,54	27,0	22,0	14,43	11	24,7±14,85	60,0	11,0	60,07
Genel	29	43,3±8,73 ^a	62,0	25,0	20,17	30	12,2±3,63 ^c	20,0	6,0	29,78	28	12,6±4,89 ^c	22,0	5,0	38,76	29	24,6±8,26 ^b	43,0	7,0	33,55					

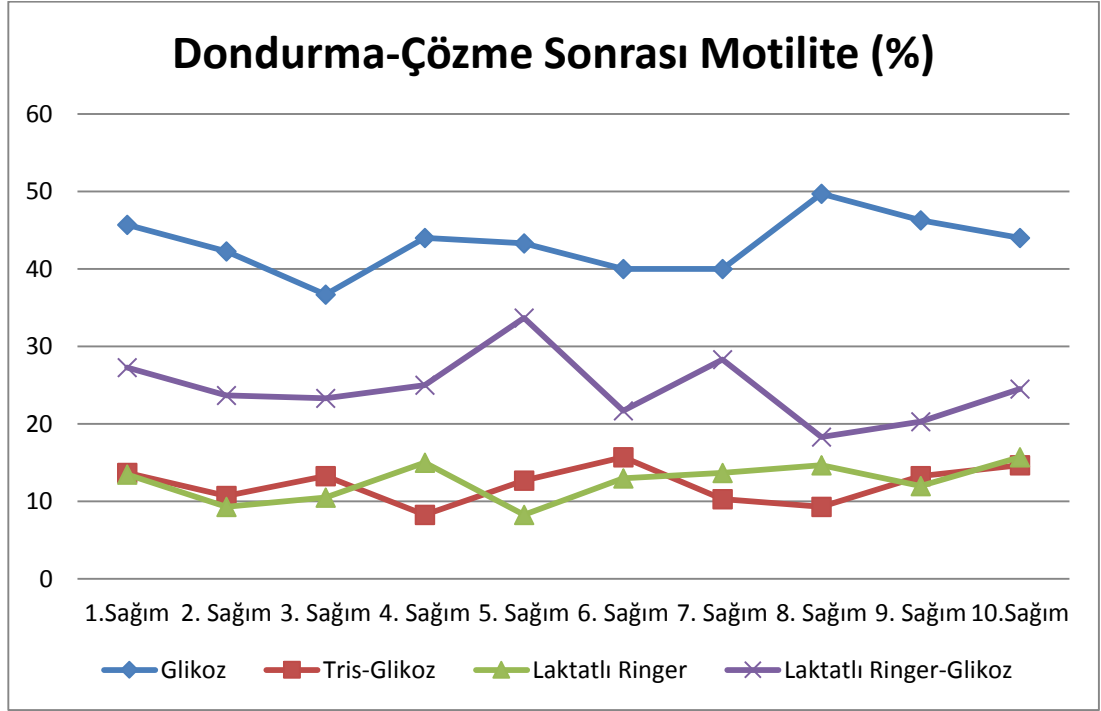
Zaman: F= 1,202; p=0,317, ZamanxSulandırıcı : F= 1,316; p=0,204, Sulandırıcı F= 146,172; p=0,000**

**; 0,01 önem düzeyinde istatistik olarak önemlidir.

a-c: Aynı satırda da farklı harfi taşıyan sulandırıcı ortalamaları arasındaki fark istatistik olarak önemlidir

Dondurma-Çözme sonrası farklı sulandırıcılara ait motilite değerleri bakımından sulandırıcılar arasındaki fark istatistiksel açıdan $p<0.01$ düzeyinde önemli bulunurken, ZamanxSulandırıcı ve Zamanlar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır.

Dondurma-Çözme sonrası farklı sulandırıcılara ait ortalama motilite değerleri Şekil 4.7.' de verilmiştir.



Şekil 4. 7. Farklı Sulandırıcılara Ait Dondurma-Çözme Ortalama Motilite Değerleri

Elde edilen spermaların sulandırma sonrası dondurma-çözme işlemlerinde kullanılan Sulandırıcılar arasındaki fark istatistik $p<0,01$ düzeyinde önemli bulunurken Zaman ve ZamanxSulandırıcı arasındaki farklar önemsiz bulunmuştur. Bu sonuçlara göre en yüksek ortalama motilite değeri % $43,3\pm 8,73$ ile Glikoz sulandırıcısında elde edilirken bunu takiben % $24,6\pm 8,26$ ile L. Ringer-Glikoz, % $12,6\pm 4,89$ ile Laktatlı Ringer ve en düşük ortalama % $12,2\pm 3,63$ ile Tris-Glikoz sulandırıcısında elde edilmiştir. İstatistiksel açıdan zamanlar arasındaki fark önemli olmayıp en yüksek ortalama motilite değeri % $26,1\pm 15,95$ ile 1. sağımda iken en düşük ortalama % $21,0\pm 11,09$ ile 6. sağımda elde edilmiştir. İstatistiksel açıdan ZamanxSulandırıcı arasındaki farklar önemsiz olup Glikoz sulandırıcısı için en yüksek ortalama motilite değeri % $49,7\pm 15,70$ ile 8. sağımda iken en düşük ortalama

% 36,7±10,41 ile 3. sağımda elde edilmiştir. Tris-Glikoz sulandırıcısı için en yüksek ortalama motilite değeri % 15,7±4,04 ile 6. sağımda iken en düşük ortalama % 8,3±0,58 ile 4. sağımda elde edilmiştir. Laktatlı Ringer sulandırıcısı için en yüksek ortalama motilite değeri % 15,7±5,69 ile 10. sağımda iken en düşük ortalama % 8,3±3,51 ile 5. sağımda elde edilmiştir. L. Ringer-Glikoz sulandırıcısı için en yüksek ortalama motilite değeri % 33,7±8,14 ile 5. sağımda iken en düşük ortalama % 18,3±5,51 ile 8. sağımda elde edilmiştir.

