

**T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
DÖLERME VE SUNİ TOHURLAMA (VETERİNER) ANABİLİM DALI**



**BAL ARISI BESİNİNE SHİLAJİT İLAVESİNİN SPERMA  
DONDURULMASI ÜZERİNE ETKİLERİ**

Doktora Tezi

**Arda Onur ÖZKÖK**

Danışman

**Doç. Dr. Murat SELÇUK**

SAMSUN  
2021

## TEZ KABUL VE ONAYI

Arda Onur ÖZKÖK tarafından, Doç. Dr. Murat SELÇUK danışmanlığında hazırlanan “Bal Arısı Besinine Shilajit İlavesinin Sperma Dondurulması Üzerine Etkileri” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 25.6.2021 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	İmza	Sonuç
Başkan	Prof. Dr. Ongun UYSAL Ankara Üniversitesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı		<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
	Doç. Dr. Murat SELÇUK Ondokuz Mayıs Üniversitesi (Danışman) Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı		<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye	Prof. Dr. Mehmet KAYA Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fizyoloji Anabilim Dalı		<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye	Doç. Dr. Deniz YENİ Afyon Kocatepe Üniversitesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı		<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Eser AKAL Ondokuz Mayıs Üniversitesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı		<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

ONAY

... / ... / ...

Prof. Dr. Ali BOLAT  
Enstitü Müdürü

## BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Dönem Projesi tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

İmza

... / ... / 20...

Arda Onur ÖZKÖK

## TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

**Tez Başlığı :** Bal Arısı Besinine Shilajit İlavesinin Sperma Dondurulması Üzerine Etkileri

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 02.06.2021 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 3

Tek kaynak oranı : % 1 çıkmıştır.

İmza

25/ 06 / 2021

Doç. Dr. Murat SELÇUK

## ÖZET

### BAL ARISI BESİNİNE SHİLAJİT İLAVESİNİN SPERMA DONDURULMASI ÜZERİNE ETKİLERİ

Arda Onur ÖZKÖK

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Dölerme ve Suni Tohumlama (Veteriner) Ana Bilim Dalı

Doktora, Haziran/2021

Danışman: Doç. Dr. Murat SELÇUK

Bu doktora tez projesinin amacı shilajitin bal arısı besinine ilavesinin bal arılarında sperma dondurulması üzerine etkilerini araştırmaktır. Doktora tez çalışmasında toplam 25 adet kraliçe arısı bulunmayan erkek arı üretim kolonisi kullanılmıştır. Çalışmada 5 tekrarlı 5 grup, toplamda 25 koloni bulunmaktadır. Çalışma grupları; SH-0 (0 mg), SH-1 (5 mg), SH-2 (10 mg), SH-3 (15 mg) ve SH-4 (20 mg) dozlarında olarak toplam 5 farklı doz shilajit gün aşırı olarak arı besinine katılmıştır. Besinine shilajit katılmış olan bal arılarından sperma toplanmıştır. Her bir gruptan ayrı ayrı olarak toplanan sperma numuneleri aynı gün içinde Kiev solüsyonu ile sulandırılıp, her bir grup için ayrı olarak 0,25 ml'lik payetler içerisine aktarılmıştır. Sperma numuneleri daha sonra 2 saat süre ile 4°C' de bulunan buzdolabı içinde ekilibrasyon işlemine tabi tutulmuştur. Sperma numuneleri uzun süreli saklanmak üzere sıvı azot buharında dondurulmuş ve -196 °C sıvı azot içerisinde saklanmıştır. Daha sonra sperma numuneleri 37 °C' de çözdürülmüştür ve her bir grup için spermatolojik parametreler (motilite, akrozom bütünlüğü, hipoozmotik şişme testi (HOST), spermatozoa yoğunluğu) ve shilajitin antioksidan etkinliğini belirlemek için total oksidan ve total antioksidan yönünden incelenmiştir. Doktora tez çalışması bulgularına bakıldığında; farklı dozlarda kullanılan shilajitin motilite, HOST, akrozom bütünlük değerleri karşılaştırıldığında tüm çalışma gruplarında kontrol grubuna kıyasla yüksek olduğu gözlenmiştir. Shilajitin özellikle SH-3 ve SH-4 gruplarının motilite, HOST ve akrozom bütünlük yönünden oldukça etkili olduğu görülmektedir. Sonuç olarak, shilajitin bal arısı besinine ilavesinin, bal arısı spermasında çözüm sonrası spermatolojik parametreleri olumlu yönde etkilediği sonucuna ulaşıldı.

