

Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nın Spermatolojik Özellikleri ve Spermanın Kısa Süreli Muhafazası

Temel Şahin*, İlker Zeki Kurtoğlu, Özay Köse
Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Rize, Türkiye
t_sahin@mynet.com

(Geliş/Received: 07.12.2012; Kabul/Accepted: 18.02.2013)

Özet

Bu çalışma gökkuşığı alabalığının spermatolojik özelliklerini belirlemek ve spermanın kısa süreli muhafazası için sulandırıcı geliştirmek amacıyla yapılmıştır. Üreme sezonunda, 12 erkek bireyden sperma abdominal masaj yöntemi ile alınmıştır. Alınan spermalarda, miktar, motilite, motilite süresi, spermatokrit oranı, yoğunluk ve pH belirlenmiştir. Bunların dışında, canlı ağırlık ile total boy ölçülmüş ve bu parametreler ile spermatolojik özellikler arasındaki korelasyonlar araştırılmıştır. Gökkuşığı alabalığı spermalarında; miktar (mL), motilite (%), motilite süresi (s), spermatokrit oranı (%), yoğunluk ($\times 10^9$ spz/mL) ve pH değerleri sırasıyla ortalama $16,2 \pm 14,45$, $97,5 \pm 4,52$, $114,5 \pm 31,64$, $22,1 \pm 10,15$, $9,4 \pm 4,48$ ve $7,1 \pm 0,16$ bulunmuştur. Sperma miktarı ile motilite arasında önemli ($P < 0,01$) negatif korelasyon, sperma miktarı ile spermatozoa yoğunluğu arasında ($P < 0,05$) ise pozitif bir korelasyon saptanmıştır. Glikoz içeren sulandırıcı S-1'de muhafaza edilen spermanın daha yüksek bir motiliteye sahip olduğu ve sulandırıcı S-1'in diğerinden daha etkin olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Gökkuşığı alabalığı, Sperma, Motilite, Sperma özellikleri

Spermatologic Characteristics and Short-term Storage of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, Sperm

Abstract

This study was carried out to determine the spermatologic characteristics and to develop an extender for the short-term storage of semen from rainbow trout. In the spawning season, sperm was collected by abdominal massage from 12 males. In collected sperm; volume, motility, duration of motility, spermatocrit, density and pH were determined. Furthermore, body weight and total length were measured and correlations between spermatologic characteristics and these parameters were investigated. In the sperm of rainbow trout, volume (mL), motility (%), duration of motility (sec), spermatocrit, density ($\times 10^9$ /mL), and pH values were found as mean 16.2 ± 14.45 , 97.5 ± 4.52 , 114.5 ± 31.64 , 22.1 ± 10.15 , 9.4 ± 4.48 and 7.1 ± 0.16 , respectively. Sperm volume were negatively correlated with motility ($P < 0.01$), but positively correlated with sperm density ($P < 0.05$). Sperm stored in extender S-1 (containing glucose) had a higher rate of motility and the extender S-1 seemed to be more effective than the other.

Keywords: Rainbow trout, Sperm, Motility, Spermatologic characteristics.

1. Giriş

Sperma kalitesi su ürünleri yetiştiriciliğinde anaç yönetimi açısından, döllenme oranı ve böylece damızlıklardan elde edilen toplam canlı yumurta üretimini etkilediğinden, çok önemli bir değişkendir. Sperma analizi, üreticiye, yapay döllenme kullanılan spermanın kullanımına, kısa veya uzun süreli muhafazasına ilişkin protokolleri geliştirmek için gerekli verileri sağlamaktadır [1,2]. Balıklarda sperma özellikleri ile ilgili bilgi eksikliği erkek damızlık

stokların etkin ve ekonomik yönetimini de sınırlamaktadır. Sperma miktarı, spermatozoa yoğunluğu, motilite ve motilite süresi sperma kalitesini belirlemede en yaygın kullanılan özelliklerdir [1].