Akçay ve ark. (2007), yaptığı çalışmada Glikoz (300 mOsm/L) sulandırıcısına ek olarak %10 DMSO kriyoprotektanı kullanmış olup % 40,5±2,8 ile en yüksek motilite değerini elde etmiştir. Yapılan bu çalışmada ise Glikoz (370 mOsm/L) sulandırıcısına ek olarak %5 DMSO kullanılmış ve % 43,3±1,62 motilite ile en yüksek değer elde edilmiştir. Han ve ark.(2005), yaptıkları çalışmada ördek semeni ile farklı konsantrasyonlarda 4 kriyoprotektan kullanmış ve dondurma-çözme sonrası en yüksek sonuçları %10 DMSO konsantrasyonu için %58 motilite, %10 DMA konsantrasyonu için %49 motilite, %10 DMF konsantrasyonu için %42 motilite ve %8 Gliserol konsantrasyonu için %54 motilite olarak bildirmiştir. Graham (1982) %50 motilite, Makhafola ve ark. (2009), üç farklı horoz ırkı üzerinde %5 DMSO kullanarak yaptığı çalışmada dondurma-çözme sonrası motilite değerini çözme sonrası 0, 30, 60 ve 90dk bekletme sürelerine göre belirlemiştir. Bu sonuçlara göre sırasıyla Ovambo ırkı için % 45±4,7, % 35±4,0, % 20±3,7 ve % 7±3,6, Potchefstroom Koekoek ırkı için % 47±4,7, % 30±4,0, % 17±3,7 ve % 12±3,6, White Leghorn ırkı için % 40±4,7, % 20±4,0, % 15±3,7 ve % 12±3,6 olarak bildirmişlerdir. Pandian ve Prabakaran (2012), yerli, beyaz ve melez hindilerde yaptıkları çalışmada, %9 Gliserol ile % 28,88±0,09, %5 Etilen Glikol ile %16,47±0,10, %7 Etilen Glikol ile % 19,77±0,09 ortalama motilite değerlerini bildirmişlerdir. Keskin ve ark. (1995), Gliserol (%5 ve %8) ve DMSO (%5 ve %4) oranlarında kriyoprotektan kullanarak yaptıkları çalışmada sırasıyla BPSV-1 için %36,7±2,6, BPSV-2 için %41,7±2,1, Ringer-1 için %46,7±1,4, Ringer-2 için %44,2±1,9 değerlerini saptamışlardır. Kowalczyk ve Lukaszewicz (2012), kazlarda yaptıkları çalışmada %6 DMF eklenmiş EK sulandırıcısı kullanılmış denemede % 30,0±10,0 motilite saptamışlardır. Seigneurin ve Blesbois(1995), Gliserol kriyoprotektanı kullanmış ve %21-41 arası motilite elde etmişlerdir. Roushdy ve ark. (2014), farklı iki tavuk ırkı üzerine

yaptıkları çalışmada en iyi sonucu % 7 Gliserol ile % $36,07 \pm 1,16$ olarak bildirmişlerdir. Gee ve ark. (1993), Amerikan Kerkenezi spermi ile yaptıkları çalışmada en iyi sonucu % 6 DMSO için % 62 ± 10 olarak bildirmiştir. Bakst ve Sexton (1979), DMSO kullandıkları BPSE sulandırıcısı ile hindiler için % 40 diğer kümes hayvanları için % 55 motilite elde etmişlerdir. Elde edilen sonuçlar Akçay ve ark. (2007), Han ve ark. (2005), Makhafola ve ark. (2009), Pandian ve Prabakaran (2012), Keskin ve ark. (1995), Kowalczyk ve Lukaszewicz (2012), Seigneurin ve Blesbois(1995), Roushdy ve ark. (2014) ve Bakst ve Sexton (1979) araştırmacılarının elde ettikleri sonuçlardan yüksek veya benzer değerlerde bulunmuştur. Graham (1982) ve Gee ve ark. (1993) araştırmacılarının bulgularından ise düşük bulunmuştur.

4.3.2. Dondurma-Çözme Sonrası Vitalitesi

Araştırma boyunca elde edilen spermaların dondurma-çözme sonrası vitalite tanımlayıcı değerleri Tablo 4.8.' de verilmiştir.