**Anahtar Sözcükler:** Antioksidan, bal arısı, dondurma, shilajit, sperma.

**ABSTRACT**  
**EFFECTS OF SHILAJIT ADDITION TO HONEY BEE FOOD ON  
SEMEN FREEZING**

Arda Onur ÖZKÖK  
Ondokuz Mayıs University  
Institute of Graduate Studies  
Department of Reproduction and Artificial Insemination  
Phd, 2021  
Supervisor: Assoc. Prof. Murat SELÇUK

The aim of this doctoral thesis project is to investigate the effects of adding shilajit to honey bee food on sperm freezing in honey bees. In the doctoral thesis, a total of 25 drone breeding colonies without queen bees were used. In the study, there are 5 groups with 5 repetitions, a total of 25 colonies. Working groups; A total of 5 different doses of shilajit in SH-0 (0 mg), SH-1 (5 mg), SH-2 (10 mg), SH-3 (15 mg) and SH-4 (20 mg) doses are added to bee food every other day participated. Semen were collected from honey bees that had shilajit added to their diet. Semen samples collected separately from each group were diluted with Kiev solution on the same day and transferred into 0.25 ml straws separately for each group. Semen samples were then subjected to the equilibration process in a refrigerator at 4°C for 2 hours. Semen samples were frozen in liquid nitrogen vapor for long-term storage and stored in liquid nitrogen at -196 °C. Then, semen samples were thawed at 37°C and spermatological parameters (motility, acrosome integrity, hypoosmotic swelling test (HOST), spermatozoa concentration) for each group were examined in terms of total oxidant and total antioxidant to determine the antioxidant activity of shilajit Considering the findings of the doctoral thesis study; When the motility, HOST, acrosome integrity values of shilajit used in different doses were compared, it was observed that it was higher in all study groups compared to the control group. Shilajit seems to be highly effective in terms of motility, HOST and acrosome integrity, especially of SH-3 and SH-4 groups. As a result, it was concluded that the addition of shilajit to honeybee food positively affects post-solution spermatological parameters in honeybee semen.

**Keywords:** Antioxidant, honey bee, freezing, shilajit, semen

## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında yardımcı olan, bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen Danışman hocam Sayın Doç. Dr. Murat SELÇUK başta olmak üzere, Prof. Dr. Mehmet KAYA'ya, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mesut ÇEVİK'e, Dr. Öğr. Üyesi Eser AKAL'a, tez sürecinde her zaman desteğini esirgemeyen değerli kardeşim Araş. Gör. Burcu ESİN'e, çalışma boyunca karşılaştığım her sorunda her zaman destek olan Dr. Öğretim Üyesi Gözde Kılınç'a ve daima yanımda olduklarını bildiğim aileme teşekkürlerimi sunarım.

Arda Onur ÖZKÖK



## İÇİNDEKİLER

<b>TEZ KABUL VE ONAYI</b> .....	<b>i</b>
<b>BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI</b> .....	<b>ii</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iv</b>
<b>ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR</b> .....	<b>v</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. BAL ARISI</b> .....	<b>2</b>
2.1. Bal Arısının Sınıflandırılması .....	2
2.2. Bal Arısının Anatomisi.....	2
2.3. Koloni Bireyleri.....	4
2.3.1. İşçi Arı .....	4
2.3.2. Erkek Arı .....	6
2.3.3. Kraliçe Arı .....	11
<b>3. BAL ARILARINDA SUNİ TOHURLAMA</b> .....	<b>14</b>
3.1. Bal Arılarında Suni Tohumlamanın Tarihçesi .....	14
3.2. Suni Tohumlama Amacıyla Kraliçe Arıların Üretilmesi ve Çiftleşme Kutularına Verilmesi .....	14
3.3. Suni Tohumlama Amacıyla Erkek Arıların Üretilmesi.....	15
3.4. Suni Tohumlama Amacıyla Üretilen Erkek Arıların Toplanması.....	15
3.5. Erkek Arılardan Sperma Alınması .....	16
3.6. Kraliçe Arıda Suni Tohumlanma.....	18
<b>4. BAL ARISINDA SPERMA MUAYENESİ</b> .....	<b>20</b>
4.1. Motilite Testi .....	20
4.2. Spermatozoa Yoğunluğu .....	20
4.3. Plazma Membran Bütünlüğü.....	20
4.4. Akrozom Bütünlüğü .....	20
<b>5. BAL ARISI SPERMASININ SAKLANMASI</b> .....	<b>21</b>
5.1. Bal Arısı Spermasının Kısa Süre Saklanması .....	21
5.2. Bal Arısı Spermasının Uzun Süreli Saklanması .....	21
<b>6. KRİYOPROTEKTANLAR</b> .....	<b>23</b>
<b>7. OKSİDATİF STRES</b> .....	<b>24</b>
<b>8. ANTİOKSİDANLAR</b> .....	<b>26</b>
8.1. Shilajit .....	36
<b>9. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	<b>40</b>