Balık spermasının kısa veya uzun süreli muhafazası, dişi ve erkek bireylerden elde edilen gametlerin eş zamanlı olarak bulunmasına, işletmeler arası gamet taşınmasını kolaylaştırma, hastalık bulaşma riskini azaltmaya ve elde tutulması gereken damızlık sayısını azaltarak maliyeti düşürmeye katkı sağlar [3,4].

Birçok alabalık türünde sperma özellikleri ve farklı sulandırıcılar kullanılarak spermanın kısa veya uzun süreli muhafazasına ilişkin araştırmalar yürütülmüştür. Glikoz esaslı sulandırıcı ile *O. mykiss* spermasının uzun süreli muhafazası [5], *S. trutta fario* spermasının fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri ile vücut yapısı arasındaki ilişki [6], *O. mykiss* spermasının kalitesi [7], *O. mykiss* sperma kalitesi üzerinde askorbik asit ilavesinin etkisi [8], kısa süreli muhafaza edilmiş *S. trutta abanticus* spermasının dölleme yeteneği [9] ve *S. trutta magrostigma* spermasında seminal plazma kompozisyonu ve sperma kalite parametreleri arasındaki ilişki [10] çalışılmıştır. Ancak gökkuşağı alabalığında spermatolojik özellikler ile balığın vücut yapısı arasındaki ilişkiler, farklı sulandırıcıların gökkuşağı alabalığı sperminin kısa süreli muhafazasına etkisi konusunda yeterli çalışmaya rastlanılmamıştır. Yetiştiricilik sistemlerinde kontrollü ve başarılı bir üretim yapabilmek için kültürü yapılan balığın sperma özelliklerinin iyi bilinmesi gerekir. Bu tür bilgi kaliteli sperma seçiminde ve spermanın kısa veya uzun süreli muhafazası için yöntem oluşturmaya katkı sağlar.

Bu çalışmanın amacı, gökkuşağı alabalığında sperma kalitesini belirlemek, balığın vücut yapısı ile sperma özellikleri arasındaki ilişkiyi incelemek ve spermanın kısa süreli muhafazası için sulandırıcı geliştirmektir.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Anaç bakımı ve sperma elde etme

Araştırma Rize Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi İyidere Su Ürünleri Üretim ve Araştırma Merkezi'nde yürütülmüştür. Damızlık balıklar fiber glass tankta doğal fotoperiyot altında tutulmuş ve ticari alabalık yemi ile canlı ağırlığın %2'si oranında yemlenmiştir. Üreme döneminde ortalama su sıcaklığı $12,9 \pm 0,58$ °C (8,0-18,5 °C) olarak ölçülmüştür. Çalışmada üreme mevsiminin ortasında tesadüfi olarak seçilen toplam 12 gökkuşağı alabalığı (ağırlık $1184 \pm 283,6$ g, toplam boy $45,2 \pm 2,70$ cm) kullanılmıştır. Sağımdan önce 48 saat aç bırakılan balıklar, 30 ppm benzokain ile anesteziye tabi tutulmuş ve ürogenital bölge

kurulanmıştır. Sperm, idrar, kan, barsak muhtevası ile bulaşmayı önlemek için hassasiyet göstererek, karın bölgesine uygulanan masajla, 10 mL ölçekli cam tüp içerisine toplanmıştır. Her balık sadece bir kez ve ayrı ayrı sağılmış, alınan sperma miktarı mL olarak kaydedilmiştir. Sperma örnekleri granül buz içerisinde (4 °C) muhafaza edilerek laboratuara taşınmış ve sağımdan sonra 4 saat içerisinde analiz edilmiştir.