Tablo 4.8. Dondurma-Çözme Sonrası Farklı Sulandırıcılara Ait Vitalite Değerleri

	Glikoz					Tris-Glikoz					Laktatlı Ringer					L. Ringer-Glikoz					Genel				
	N	$\bar{x} \pm S_x$	Max	Min	CV	N	$\bar{x} \pm S_x$	Max	Min	CV	N	$\bar{x} \pm S_x$	Max	Min	CV	N	$\bar{x} \pm S_x$	Max	Min	CV	N	$\bar{x} \pm S_x$	Max	Min	CV
1. Sağım	3	58,0±14,00	68,0	42,0	24,14	3	23,7±3,79	28,0	21,0	16,00	3	22,3±1,53	24,0	21,0	6,84	3	39,3±5,03	44,0	34,0	12,80	12	35,8±16,45	68,0	21,0	45,91
2. Sağım	3	55,7±8,62	65,0	48,0	15,49	3	22,3±2,52	25,0	20,0	11,27	2	15,5±3,54	18,0	13,0	22,81	3	39,0±1,73	40,0	37,0	4,44	11	34,7±16,58	65,0	13,0	47,75
3. Sağım	3	45,7±11,50	57,0	34,0	25,19	3	20,3±8,39	30,0	15,0	41,25	3	17,0±10,00	27,0	7,0	58,82	3	42,3±10,21	54,0	35,0	24,13	12	31,3±15,88	57,0	7,0	50,67
4. Sağım	3	60,3±13,28	68,0	45,0	22,01	3	20,0±2,00	22,0	18,0	10,00	3	22,7±7,02	30,0	16,0	30,99	2	34,5±3,54	37,0	32,0	10,25	11	34,4±18,77	68,0	16,0	54,63
5. Sağım	3	53,3±8,62	61,0	44,0	16,17	3	19,0±5,20	25,0	16,0	27,35	3	20,3±10,50	31,0	10,0	51,66	2	46,0±5,66	50,0	42,0	12,30	11	33,6±17,60	61,0	10,0	52,33
6. Sağım	3	57,0±7,00	65,0	52,0	12,28	3	31,3±9,02	40,0	22,0	28,78	3	23,3±4,93	29,0	20,0	21,14	3	33,7±2,89	37,0	32,0	8,57	12	36,3±14,18	65,0	20,0	39,02
7. Sağım	3	57,7±16,44	70,0	39,0	28,51	3	35,7±10,07	45,0	25,0	28,22	2	23,5±3,54	26,0	21,0	15,04	3	46,7±5,03	52,0	42,0	10,79	11	42,5±15,53	70,0	21,0	36,57
8. Sağım	3	60,7±10,02	72,0	53,0	16,51	3	15,3±7,37	21,0	7,0	48,07	3	23,7±1,53	25,0	22,0	6,45	3	25,0±8,66	35,0	20,0	34,64	12	31,2±19,33	72,0	7,0	62,02
9. Sağım	3	55,0±10,00	65,0	45,0	18,18	3	25,3±14,57	42,0	15,0	57,52	3	21,3±4,16	26,0	18,0	19,52	3	28,7±4,04	31,0	24,0	14,10	12	32,6±15,91	65,0	15,0	48,82
10. Sağım	3	54,7±11,37	64,0	42,0	20,80	3	25,3±5,69	30,0	19,0	22,45	3	23,7±6,66	31,0	18,0	28,13	3	32,3±5,13	38,0	28,0	15,87	12	34,0±14,46	64,0	18,0	42,53
Genel	30	55,8±10,34 ^a	72,0	34,0	18,53	30	23,8±8,68 ^c	45,0	7,0	36,41	28	21,5±5,82 ^c	31,0	7,0	27,12	28	36,5±8,42 ^b	54,0	20,0	23,06					

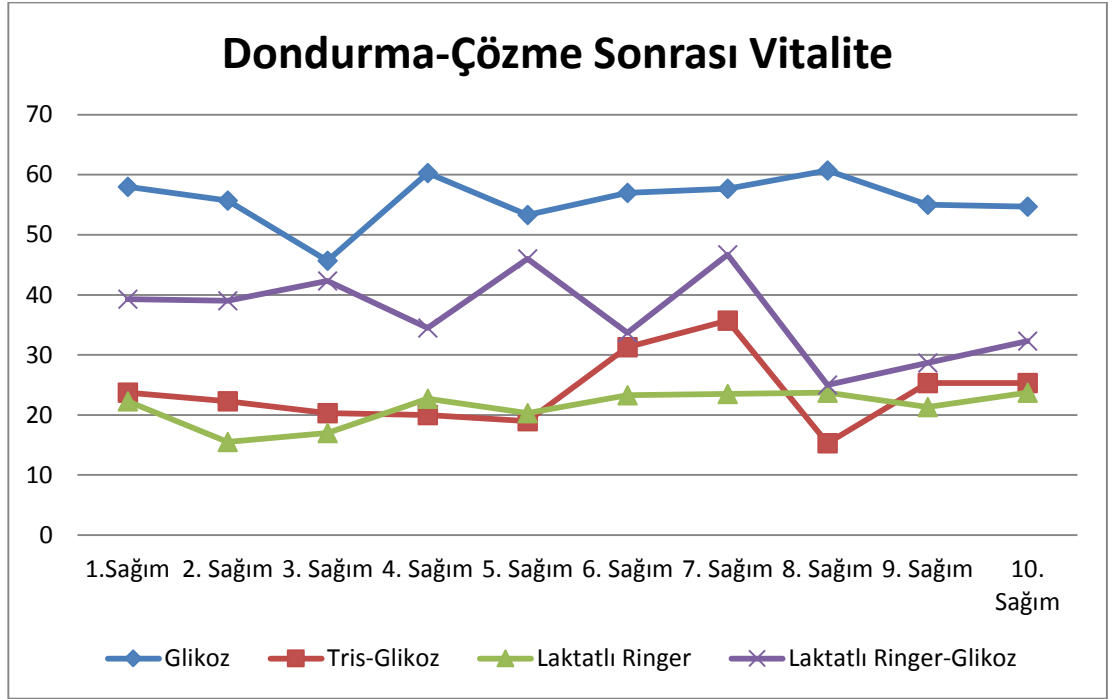
Zaman: F=1,292; p=0,263, ZamanxSulandırıcı: F=0,784; p=0,751, Sulandırıcı: F=141,005; p=0,000**

**; 0,01 önem düzeyinde istatistik olarak önemlidir.

a-c: Aynı satırda da farklı harfi taşıyan sulandırıcı ortalamaları arasındaki fark istatistik olarak önemlidir.