9.1. Materyal.....	40
9.1.1. Çalışma Planı ve Kolonilerin Hazırlanması .....	40
9.1.2. Kolonilerin Seçimi ve Grupların Oluşturulması.....	40
9.2. Yöntem .....	41
9.2.1. Seçilen Kolonilerin Çalışma İçin Düzenlenmesi .....	41
9.2.2. Çalışma Grupları İçin Şurupların Hazırlanması .....	42
9.2.3. Çalışma Gruplarının Beslenmesi .....	44
9.2.4. Erkek Arı Üretimi .....	44
9.2.5. Olgunlaşan Erkek Arıların Toplanması .....	45
9.2.6. Toplanan Erkek Arılardan Sperma Alınması .....	46
9.2.7. Spermanın Sulandırılması.....	48
9.2.8. Sulandırılan Spermanın Payetlere Çekilmesi .....	49
9.2.9. Payetlere Çekilen Spermanın Dondurulması.....	50
9.2.10. Spermanın Değerlendirilmesi .....	51
<b>10. BULGULAR VE TARTIŞMA.....</b>	<b>56</b>
<b>11. SONUÇ .....</b>	<b>64</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>65</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>69</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	Santigrat Derece
AgNO <sub>3</sub>	Gümüş Nitrat
BSA	Bovine Serum Albumine
cm <sup>3</sup>	Santimetreküp
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
CPA	Kriyoprotektan ajan
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
G6PD	Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz
GLP	Gliserol Fosfolipid
GSH	Glutasyon
GSSG	Glutasyon Disülfid
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen Peroksit
HOST	Hipo-Ozmotik Şişme Testi
KCl	Potasyum Klorür
L	Litre
LH	Luteinleştirici Hormon
MDA	Malondialdehit
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
NaCl	Sodyum Klorür
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NaHCO <sub>3</sub>	Sodyum Bikarbonat
PBS	Phosphate Buffer Salin
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
TAS	Total Antioksidan Seviyesi
TOS	Total Oksidan Seviyesi
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Bal arısı anatomisi ( <a href="http://www.hayvansagligi.net/etiket/ari">www.hayvansagligi.net/etiket/ari</a> ).....	2
Şekil 2.2. İşçi arılar .....	5
Şekil 2.3. İşçi arı gelişim aşamaları (Suwannapong, vd., 2012) .....	5
Şekil 2.4. Erkek arı çiftleşme organı (Woyke, 2008).....	7
Şekil 2.5. Testisin bölümleri: A:Testis (T), Eklenti bezi (AG), Veziküler bez (AT), Sperma boşaltım kanalı (ED) B:Spermatika (S), Spermatika bezi (SG) (Den Boer, vd., 2009'dan uyarlanmıştır) .....	7
Şekil 2.6. Erkek arı eklenti bezleri (Gorshkov, vd., 2015).....	9
Şekil 2.7. Olgunlaşmamış erkek arı (Woyke, 2008) .....	9
Şekil 2.8. Bursal kornu, endoplallus, mukus (Woyke, 2008) .....	10
Şekil 2.9. Endophallus, mukus, sperma (Cobey, vd., 2013) .....	10
Şekil 2.10. Kraliçe arı.....	11
Şekil 2.11. Bal arısı oğul .....	12
Şekil 3.1. Sperma almak amacıyla işaretlenen erkek arılar .....	16
Şekil 3.2. Koloni girişine konulan erkek arı yakalama düzeneği.....	16
Şekil 3.3. Harbo siringa (Cobey, vd., 2013).....	17
Şekil 3.4. Mukus (Cobey, vd., 2013) .....	18
Şekil 3.5. Bal arısı sperma (Cobey, vd., 2013) .....	18
Şekil 3.6. Bal arısı suni tohumlama .....	19
Şekil 8.1. Shilajit (Agarwal, vd., 2007) .....	36
Şekil 9.1. Erkek arı üretimi için tasarlanmış 6 çıtalı ruşet deneme kovanları.....	41
Şekil 9.2. Shilajit çözeltisi.....	42
Şekil 9.3. Shilajit eritilmiş çözelti .....	43
Şekil 9.4. Hazırlanan şuruba shilajit ilavesi .....	43
Şekil 9.5. Çalışma kolonilerinin beslenmesi .....	44
Şekil 9.6. Erkek arı üretim sürecince oluşan kraliçe arı yüksükleri.....	45
Şekil 9.7. Erkek arı üretim çitası ve olgunlaşmış erkekler.....	45
Şekil 9.8. Erkek arı petek gözleri ve erkek arılar .....	46
Şekil 9.9. Erkek arı kapanı .....	46
Şekil 9.10. Sperma alma düzeneği stereo mikroskop .....	47
Şekil 9.11. Sperma alma.....	48
Şekil 9.12. Cam kanül ile sperma alma.....	48
Şekil 9.13. Sulandırılmış sperma .....	49
Şekil 9.14. Payete çekilmeye hazır sperma .....	49
Şekil 9.15. Payete çekilen bal arısı sperması .....	50
Şekil 9.16. Sperma ekilibrasyon .....	50
Şekil 9.17. Payetlerin azot buharında soğutulması .....	51
Şekil 9.18. Payetlerin azot tankına aktarılması .....	51
Şekil 9.19. HOST değerlendirmesi .....	53
Şekil 9.20. PSA-FITC ile boyanmış spermatozoon .....	54
Şekil 9.21. PSA-FITC ile boyanmış spermatozoa .....	54
Şekil 9.22. Total Antioksidan ve Oksidan Seviyeleri Ölçümünde Kullanılan Spektrofotometri Cihazı.....	55
Şekil 10.1. Çalışma gruplarında çözüm sonrası spermada TAS ve TOS parametreleri .....	62

## TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 10.1. Çalışma gruplarında çözüm sonrası spermatolojik parametreler.....	56
-------------------------------------------------------------------------------	----



## 1. GİRİŞ

Bal arılarında verim özelliklerini artırmak amacıyla suni tohumlamadan yararlanmak, genetik ilerleme sağlamak, ıslah çalışmaları yapmak için uygun kolonilere sahip olmak gerekir. Kolonilerin akrabalık durumunun artması sonucu yavru ölümlerine sebep olan gen hataları oluşabilir (Danka, vd., 1986). Kolonilerde akrabalı yetiştiriciliğin önüne geçmek ve ana arıdan kaynaklanan hastalıkların önlenmesi için uygun ırk ve istenilen özellikteki kolonilerden kan katımı yapmak gerekir. Dolayısıyla bölgedeki kolonilerdeki erkek arılarla çiftleşme zorunda kalınması ciddi bir sorundur. Bal arısı spermasının saklanabilmesi bu gibi sorunların çözülebilmesi için anahtar konumundadır (Hopkins ve Herr, 2010).

1920'li yıllarda bal arılarında sperma toplanması ve suni tohumla ilgili çalışmalar yapılmıştır. 1940-1950 yılları arasında bal arılarında genetik alanda ilerleme kaydedilmiştir. Son yıllarda suni tohumlama uygulamalarında tekrarlanabilen büyük başarılar elde edilmiştir (Cobey, 2007). Ülkemizde arıcılık dünyadaki gelişmelere paralel olarak hızla ilerlemektedir. Bu alanda yapılan yeni uygulamalar ve çalışmalar ülkemizde de takip edilmektedir. Son yıllarda özellikle arı spermasının saklanması ve suni tohumlama alanında yapılan çalışmalar ve sağladığı yararlar büyük ilgi uyandırmaktadır.

Shilajit, uzun yıllardan beri tıp alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. Shilajit yüksek antioksidan ve antienflamatuvar özelliktedir. Shilajit yapısında bulunan quinon-semiquinon-hidroquinon kompleks, katalaz, süperoksid dismutaz, glutasyon peroksidaz gibi bileşenler sayesinde spermayı dondurma çözme sırasında meydana gelebilecek lipid peroksidasyona karşı koruyucu özelliktedir.

Bu doktora tezinin amacı; bal arısı besinine farklı dozlarda katılan, antioksidan ve antienflamatuvar özelliği bilinen shilajitin bal arısı spermasının uzun süreli saklanmasına etkilerini belirlemektir.

## 2. BAL ARISI

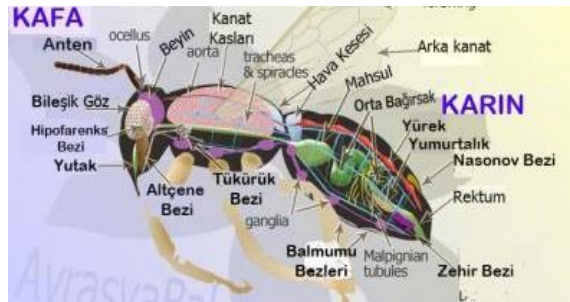
### 2.1. Bal Arısının Sınıflandırılması

Phylum (Şube)	: Arthropoda (eklem bacaklılar)
Class (Sınıf)	: Insecta
Order (Takım)	: Hymenoptera (zar kanatlılar)
Suborder (Alt Takım)	: Apocrita (karıncalar, bal arıları, eşekarıları)
Super Family (Üst Aile)	: Apoidea (8-10) aile
Family (Aile)	: Apidae
Tribe (Boy)	: Apini (Uzun dilli olan ve parazit özelliği olmayan)
Genus (Cins)	: Apis
Species (Tür)	: Mellifera (bal veren) (Vatansever, 2004)