2.2. Spermatozoa yoğunluğu ve spermatokrit oranı

Spermatozoa yoğunluğu hematokrit yöntemle belirlenmiştir. 10 µL sperma pipetle 990 µL %0,7 NaCl çözeltisine ilave edilerek seyreltilmiştir. Seyreltilmiş spermadan bir damla thoma lamı (derinlik 0,1 mm) üzerine konularak arada hava boşluğu kalmayacak şekilde lamelle kapatılmış, sperma hücrelerinin çökmesi için 3-5 d beklenmiş ve ışık mikroskopunda (x 400) sayılarak spermatozoa yoğunluğu $\times 10^9$ spz/mL olarak kaydedilmiştir. Spematokrit oranı heparinli mikrohematokrit kapillar tüplere (75 x 1,1-1,2 mm) doldurulan sperma sıvısının 10 dakika süre ile 10000 d/d hızla santrifüj edilmesi sonucu yüzde olarak kaydedilmiştir [11].

2.3. Sperma motilitesi, motilite süresi ve pH

Sperma motilitesi, 1:100 (1 µL sperma: 99 µL aktivasyon çözeltisi) oranında aktivasyon çözeltisi (%0,3 NaCl) ile seyreltikten sonra hızlı, güçlü, ileri doğru hareket eden spermatozoaların yüzdesi olarak mikroskop altında (x 400) belirlenmiştir. Motilite süresi aktivasyon çözeltisinin spermaya ilave edildiği andan itibaren hassas bir kronometre ile ölçülmüştür. Laboratuar çalışmaları 17-20 °C'de gerçekleştirilmiş ve subjektif hataları önlemek amacıyla, bütün ölçüm ve değerlendirmeler aynı araştırmacı tarafından ve aynı koşullar altında yürütülmüştür. Spermanın pH değeri pH indikatör kağıtları (Merck 6,4-8) kullanılarak saptanmıştır.

2.4. Sulandırıcıların seçimi

Gökkuşığı alabalığı sperması için potansiyel sulandırıcı olarak değerlendirilmek üzere iki sulandırıcı (S-1 ve S-2) seçilmiştir. Sulandırıcıların kimyasal bileşimi Tablo 1'de gösterilmiştir. 4°C'de buzdolabında muhafaza edilen sperma ve sulandırıcı, en uygun sulandırıcıyı belirlemek için, 1:3

(sperm:sulandırıcı) oranında karıştırılmış ve 2 mL'lik plastik tüplere konulmuş, sperma ve sulandırıcının homojen karışımını sağlamak için hızlıca çalkalanan plastik tüpler tekrar 4°C'de buzdolabına yerleştirilmiştir. Buzdolabında muhafaza edilen örneklerde sperma motilitesi toplam süre 72 saat olmak üzere 24 saat ara ile yapılmıştır.

Tablo 1. Sperma sulandırıcılarının bileşimi (g/L)

Sulandırıcı	NaCl	KCl	CaCl ₂	MgCl ₂	NaHCO ₃	Glikoz
S-1	7,25	0,40	-	-	0,80	2,0
S-2	8,75	0,20	0,10	0,10	0,40	-

2.5. İstatistiksel analiz

Araştırmada elde edilen veriler SPSS 15.0 istatistik programı kullanılarak ortalama değerleri ve standart hataları hesaplanmış, tek yönlü varyans analizi uygulanarak gruplar arasındaki farklılıklar değerlendirilmiştir. Farklılığı önemli olan gruplar ise Tukey HSD testi ile belirlenmiştir. Spermatolojik veriler arasındaki korelasyonların tespitinde Pearson korelasyon analiz testinden faydalanılmıştır