Dondurma-Çözme sonrası farklı sulandırıcılara ait vitalite değerleri bakımından sulandırıcılar arasındaki fark istatistiksel açıdan $p<0.01$ düzeyinde önemli bulunurken, Zaman ve ZamanxSulandırıcı arasındaki farklar istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır.

Dondurma-Çözme sonrası farklı sulandırıcılara ait ortalama vitalite değerleri Şekil 4.8.' de verilmiştir.



Şekil 4. 8. Farklı Sulandırıcılara Ait Dondurma-Çözme Ortalama Vitalite Değerleri

Dondurma-Çözme sonrası vitalite değerleri için Sulandırıcılar arasındaki fark istatistik açısından $p<0,01$ düzeyinde önemli bulunurken Zaman ve ZamanxSulandırıcı arasındaki farklar önemsiz bulunmuştur. Bu sonuçlara göre en yüksek ortalama vitalite değeri % $55,8\pm 10,34$ ile Glikoz sulandırıcısı olurken, bunu % $36,5\pm 8,42$ ile L. Ringer-Glikoz ve % $23,8\pm 8,68$ ile Tris-Glikoz sulandırıcısı takip etmektedir. En düşük ortalama vitalite değeri ise % $21,5\pm 5,82$ ile Laktatlı Ringer sulandırıcısında gözlemlenmiştir. İstatistiksel açıdan ZamanxSulandırıcı arasındaki farklar önemsiz olup Glikoz sulandırıcısı için en yüksek ortalama vitalite değeri % $60,7\pm 10,02$ ile 8. sağımda elde edilirken en düşük ortalama % $45,7\pm 11,50$ ile 3. sağımda elde edilmiştir. Tris-Glikoz sulandırıcısı için en yüksek ortalama vitalite değeri % $35,7\pm 10,07$ ile 7. sağımda iken en düşük ortalama vitalite değeri %

15,3±7,37 ile 8. sağımda elde edilmiştir. Laktatlı Ringer sulandırıcısı için en yüksek ortalama vitalite değeri % 23,7±1,53 ve 23,7±6,66 ile 8. ve 10. sağımda elde edilirken en düşük ortalama vitalite değeri % 15,5±3,54 ile 2. sağımda elde edilmiştir. L. Ringer-Glikoz sulandırıcısı için ise en yüksek ortalama vitalite değeri % 46,7±5,03 ile 7. sağımda olurken en düşük vitalite değeri % 25,0±8,66 ile 8. sağımda elde edilmiştir. Zamanlar arasındaki farklar da istatistiksel açıdan önemsiz olup en yüksek ortalama vitalite değeri % 42,5±15,53 ile 7. sağımda elde edilirken en düşük ortalama % 31,2±19,33 ile 8. sağımda elde edilmiştir.

Makhafola ve ark. (2009), üç farklı horoz ırkı üzerinde %5 DMSO kullanarak yaptığı çalışmada dondurma-çözme sonrası vitalite değerini çözme sonrası 0, 30, 60 ve 90dk bekletme sürelerine göre belirlemiştir. Bu sonuçlara göre sırasıyla Ovambo ırkı için % 65±7,1, % 45±7,4, % 25±7,3 ve % 20±7,0, Potchefstroom Koekoek ırkı için % 65±7,1, % 45±7,4, % 30±7,3 ve % 22±7,0, White Leghorn ırkı için % 50±7,1, % 40±7,4, % 30±7,3 ve % 22±7,0 olarak bildirmişlerdir. Lukaszewicz (2002), %6 DMF eklenmiş EK sulandırıcısı kullanarak yaptıkları çalışmada kaz spermini dondurmuş ve dondurma-çözme sonrası vitalite değerini %34,7, normal sperma oranını ise %14,1 olarak bildirmişlerdir. Lukaszewicz (2001b), %6 DMF eklenmiş EK sulandırıcısı kullanarak yaptığı başka bir çalışmada dondurma-çözme sonrası, 2 yaşındaki kazlar için % 67,61±7,87 ve 3 yaşındaki kazlar için % 68,61±12,34 ortalama vitalite değerleri elde etmiştir. Kowalczyk ve Lukaszewicz (2012), kazlarda yaptıkları çalışmada %6 DMF eklenmiş EK sulandırıcısı kullanılmış denemede % 53,5±7,5 vitalite değerini saptamışlardır. Seigneurin ve Blesbois (1995), Gliserol kriyoprotektanı kullanmış ve %34-48 arası vitalite elde etmişlerdir. Roushdy ve ark. (2014), farklı iki tavuk ırkı üzerine yaptıkları çalışmada en iyi sonucu % 7 Gliserol ile % 37.02±1.13 olarak bildirmişlerdir. Lukaszewicz (2001a), kaz üzerine yaptığı çalışmada DMA kriyoprotektanı ile filtrelenmiş spermada % 37.9±11.28, filtrelenmemiş spermada % 42,06±10.22 değerlerini bulmuştur. Tai ve ark. (2001), yaptıkları çalışmada dondurma-çözme sonrası vitalite değerini % 9 DMA ve % 4 DMSO için sırasıyla % 27,0±3,2 ve % 7,3±4,7 olarak bildirmişlerdir. Rosato ve ark. (2012), DMSO ve likopen kullanarak yaptıkları çalışmada dondurma-çözme sonrası vitalite değerini % 36,2±2,92 olarak bildirmiştir. Elde edilen sonuçlara göre

Lukaszewicz (2001b) araştırmacısının bulgularından düşük, diğer araştırmacıların bulguları ile benzer veya daha yüksek bulunmuştur.