### 2.2. Bal Arısının Anatomisi

Bal arısı genel olarak head (baş), thorax ve abdomen (karın) olmak üzere üç bölümden oluşmaktadır (Şekil 2.1). Baş kısmında bir çift anten, üç basit göz ve bir çift bileşik göz yer almaktadır. Basit gözler birlikte işlev görmekte olup, arı tarafından karanlık ve aydınlığı saptamada fonksiyon gösterdiği bilinmektedir. Bileşik gözler cisimlerin rengini algılama, şekil ve formunu belirlemede görev alır. Bileşik gözlerden ayrı olarak bulunan 3 adet basit göz ise karanlık ve aydınlığı ayırt edecek fonksiyona sahiptir. Ayrıca arılarda mouthpart denilen çene, ağız ve organellerini içeren bir yapı bulunur (Weiss ve Vergara, 2002).

Bal arılarında thorax üzerinde bacaklar ve kanatlar bulunmaktadır. Arılarda üç çift bacak bulunmakta ve bunlardan arka bacaklarda arının polen toplaması için özel bir yapı bulunmaktadır. Ayrıca bacakların arının vücudunu temizlemesinde de görevi olduğu bilinmektedir. Thorax üzerinde bir çift, çift katlı kanatlar yer almaktadır (Weiss ve Vergara, 2002).



Şekil 2.1. Bal arısı anatomisi ([www.hayvansagligi.net/etiket/ari](http://www.hayvansagligi.net/etiket/ari))

Arılarda oldukça esnek bir yapıya sahip olan abdomen yani karın kısmı tek parçadan oluşmaktadır. Bu kısımda, iç organların önemli bir bölümü ve üreme organı ile iğne bölümü yer almaktadır. Arı iğnesi normal şartlarda dışarıdan görünmemektedir. Arılarda parçalayıcı aynı zamanda yalayıcı-emici ağız yapısı bulunmaktadır. Bal arısında ağızdan anüse kadar sindirim kısmı bulunur. Yiyecekler orta bağırsaktan son bağırsağa kadar sindirime uğrarlar ve kana karışır. Sindirim kısmında bal midesi de denilen bölüm yer almaktadır. Boşaltım sistemi renal tubüller benzeri nefrotik bir yapı gösterir. Bal arılarında sindirim sonucu oluşan artık maddeler sindirim kanalının sonunda güçlü bir kese içinde depolanabilir. Bu şekilde kış ayları gibi dışarı çıkmanın zor olduğu zamanlarda artık maddeler uzun süre tutulabilir (Weiss ve Vergara, 2002).

Arılarda dolaşım, açık damar sistemi şeklindedir. Çok odacıklı yapıya sahiptir. Karın bölgesinde tubüler yapıda çok odacıklı kalbe benzeyen thorax'tan karına doğru kanı pompalayan özel bir yapı bulunmaktadır. Thoraxta aortaya benzeyen güçlü damar bulunduğu bilinmektedir. Thoraxa doğru gelen kan bu yapı sayesinde tekrar geriye doğru yönlendirilerek tüm organlara ulaşmaktadır. Bacaklar, kanatlar, antenler gibi organlarda hareket esnasında titreştiğinde kanın iletilmesine destek olduğu bilinmektedir. Arıların kanı renk maddesi bulundurmamaktadır ve kırmızı kan hücrelerinden yoksun olup, savunma hücreleri ve bazı kan hücrelerini içermektedir. Arı kanı, artık maddeler, besin ve hormonları taşıma kapasitesine sahiptir. Ancak oksijen ve karbondioksit taşıma fonksiyonu bulunmamaktadır (Weiss ve Vergara, 2002).

Arılarda solunum sistemi bütün iç organlara ulaşan trakea solunum sistemi denilen kompleks hava kesesi ağı ve dallarından oluşmaktadır. Trakhealar thorax kısmı ve abdomen üzerinde bulunan ve açılıp kapanan şekilde oluşmuş sıkı kitin yapılarıdır. Hava sirkülasyonunun sürdürülebilmesi için abdomen üzerindeki açıklıkların düzenli biçimde açılıp kapanması gerekmektedir (Weiss ve Vergara, 2002).