Sperma motilitesi %90-100 (ortalama $97,5 \pm 4,52$), motilite süresi 72-184 s (ortalama $114,5 \pm 1,64$) olarak saptanmıştır. Bireylerden toplanan sperma miktarı ise 2,8 ile 46,4 mL (ortalama $16,2 \pm 14,45$) arasında değişmiştir. Sperma miktarı ile sperma motilitesi arasında negatif ($r = -0,858$, $P < 0,01$), spermatozoa yoğunluğu arasında ise pozitif ($r = 0,693$, $P < 0,05$) önemli korelasyon saptanmıştır. Sperma miktarı balık boyu ile negatif ($r = -0,200$), balık ağırlığı ile pozitif ($r = 0,071$) allometri göstermiştir. Spermatozoa yoğunluğu bireyler arasında oldukça farklılık göstermiş ve $2,9 \times 10^9$ ile $16,6 \times 10^9$ spz/mL arasında değişmiştir. Çalışmada ortalama $22,1 \pm 10,15$ olarak belirlenen spermatokrit oranı ile sperma miktarı ($r = 0,528$) ve spermatozoa yoğunluğu ($r = 0,547$) arasında pozitif, sperma motilitesi ($r = -0,431$) ve motilite süresi ($r = -0,125$) arasında ise negatif ilişki gözlenmiştir.

3. Bulgular

İncelenen gökkuşığı alabalıklarında spermatolojik parametreler oldukça değişken bulunmuş ve sonuçlar Tablo 2'de gösterilmiştir. Damızlık bireylerin spermatolojik özellikleri, balık boyu ve ağırlığı arasındaki ilişkiler Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 2. Gökkuşığı alabalığının spermatolojik ve biyometrik özellikleri (n = 12).

Özellikler	Ortalama \pm SH	Minimum	Maksimum
Total boy (cm)	45,2 \pm 2,70	39,5	49,0
Ağırlık (g)	1184 \pm 283,6	610	1622
Sperma miktarı (mL)	16,2 \pm 14,45	2,8	46,4
Motilite oranı (%)	97,5 \pm 4,52	90,0	100,0
Motilite süresi (s)	114,5 \pm 31,64	72	184
Spermatokrit oranı (%)	22,1 \pm 10,15	4,8	31,8
Spermatozoa yoğunluğu ($\times 10^9$ /mL)	9,4 \pm 4,48	2,9	16,6
pH	7,1 \pm 0,16	7,0	7,5

Tablo 3. Gökkuşluğu alabalığının ağırlık-boy ve spermatozojik özellikleri arasındaki ilişki.

	Ağırlık	Boy	Miktar	Motilite	Motilite süresi	Yoğunluk	Spermatozokrit
Boy	0,828*						
Miktar	0,071	-0,200					
Motilite	-0,060	0,060	-0,858*				
Motilite süresi	0,147	0,014	-0,063	-0,086			
Yoğunluk	0,018	-0,346	0,693**	-0,458	0,230		
Spermatozokrit	-0,207	-0,510	0,528	-0,431	-0,125	0,547	
pH	0,466	0,468	-0,166	0,161	0,137	-0,365	-0,690**

*P < 0,01, **P < 0,05

Tablo 4. Sulandırıcıların farklı muhafaza süresinde sperma motilitesi üzerine etkisi.

Muhafaza süresi (saat)	S-1	S-2	Kontrol
24	91,1±4,2 ^a	70,0±7,1 ^b	96,7±3,5 ^a
48	89,4±5,3 ^a	69,4±4,6 ^b	90,0±3,5 ^a
72	81,1±4,2 ^a	51,1±8,2 ^b	86,1±4,9 ^a

Aynı satırlarda farklı harfle gösterilen değerler arasındaki farklar önemlidir (P < 0,05).

Tablo 4’de araştırmada kullanılan iki farklı sulandırıcıda muhafaza edilen spermanın farklı zaman aralıklarında motilitesi gösterilmiş ve inceleme periyodu sonunda S-1’de muhafaza edilen spermanın motilitesinin S-2’de muhafaza edilen sperma motilitesinden önemli (P < 0,05) ölçüde yüksek olduğu görülmüştür.