SONUÇ

Bu çalışmada, Ahi Evran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Hayvan Yetiştirme Ünitesinde yetiştirilen 5 adet Amerikan Bronz Hindilerden elde edilen spermaların dondurma öncesi ve dondurma sonrası spermatolojik özelliklerin saptanması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda elde edilen nativ spermalara ait spermatolojik özellikler; ejakülat miktarı, sperm yoğunluğu, motilite ve vitalite olarak incelenmiştir. Nativ sperma özelliklerinin saptanmasından sonra birleştirilmiş spermalar, sulandırma sonrası motilite ve vitalite değerleri ile dondurma-çözme sonrası motilite ve vitalite değerleri olmak üzere iki farklı koşulda incelenmiştir.

Çalışmada elde edilen nativ spermalara ait bulgular diğer araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda elde edilen bulgular ile benzer değerlerde bulunmuş ve fizyolojik değerler içerisinde kalmıştır. Nativ sperma değerleri arasındaki farklılıkların sebebi olarak birey, yaş, ırk, sağım sıklığı, beslenme, ışık, sıcaklık ve genetik gibi değişkenlerin hindiler üzerindeki etkileri gösterilebilmektedir (Ashizawa ve Sano, 1990; Bakst ve Dymond, 2013; Keskin ve ark., 1995; Türkoğlu ve ark., 2005; Donoghue ve Wishart, 2000).

Sulandırma sonrası ortalama motilite değeri en yüksek sulandırıcı Laktatlı Ringer-Glikoz olarak tespit edilmiş olup bunu takiben Laktatlı Ringer en yüksek ortalama motilite değerine sahip ikinci sulandırıcı olmuştur. Fakat dondurma-çözme sonrası ortalama motilite değeri en yüksek sulandırıcının Glikoz olması bu sulandırıcıların kısa süreli muhafaza yöntemlerinde kullanılabilir olabileceği sonucunu doğurmuştur. Bu sulandırıcıların kullanılabilirliğinin tespit edilmesi amacıyla tek başına veya diğer başka kimyasal maddeler kullanılarak yapılacak modifiye sulandırıcılarla denemelerin yapılması ve elde edilen sonuçların hindicilik sektöründe kullanılacak seviyede olup olmadığı araştırılması gerektiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca, elde edilen sonuçlardan yola çıkarak bu sulandırıcıların sadece motilite değerlerinde değil sulandırma sonrası vitalite değerlerindeki oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen yüksek oranlar, kullanılan bu sulandırıcıların spermaların canlılığını devam ettirebilmek için ihtiyaç duyduğu maddelerin bir kısmını karşılayabildiğini göstermektedir.

Sonuç olarak, kullanılan sulandırıcılar içerisinde % 5 DMSO içeren Glikoz (370 mOsm/L) sulandırıcısının diğer sulandırıcılara oranla daha kullanılabilir olduğu tespit edilmiştir. Ancak, elde edilen bulgular neticesinde Glikoz sulandırıcısının kullanılabilirliğini teyit etmek amacıyla sulandırıcının fertilizasyon denemelerinin yapılması gerekmektedir. Ayrıca elde edilen en yüksek dondurma-çözme sonrası motilite oranı, hindi üreticiliğinde kullanılacak yeterli seviyede bulunmadığı için daha yüksek oranlarda motilite elde edilmesi gerekmektedir. Bunun için sulandırıcı çeşidi, kriyoprotektan çeşidi, ekilibrasyon süresi ve dondurma-çözme süresi gibi motiliteyi doğrudan etkileyebilecek etkenlerin geliştirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKÇA

- Akçay E., Tekin N., Selçuk M. ve Çevik M. *Hindi Spermasının Değişik Sulandırıcılarda 4°C'de Saklanması*. Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, **1997**, 44:137-149.
- Akçay E., Varışlı Ö., Bucak M.N., Yavaş İ. ve Tekin N. *Hindi Spermasının Dondurulmasında Farklı Sulandırıcıların Spermatozoa Motilitesi Üzerine Etkisi*. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg., **2007**, 54:35-38.
- Akçay E., Varisli Ö. and Tekin N. *Fertilizing ability of turkey semen diluted with simple sugar-based extenders after cooled storage*. EPC 2006-XII European Poultry Conference. Verona: World Poultry Science Association. **2006**.
- Alaçam E. (Ed). *Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon Sun'i Tohumlama, Doğum ve Interfilitite*. 1. Baskı, Konya, Dizgievi, **1994**.
- Alkan S., Baran A., Özdaş B. ve Evecen M. *Morphological Defects in Turkey Semen*. Turk. J. Vet. Anim. Sci., **2002**, 26:1087-1092.
- Ansah G.A., Buckland R.B., Chen C.W. and Touchburn S.P. *Effects Of Frequency Of Semen Collection And Insemination And Number Of Spermatozoa Inseminated On Reproductive Performance Of Turkeys*. Canadian Journal Of Animal Science. **1984**, 64: 351-456.
- Ashizawa K. and Okauchi K. *Stimulation Of Sperm Motility And Oxygen Consumption Of Fowl Spermatozoa By A Low Molecular Weight Fraction Of Seminal Plasma*. Journal Of Reproduction And Fertility, **1984**, 71(2): 593-598.
- Ashizawa K. and Sano R. *Effects Of Temperature On The Immobilization And The Initiation Of Motility Of Spermatozoa In The Male Reproductive Tract Of The Domestic Fowl*. Comparative Biochemistry And Physiology. **1990**, 96: 297-301.
- Bakst M.R. and Dymond J.S. (9 Ocak 2013), *Artificial Insemination In Poultry*. Erişim: <http://dx.doi.org/10.5772/54918> , (13 Haziran 2015).
- Bakst M.R. and Sexton T.J. *Fertilizing Capacity And Ultrastructure Of Fowl And Turkey Spermatozoa Before And After Freezing*. Journal Of Reproduction And Fertility, **1979**, 55: 1-7.