Arılarda sinir sistemi kademeli olarak sıralanan bir yapı göstermektedir. Başta beyinden başlayarak bir çift sinir demetinden çıkarak ve sinir uzantıları vücudun tüm kısımlarına doğru kök benzeri biçimde dağılmaktadır (Weiss ve Vergara, 2002).

Bal arılarında üreme organları kraliçe arıda abdomen içinde bir çift ovaryum, bir çift lateral oviduct, lateral oviductların birleşmesiyle meydana gelen geniş oviduct,

spermatheca kanalı spermanın depolanmasını sağlayan spermatheca ve vagina şeklindedir. Her bir ovaryum lateral oviducta açılmaktadır. Lateral oviduktun devamında bulunan medial oviduct bölümünün altında cep benzeri bir oluşum bulunmaktadır. Bursa copulatrix denilen bu bölüm doğal çiftleşmede spermanın bir süre bekletildiği bursal keseye (bursal pouch) açılmaktadır. Spermathecanın spermanın kullanılmak üzere depolandığı bölme olduğu bilinmektedir. Vaginanın iki tarafından da bursal pouch (kese) içine giren iki giriş deliği bulunmakta olup suni tohumlama uygulaması esnasında yanığa sebep olabildiği ifade edilmektedir. Vaginanın üst tarafından spermathecaya doğru spermatheca kanalı yer almaktadır. Kraliçe arı döllenirken sonra sperma, spermathecada ömür boyu depolanabilmektedir (Mackensen ve Tucker, 1970).

Erkek bal arısında üreme organları bir çift testis, bir çift sperma kanalı (vas deferens), bir çift mukus bezi, sperma boşaltım kanalı (ductus ejaculatus) endophalus denilen penisin dışarı çıkan kısmı şeklinde sıralanmaktadır. Endophalus kabaca üç bölümden oluşmaktadır. Penis ampullası (bulb of penis) ve penis boynu (cervix of penis) ile giriş boşluğundan (vestibulum of penis) oluşmaktadır (Woyke, 2008). Vas deferens sarmal yaparak testis ile seminal vezikülü birbirine bağlamaktadır. Seminal vesikül alt kısmında mukus bezi içine açılmaktadır. İki adet mukus bezi alt kısma doğru birleşerek ductus ejaculatus vasıtasıyla penise bağlanmakta olup, mukus bezi salgısı cinsel olgunluk sürecine katkıda bulunduğu ifade edilmektedir (Mackensen ve Tucker, 1970).

## **2.3. Koloni Bireyleri**

### **2.3.1. İşçi Arı**

İşçi arılar, koloninin çekirdeğini oluşturmakla birlikte kolonideki en kalabalık gruplardır (Şekil 2.2). İşçi arıların kraliçe arılarda olduğu gibi döllenmiş yumurtadan geliştiği bilinmektedir. 33-36°C'lik sıcaklık aralığı yumurta gelişimi için önem arz etmektedir. İşçi arıların embriyo gelişimi ilk üç gün yumurta, sonraki altı gün larva ve 12 günü pupa olarak geçirdikten sonra gelişim sürecini tamamlayarak erginliğe ulaştıkları bilinmektedir (Suwannapong, vd., 2012). Yumurtadan larva formuna geçtiğinde petek hücresi içinde 'C' harfi şeklinde görünürler (Şekil 2.3). İşçi arıların kraliçe arıyla farkı beslenme şekline ileri gelmektedir. İşçi arı larvaları bakıcı işçi arılar tarafından belirli oranda arı sütü içeren yutak altı bezi (hypofarangeal bez) ve alt çene bezlerinden (mandibular bez) yavru bakım gıdası denilen besinle üç gün

beslendikten sonra ömürlerinin sonuna kadar polen ve balla beslenirler. Altıncı günün sonundan itibaren tükürük bezinden salgılanarak üretilen ipeksi maddeyle koza örür. Bütün bu gelişim evreleri için koloni iç ısı 35 °C den aşağı olmaması gerekmektedir. Aksi durumda gelişme süreci sekteye uğrayacağı veya durabileceği bilinmektedir (Vatansever, 2004).



Şekil 2.2. İşçi arılar



Şekil 2.3. İşçi arı gelişim aşamaları (Suwannapong, vd., 2012)

### **2.3.2. Erkek Arı**

Erkek bal arıları iri görüntüsüyle işçi arılardan kolayca ayırt edilebilmektedir. Erkek arılar döllenenmemiş yumurtadan gelişmekte olup, ilk 3 gün yumurta, 6,3 gün larva, 14,5 gün pupa olacak şekilde 24-25 günde ergin hale ulaşmaktadırlar. Pupa halindeki kapalı petek gözü bakıldığında dışa doğru çıkıntılı ve daha geniş görünür. Koloninin durumuna göre değişmekle birlikte genel olarak koloni toplamının 1/10-2/10' u kadarını oluşturdukları bilinmektedir. Erkek arı petek hücrelerinin genişliği işçi arı petek gözleri genişliğiyle karşılaştırıldığında daha büyüktür (Vatansever, 2004).