4. Tartışma ve Sonuç

Sperma kalitesinin değerlendirilmesinde genellikle sperma miktarı, motilitesi ve motilite süresi dikkate alınmaktadır. Bu çalışmada elde edilen sperma miktarı, bazı araştırmacıların [12,13] bulguları ile benzerlik gösterirken, kimi araştırmacıların [5,14,15] bulguları ile farklılık göstermiştir. Diğer alabalık türleri ile karşılaştırıldığında ise sperma miktarı *S. trutta fario* [16] (3,9 ± 1,48 mL), *S. trutta macrostigma* [10] (13,93 ± 0,84 mL), *S. trutta abanticus* [9] (7,4 ± 0,3 mL) için bulunan değerlerden yüksek bulunmuştur. Bazı araştırmacılar tarafından da işaret edildiği gibi sperma üretiminde farklılıklar, erkek bireylerin yaşı ve ağırlığı, örnekleme dönemi ve örnekleme yöntemi [17], yetiştirme koşulları, beslenme, yumurtlama yöntemleri, anaç bireylerin yumurtlama davranışı [11], besleme koşulları ve rejimi, çevresel faktörler veya yumurtlama zamanı [16] gibi faktörlere bağlı olabilir.

Döllenmede kullanılacak spermanın seçiminde sperma kalitesinin en güvenilir göstergesi olan spermatozoa motilitesi kullanılmaktadır. Bu çalışmada aktivasyon sıvısı

ilave edildikten sonra ortalama spermatozoa motilitesi % 97,5 ± 4,52 olarak belirlenmiştir. *O. mykiss* için belirlenen ortalama spermatozoa motilitesi aynı tür için Bozkurt ve ark. [5], Aral ve ark. [7], Canyurt ve Akhan [8], *S. trutta abanticus* için Bozkurt ve ark. [6], *S. trutta fario* için Bozkurt ve ark. [16], *S. trutta macrostigma* için Bozkurt ve ark. [10] tarafından rapor edilen ortalama spermatozoa motilitesinden daha yüksek bulunmuştur. Spermatozoa seminal sıvı içerisinde hareketsiz durmakta, fakat aktivasyon sıvısı (tatlı su) ile temas ettiğinde hızla aktif hale geçmekte ve 72 ile 184 saniye arasında değişen kısa bir süre hareketlilik göstermektedirler. Bu değerler aynı tür için bazı araştırmacılar tarafından bildirilen motilite süresi ile uyumlu [5,12,18,19], fakat Tuset ve ark. [20] tarafından bildirilen değerden yüksektir. Spermatozoanın motilite ve motilite süresi mevsime [21], seminal plazmanın biyokimyasal bileşimi ve osmolalitesine [22] bağlı olarak değişebilir. Balıklarda spermatozoa motilite süresinin uzun olması erkek bireylerin döllenmedeki başarı potansiyelini artırabilir.

Araştırmada saptanan spermatozoa yoğunluğu (9,4 ± 4,48 x 10⁹ spermatozoon/mL), diğer araştırmacıların büyük çoğunluğunun (11,80 ± 6,19 x 10⁹ spermatozoon/mL [23]; 8,9 ± 3,8x10⁹ spz/mL [24]; 10,39 ± 2,13 x 10⁹ spz/mL [25]) bulguları ile benzerlik gösterirken, Munkittrick ve Moccia [15]’nin bulguları (3-10 x 10⁹ spz/mL) ile farklılık göstermiştir. Bu farklılıklar anaçların yaşı, ağırlığı [17,26], ekolojisi, üreme davranışı [27], örnekleme

zamanı ve yöntemi [17] gibi pek çok faktöre bağlı olabilir.