- Bakst M.R. and Cecil H.C. *Changes In The Characteristics Of Turkey Ejeculated Semen And Ductus Deferens Semen With Repeated Ejeculations*. Rep. Nut. Dev. **1981**, 21(6B): 1095-1103.
- Besulin V. *The Duration Of Use Of Male Turkeys In Reproduction*. Ptitsevodstvo, **1981**, 6: 28-30.
- Blanco JM., Gee G., Wildt D.E. and Donoghue A.M. *Species Variation In Osmotic, Cryoprotectant, And Cooling Rate Tolerance In Poultry, Eagle, And Peregrine Falcon Spermatozoa*. Biology of Reproduction, **2000**, 63: 1164-1171.
- Blanco J.M., Long J.A., Gee G., Donoghue A.M. and Wildt D.E. *Osmotic Tolerance O Avian Spermatozoa: Influence Of Time, Temperature, Cryoprotectant And Membrane Ion Pump Function On Sperm Viability*. Cryobiology. **2008**, 56: 8-14.
- Blesbois E. and Brillard J.P. *Specific Features Of In Vivo And In Vitro Sperm Storage In Birds*. Animal, **2007**, 1(10): 1472-1481.
- Blesbois E. and Caffin J.P. *“Serum Like” Albumin Of Fowl Seminal Plasma And Effects Of albumin On Fowl Spermatozoa Stored At 4°C*. British Poultry Science, **1992**, 33(3): 663-670.
- Blesbois E. *Current Status In Avian Semen Cryopreservation*. Poultry Science, **2007**, 63: 213-222.
- Blesbois E., Grasseau I. and Seigneurin F. *Membrane fluidity and the ability to survive cryopreservation in domestic bird spermatozoa*. Reproduction, **2005**, 129, 371-378.
- Bucak M.N. ve Tekin N. *Kriyoprotektanlar ve Gamet Hücrelerinin Dondurulmasında Kriyoprotektif Etki*, Ankara Uni. Vet Fak. Derg., **2007**, 54: 67-72.
- Burrows W.H. and Quinn J.P. *The Collection Of Spermatozoa From The Domestic Fowl*. Poultry Science, **1936**, 14: 253-254.
- Burrows W.H. and Quinn J.P. *The Collection Of Spermatozoa From The Domestic Fowl And The Turkey*. Poultry Science, **1937**, 16: 19-24.

- Cabria E., Anel L. and Herraez M.P. *Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm*. Theriogenology, **2001**, 52: 623-635.
- Chalah T. and Brillard J.P. *Comparison Of Assessment Of Fowl Sperm Viability By Eosin-Nigrosin And Dual Fluorescence (SYBR-14/PI)*. Theriogenology, **1998**, 50: 487-493.
- Cıncık M. *Semen Kriyoprezervasyonu*. Gülhane Tıp Dergisi, **2003**, 45(1): 100-106.
- Donoghue A.M. and Wishart G.J. *Storage of poultrysemen*. Animal Reproduction Science, **2000**, 62: 313-232.
- Duncan D.B. *Multiple range and multiple F test*. Biometrics, **1955**, 11: 1-42.
- Eleroğlu H. *Yerli Amerikan Bronz Hindilerin Ve Fransa Orijinli Orta Ağır Beyaz Hindilerin Performans Yönünden Karşılaştırılması Ve Yapay Tohumlama Uygulamaları Üzerine Bir Araştırma*. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi-Fen Bilimleri Enstitüsü, **1996**.
- Eleroğlu H., Özlü S. ve Türkoğlu M. *Dünya Ve Türkiye Hindi Üretiminde Yeni Gelişmeler Ve Geleceğe Yönelik Öngörüler*. Ulusal Kümes Hayvanları Kongresi, **2012**, İzmir.
- Gee G.F., Morrell C.A., Franson J.C. and Pattee O.H. *Cryopreservation Of American Kestrel Semen With Dimethylsulfoxide*. J. Raptor. Res., **1993**, 27(1): 21-25.
- Giesen A.F. and Sexton T.J. *Beltsville Poultry Semen Extender. 9. Effect Of Storage Temperature On Turkey Semen Held Eighteen Hours*. Poultry Science, **1983**, 67(7): 1305-1311.
- Graham E.F., Nelson D.S. and Schmehl M.K. *Development Of Extender And Techniques For Frozen Turkey Semen. 1. Development*. Poultry Science, **1982**, 61: 550-557.
- Graham J.W. *Cryopreservation of Avian Spermatozoa*. Second Edition, edited by John G. Day and Glyn Stacey, **2007**, 219-225.
- Han X.F., Niu Z.Y., Liu F.Z. and Yang C.S. *Effects of Diluents, Cryoprotectants, Equilibration Time and Thawing Temperature on Cryopreservation of Duck Semen*. International Journal of Poultry Science, **2005**, 4(4): 197-201.
- Holt W.V. *Basic aspects of frozen storage of semen*. Anim Reprod Sci, **2000a**, 62: 3-22.