Erkek bal arıları döllenenmemiş yumurtadan geliştiklerinden kromozom sayıları (n) 16 olup diğer koloni bireylerinin yarısı kadardır (Laidlaw, 1979). Ergin hale gelen erkek arılar altı günden sonra uygun hava sıcaklığında rüzgarın fazla olmadığı akşama doğru zamanlarda çiftleşme uçuşuna çıkarlar. Erkek arıların çiftleşme uçuşuna çıkmış kraliçe arıları feromonlar yardımıyla buldukları bilinmektedir (Vatansever, 2004). Ortamda besin sıkıntısının olduğu veya çiftleşme mevsiminin sonlandığı süreçte kolonideki erkek arılar koloniden uzaklaştırılırlar. Döllenenmiş kraliçe arılar hem işçi hem de erkek arı yumurtası yumurtlayabilirler. Bunun dışında çiftleşmemiş ya da başarısız bir çiftleşme gerçekleştirmiş olan kraliçe arıların yanı sıra kraliçe arının kolonideki eksikliğinin uzun süre giderilemediği veya feromonlarının ulaşmadığı kolonilerde bazı işçi arılar da dölsüz erkek arı yumurtası yumurtlayabilmektedirler. Bu şekilde meydana gelen erkek arılarda dölleme yetisine sahip oldukları bilinmektedir (Vatansever, 2004).

#### **2.3.2.1. Erkek Arının Cinsel Gelişimi ve Olgunlaşması**

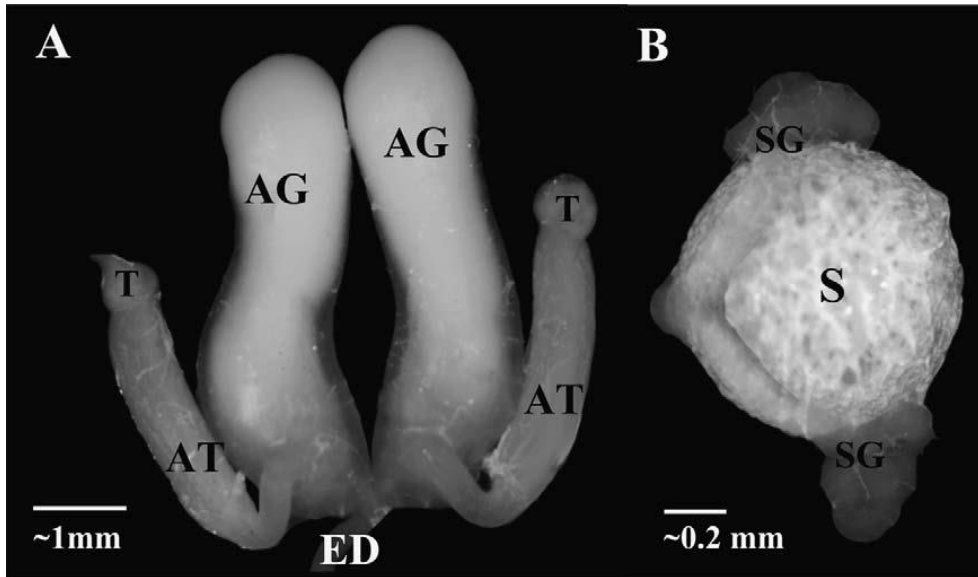
Erkek bal arıları ilkbahar aylarından sonbahar ayları sonuna kadar kolonide görülebilir. Havaaların ısındığı bahar aylarında uygun koşullara bağlı olarak sayıları da artmaktadır. Erkek arılarda pupadan çıktıktan sonraki sekiz ila on gün boyunca cinsel olgunluk süreci görülmekte, bu zaman içerisinde erkek arıların üreme sistemi çiftleşmeye yeter şekilde gelişim göstermektedir (Şekil 2.4). Uçma kaslarının yeterli düzeye ulaşması arının endokrin sistemi tarafından düzenlenmektedir. Corpora allata böceklerde larvadan pupa ve ergin hale geçmede etkisi olan juvenile hormonu salgılayan bezdir. Kademeli olarak artan Juvenile hormon düzeyi seksüel olarak erkek arının gelişmesine sebep olurken uçmayı teşvik etmektedir (Giray ve Robinson, 1996; Tozetto, vd., 1997; Colonello-Frattini ve Hartfelder, 2009).