Bu çalışmada balıkların vücut ağırlığı, boy ve spermatolojik parametreler arasındaki korelasyonlar genel olarak negatif ve önemsiz olarak bulundu. Bozkurt ve ark. [16] *S. trutta fario* için rapor ettikleri benzer bir ilişkiden hareketle, balık büyüklüğü ve sperm kalite parametreleri arasında düşük ve önemsiz bir korelasyonun, balığın fiziksel durumunun, sperma kalitesi üzerinde bir etkiye sahip olmadığını gösterdiğini ifade ettiler. Buradan hareketle ve mevcut çalışmanın sonuçları dikkate alındığında, sperma kalitesinin, genetik ve çevresel faktörlerden etkilendiği söylenebilir.

Uygun sulandırıcı seçimi, balık spermasının soğuk muhafazası için önemli bir faktördür [28].

5. Kaynaklar

1. Billard, R., Cosson, J., Perches, G., Linhart, O. (1995). Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture*, 129: 95-112.
2. Linhart, O., Rodina, M., Gela, D., Kocour, M. (2004). Optimization of artificial propagation in European catfish, *Silurus glanis* L. *Aquaculture*, 235: 619-632.
3. Cloud, J.G., Miller, W.H., Levanduski, M.J. (1990). Cryopreservation of sperm as a means to store salmonid germ plasm and to transfer genes from wild fish to hatchery populations. *Prog. Fish Cult.* 52: 51-53.
4. DeGraaf, J.D., Berlinsky, D.L. (2004). Cryogenic and refrigerated storage of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) spermatozoa. *Aquacult.* 234(1-4): 527-540.
5. Bozkurt, Y., Seçer, S., Tekin, N., Akçay, E. (2005). Cryopreservation of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Mirror Carp (*Cyprinus carpio*) Sperm with Glucose Based Extender. *Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 1(1): 21-25.
6. Bozkurt, Y., Seçer, S., Bekcan, S. (2006). Relationship Between Spermatozoa Motility, Egg Size, Fecundity and Fertilization Success in *Salmo trutta abanticus*. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 12 (4): 345-348.
7. Aral, F., Şahinöz, E., Dogu, Z. (2007). A Study on the Milt Quality of *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1972) and *Carasobarbus luteus* (Heckel, 1843) in Atatürk Dam Lake,

Bu çalışmada, *O. mykiss* spermasının kısa süreli soğuk muhafazası için iki farklı sulandırıcı test edildi ve NaCl, KCl, NaHCO₃ ve glikozdan oluşan sulandırıcı S-1'in diğer sulandırıcıdan (S-2) daha etkin olduğu saptandı.

Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen sonuçlar ticari yetiştiricilikte yüksek kaliteli ve olgun erkek anaç adaylarını seçmek, *O. mykiss* ile ilgili daha sonra yapılacak sperma kalite değerlendirme ve muhafaza çalışmaları için temel veri olarak kullanılabilir. Dünyada ve ülkemizde en yaygın kültürü yapılan türün üreme potansiyelini anlamak ve anaç yönetimi protokolleri geliştirmek amacıyla sperma kalitesi üzerine daha fazla araştırma yapılmalıdır.

Southeastern Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 7: 41-44.

8. Canyurt, M.A., Akhan, S. (2008). Effect of Ascorbic Acid Supplementation on Sperm Quality of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 8: 171-175.
9. Hatipoğlu, T., Akçay, E. (2010). Fertilizing ability of short-term preserved spermatozoa Abant trout (*Salmo trutta abanticus* T, 1954). *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 57: 33-38.
10. Bozkurt, Y., Öğretmen, F., Kökçü, Ö., Ercin, U. (2011). Relationships between seminal plasma composition and sperm quality parameters of the *Salmo trutta macrostigma* (Dumeril, 1858) semen: with emphasis on sperm motility. *Czech J. Anim. Sci.*, 56(8): 355-364.
11. Rurangwa, E., Kime, D.E., Ollevier, F., Nash, J.P. (2004). The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, 234: 1-28.
12. Büyükhatipoğlu, Ş., Holtz, W. (1984). Sperm output in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) effect of age, timing and frequency of stripping and presence of females. *Aquaculture*, 37: 63-71.
13. Gjerde, B. (1984). Variation in semen production of farmed Atlantic salmon and Rainbow trout. *Aquaculture*, 40: 109-114.
14. Munkittrick, K.R., Moccia, R.D. (1987). Seasonal changes in the quality of Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) semen: effect of a delay in stripping on spermatocrit, motility, volume and seminal plasma constituents. *Aquaculture*, 64: 147-156.
15. Schmidt-Baulain, R., Holtz, W. (1989). Deepfreezing of Rainbow trout (*Salmo gairdneri*)