- Holt W.V. *Fundamental Aspects Of Sperm Cryobiology: The Importance Of Species And Individual Differences*. Theriogenology, **2000b**, 53: 47-58.
- Iaffaldano N., Manchisi A., Gambacorta M., Iorio M.D. and Rosato M.P. *Effect Of Different Sperm Concentrations On The Post-Thaw Viability And Motility Of Turkey Spermatozoa Cryopreserved By The Pellet Method*. Ital. J. Anim. Sci. **2009**, 8(2): 760-762.
- Ilgaz B. ve Tekin N. *Amerikan Bronzu Hindilerde Spermatolojik Özellikler ve Sun'ı Tohumlama Uygulaması Üzerinde Çalışmalar*. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg., **1990**, 37(3):620-631.
- Ivanov E. *Artificial insemination in birds*, J. Roy. Microsc. Soc. in: Busch., K. Löhle und W. Peter, Künstliche Besamung der Befunde. Hannover, **1912**, 494-514. VEB Gustav Fisher Verlag 1982.
- Kadıoğlu A. (Ed). *Who Laboratuvar El Kitabı*. 5. Baskı, İstanbul, Nobel Yayıncılık, **2011**.
- Keskin O., Tekin N. ve Akçay E. *Erbro Irkı Horoz Spermalarının Farklı Sulandırıcı Ve Kryoprotektanlarla Dondurulması*. Lalahan Hay Araş Enst Derg, **1995**, 35(3-4): 110-125.
- Koçak Ç. *Hindilerde Yapay Tohumlama*. Hayvansal Üretim Dergisi, İzmir, **1982**, Ocak, 25-38.
- Kowalczyk A. and Lukaszewicz E. *The possibility of obtaining intergeneric hybrids via White Kohuda (Anser anser L.) goose insemination with fresh and frozen-thawed Canada goose (Branta canadensis L.) gander semen*. Theriogenology. **2012**, 77: 507-513.
- Lake P.E. and Stewart J.E. *Artificial Insemination Of Poultry*. Bulletin 213, London, UK, Ministry Of Agriculture, Fish and Food. Her Majesty's Stationary Office, **1978**.
- Lake P.E. *The history and future of the cryopreservation of avian germ plasma*. Poultry Science, **1986**, 65: 1-15.
- Lake P.E., Cherms F.L. and Wishart GJ. *Effect Of Aeration On The Fertilising Ability Of Turkey Semen Stored for 48 Hours At 5 and 15°C: A Study From The 33rd To The 47th Week Of Age*. Reproduction Nutrition Development, **1984**, 24(2): 147-153.

- Long J.A., Purdy P.H., Zuidberg K., Hiemstra S.J., Velleman S.G. and Woelders H. *Cryopreservation of turkey semen: Effect of breeding line and freezing method on post-thaw sperm quality, fertilization, and hatching*. *Cryobiology*, **2014**, 68: 371-378.
- Lukaszewicz E. *An Effective Method For Freezing White Italian Gander Semen*. *Theriogenology*, **2002**, 58: 19-27.
- Lukaszewicz E. *DMF Effects Of Frozen Gander Semen*. *British Poultry Science*, **2001-b**, 42(3): 308-314.
- Lukaszewicz E. *Effect Of Semen Filtration And Dilution Rate On Morphology And Fertility Of Frozen Gander Spermatozoa*. *Theriogenology*, **2001-a**, 55: 1819-1829.
- Lukaszewicz E., Kruszynski W. and Fujihara N. *Effect Of Age Of Fresh And Frozen-Thawed Semen In White Italian Ganders*. *Asian Journal of Andrology*, **2003**, 5: 89-93.
- Makhafola M.B., Lehloenya K.C., Mphaphathi M.L., Dinnyes A. and Nedambale T.L. *The Effect Of Breed On The Survivability And Motility Rate Of Cryopreserved Cock Semen*. *South African Journal of Animal Science*, **2009**, 39 (Supplement 1): 242-245.
- Massip A. *Cryopreservation of embryos of farm animal*. *Reprod Dom Anim*, **2001**, 36: 49-55.
- McCartney M.G. and Brown K.I. *Spermatozoa Concentration In Three Varieties Of Turkeys*. *Poultry Science*, **1958**, 38: 390-394.
- McGann L.E. *Differing action of penetrating and nonpenetrating agents*. *Cryobiology*, **1978**, 15: 382-390.
- Meryman H.T., Williams R.T and Douglas M.S.J. *Freezing injury from solution effects and its prevention by nature or artificial cryoprotection*. *Cryobiology*, **1977**, 14: 287-302.
- Nestor K.E. and Brown K.I. *Semen Production In Turkeys*. *Poultry Science*, **1971**, 50: 1705-1712.
- Palasz A.T. and Mapletopt R.J. *Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances*. *Biotechnol Adv.*, **1996**, 14: 127-149.