- sperm at varying intervals after collection. *Theriogenology*, 32 (3): 439-443.
16. Bozkurt, Y., Seçer, S., Bukan, N., Akçay, E., Tekin, N. (2006). Relationship Between Body condition, Physiological and Biochemical parameters in Brown Trout (*Salmo trutta fario*) Sperm. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9(5): 940-944.
 17. Suquet, M., Billard, R., Cosson, J., Dorange, G., Chauvaud, L., Mugnier, C., Fauvel, C. (1994). Sperm features in turbot (*Scophthalmus maximus*): a comparison with other freshwater and marine fish species. *Aquatic Living Resources*, 7: 283-294.
 18. Babiak, I., Fraser, L., Dobosz, S., Goryczko, K., Kuzminski, H., Strzezek, J. (1999). Computer-controlled freezing of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) spermatozoa for routine programmes. *Aquacult. Res.*, 30: 707-710.
 19. Tekin, N., Seçer, S., Akçay, E., Bozkurt, Y., Kayam, S. (2003). Gökkuşuğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss* W., 1792) yaşın spermatolojik özellikler üzerine etkisi. *Türk J Vet Anim Sci*, 27: 37-44.
 20. Tuset, V.M., Dietrich, G.J., Wojtczak, M., Słowińska, M., de Monserrat, J., Ciereszko, A. (2008). Relationships between morphology, motility and fertilization capacity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *J. Appl. Ichthyol*, 24: 393-397.
 21. Benau, D., Terner, C. (1980). Initiation, prolongation and reactivation of the motility of salmonid spermatozoa. *Gamete Res*, 3: 247- 257.
 22. Alavi, S.M.H., Pšenička, M., Policar, T., Rodina, M., Hamáčková, J., Pavel Kozák, P., Linhart, O. (2009). Sperm quality in male *Barbus barbus* L. fed different diets during the spawning season. *Fish Physiol Biochem*, 35: 683-693.
 23. Ciereszko, A., Dabrowski, K. (1993). Estimation of spermdensity of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique. *Aquaculture*, 109: 367-373.
 24. Geffen, A.J., Evans, J.P. (2000). Sperm traits and fertilization success of male and sex reversed female rain bow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 182: 61-72.
 25. Glogowski, J., Kwasnik, M., Piros, B., Dabrowski, K., Goryczko, K., Dobosz, S., Kuzminski, H., Ciereszko, A. (2000). Characterization of rainbow trout milt collected with a catheter: semen parameters and cryopreservation success. *Aquaculture Research*, 31: 289-296.
 26. Suquet, M., Dreanno, C., Dorange, G., Normant, Y., Quemener, L., Gaignon, J.L., Billard, R. (1998). The aging phenomenon of turbot (*Scophthalmus maximus*) spermatozoa: effects on morphology, motility and concentration, intracellular ATP content, fertilization and storage capacities. *Journal of Fish Biology*, 32: 31-41.
 27. Piironen, J., Hyvarinen, H. (1983). Composition of milt of some teleost fish. *Journal of Fish Biology*, 22: 351-361.
 28. DeGraaf, J.D., King, V.W., Benton, C., Berlinsky, D.L. (2004). Production and storage of sperm from the black sea bass *Centropristis striata*. *Aquacult. Res.*, 35: 1457-1465.