- Pandian C. and Prabakaran R. *Effect Of Genetic Groups And Cryoprotectants On Pre-Freeze And Post-Thaw Sperm Motility Of Turkey Semen*. The North-East Veterinarian. **2012**, 12(1): 28-29.
- Polge C., Smith A.U. and Parkes A.S. *Revival Of Spermatozoa After Vitrification And Dehydration At Low Temperatures*. Nature, **1949**, 164(4172): 666.
- Rosato M.P., Centoducati G., Santacroce M.P. and Iaffaldano N. *Effects Of Lycopene On In Vitro Quality Lipid Peroxidation In Refrigerated And Cryopreserved Turkey Spermatozoa*. British Poultry Science, **2012**, 53(4): 545-552.
- Roushdy Kh., El-Sherbieny M.A., Abd El-Gany F.A. and El-Sayed M.A. *Semen Cryopreservation For Two Local Chicken Strains As A Tool For Conservation Of Egyptian Local Genetic Resources*, Egyptian Poultry Science Journal, **2014**, 34(2): 607-618.
- Seigneurin F. and Blesbois E. *Effects Of The Freezing Rate On Viability And Fertility Of Frozen-Thawed Fowl Spermatozoa*. Theriogenology, **1995**, 43: 1351-1358.
- Sexton T.J. and Giesen A.F. *Beltsville Poultry Semen Extender:6. Holding Turkey Semen for Six Hours at 15 C°*. Poultry Science, **1982**. 61(6): 1202-1208.
- Sexton T.J. *Comparison Of Commercial Diluents For Holding Turkey Semen 24 Hours At 5°C*. Poultry Science, **1988**, 67(1): 131-134.
- Sexton T.J. *Development of a commercial method for freezing turkey semen. 1. Effect of pre-freeze techniques on the fertility of processed unfrozen and frozen-thawed semen*. Poultry Science, **1981**, 60: 1567-1573.
- Sexton T.J. *Effect Of Temperature And Method Of Semen Collection On The Viability Of Turkey Spermatozoa*. Poultry Science, **1984**, 63(4): 844-846.
- Shaffner C.S., Henderson E.W. and Card C.G. *Viability of spermatozoa of the chicken under various environmental conditions*. Poultry Science, **1941**, 20: 259-265.
- Siudzinska A. and Lukaszewicz E. *Effect of Semen Extenders and Storage Time on Sperm Morphology of Four Chicken Breeds*. Poultry Science, **2008**, 17: 101-108.
- Smirnov S. and Aleksev S. *Collecting Semen From Turkeys*. Ptitsevodstvo, **1990**, 8: 23-24.

- SPSS, Statistical Package Social Science: SPSS for windows release 17.0, SPSS Inc., **2008**.
- Stenova M., Ledec M., Csuka J. and Skrobanek P. *Evulation Of Semen Production And Quality In Three Turkey Lines*. 5th International Syposium. Poultry Reserch Institute, Ivanca Pri Dunaj. Bratislava, **1983**.
- Surai P.F. and Wishart G.J. *Poultry Artificial Insemination Technology In The Countries Of The Former USSR*. World's Poultry Science Journal, **1996**, 52: 27-43.
- Şahin E. *Varikozel Olgularında Sperm Dondurma-Çözme İşleminin (Kriyoprezervasyon) Zaman Bağlı Olarak Sperm Parametreleri, İnce Yapısı Ve Hücre Ölümü Üzerine Etkileri*, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi-Sağlık Bilimleri Enstitüsü, **2010**.
- Tai J.J.L., Chen J.C., Wu K.C., Wang S.D. and Tai C. *Cryopreservation Of Gander Semen*. British Poultry Science, **2001**, 42: 384-388.
- Tarvis K.M. *New Methods For Cryopreserving Rooster Spermatozoa*. Master's Thesis, Colorado State University-Department Of Biomedical Sciences, **2013**.
- Tekin N. *Erkek üreme organlarının muayenesi (Androlojik Muayeneler)*. 61-62. In: Erol Alaçam (Ed), Theriogenology, **1990**, Nurol Matbacılık, Ankara.
- Tselutin K., Seigneurin F. and Blesbois E. *Comparison of Cryoprotectants and Methods of Cryopreservation of Fowl Spermatozoa*. Poultry Science, **1999**, 78: 586-590.
- Tunalı G. *Sperm Kriyoprezervasyon Teknikleri Ve Fertilizasyon Başarısındaki Rolü*. Androloji Bülteni Dergisi, **2014**, 16(57): 123-128.
- Tuncer P.B., Kinet H., Özdoğan N. ve Demiral Ö.O. *Evaluation Of Some Spermatological Characteristics In Denizli Cocks*. Erciyes Üniv Vet Fak Derg. **2006**, 3(1): 37-42.
- Türkoğlu M., Sarıca M. ve Eleroğlu H. *Hindi Yetiştiriciliği*. 1. Baskı, Samsun, Otak Form-Ofset, **2005**.
- Uysal O., Demir Z., Çebi Ç., Demirtaş Ş.E., Tırpan M.B., Tunca M. ve Kamanlı S. *Tavukçuluk Araştırma Enstitüsünde Bulunan Kahverengi Yumurtacı Saf Hat Horozlarda Sperma Kalitesinin Değerlendirilmesi*. Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg., **2011**, 17(4):655-658.

- Watson P.F. *Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function.* Reproduction, Fertility and Development, **1995**, 7: 871-891.
- Watson P.F. *The causes of reduced fertility with cryopreserved semen.* Animal Reproduction Science, **2000**, 60: 481-492.
- Woodard A.E. and Alplanalp H. *Semen Production And Fertilizing Capacity Of Semen Broad Breasted Bronza Turkeys Maintained In Capes And On The Floor.* Poultry Science, **1967**, 46: 823.
- Zavos P.M. and Graham E.F. *Effects of various degrees of supercooling and nucleation temperatures on fertility of frozen turkey semen.* Cryobiology, **1983**, 20: 553-559.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı, Soyadı: Mehmet KUZLU

Uyruğu: T.C.

Doğum Tarihi ve Yeri: 01.01.1986-ŞANLIURFA/Hilvan

e-mail: mehmetkuzlu@gmail.com

Eğitim

Lise: Hilvan Lisesi

Lisans: Ahi Evran Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans: Ahi Evran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Zootekni Anabilim
Dalı

Lisans Tezi: Epigenetik

Yüksek Lisans Tezi: Hindi (*Meleagris gallopavo*) Semeninin Dondurulmasında
Kullanılan Farklı Sulandırıcıların Karşılaştırılması

Yabancı Dil: İngilizce