Şekil 2.4. Erkek arı çiftleşme organı (Woyke, 2008)

### 2.3.2.2. Erkek Arıda Testis, Testis Bezi ve Eklenti Bezinin Önemi

Erkek arıda testiste üretilen sperma, testis vezikülünün (sperma depolama) kasılmasıyla sperma kanalına ilerlemektedir. Arı spermasında seminal sıvının büyük bir kısmını eklenti bezleri oluşturmaktadır (Şekil 2.5). Sperma, sperma kanalından çıktığı zaman eklenti bezinin salgısıyla karışır. Ayrıca eklenti bezi çiftleşme tıpası oluşturan mukusun üretilmesinde görev almaktadır (Den Boer, vd., 2009).

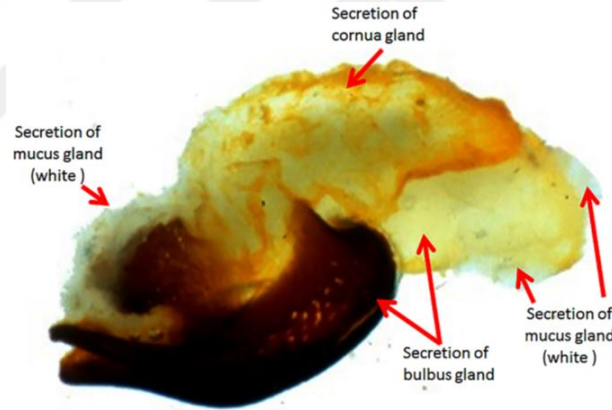


Şekil 2.5. Testisin bölümleri: A:Testis (T), Eklenti bezi (AG), Veziküler bez (AT), Sperma boşaltım kanalı (ED) B:Spermatika (S), Spermatika bezi (SG) (Den Boer, vd., 2009'dan uyarlanmıştır)

### 2.3.2.3. Erkek Arılarda Doğal Çiftleşme ve Mekanizması

Erkek arıda çiftleşme davranışı koloni dışında ve yüksekte gerçekleşmektedir. Çiftleşme anında karın kaslarını kontraksiyon yapmasını takiben arının hemolenfin oluşturduğu basınçla birlikte çiftleşme organının fonksiyonel kısmı olan endophallus dışı doğru dönerek çıkmaktadır (Woyke ve Ruttner, 1958). Bu sırada bursal kornular aşağıya doğru bükülmektedir (Woyke, 1955). Endophallus kraliçe arının çiftleşme organı içinde kısmen dışı doğru döndüğü anda erkek arı felç olmaktadır (Woyke, 2011). Çiftleşme uçuşundan koloniye dönen kraliçe arıda lateral oviductda sperma ve iğne bölümünde çiftleşme işareti görülür. Bu işaret mukusla dolu endophalusun bir kısmıdır. Çiftleşme işareti, bir sonraki çiftleşmeden hemen önce kornudan salınan sekresyonun yardımıyla erkek arılar tarafından uzaklaştırılır (Koeniger, 1986; Koeniger, vd., 1990). Başka ifadeyle diğer bir erkek arı tekrar çiftleşmek istediğinde kraliçe arının erkek arı tarafından kavranması sırasında ayaklarının yardımıyla çiftleşme işaretini yerinden çıkardığı bilinmektedir (Van Praagh, vd., 1980; Vallet ve Coles, 1993). Doğal çiftleşmede kraliçe arı başarılı bir çiftleşme gerçekleştirmişse kontrol edildiğinde iğne bölmesinde çiftleşme işareti ve lateral oviductta sperma görülmektedir. Çiftleşme işareti erkek arı endophalusunun kitin katmanı olup mukus ile bulaşık şekilde görülmektedir. Çiftleşme boyunca endophalus dönmesiyle ve mukusun artmasıyla birlikte sperma kraliçe arının vajinasına doğru iletilmektedir (Woyke, 2011). Woyke, (2008)'e göre çiftleşme sonunda endophalusun rotasyonu sona erdiği zaman erkek arı kraliçe arıdan ayrılmasıyla endophallustan kopan kısım kraliçe arının iğne bölümünün içine doğru itilmektedir. Çiftleşme işaretinin içerideki bu kısmı spermanın bir süre bekletildiği yer olan kraliçe arının bursa copulatrix civarında bulunmaktadır. Mukus hafif alkali özellikte olup erkek arının olgunlaşma sürecinde kıvam kazanmaktadır (Moors, vd., 2005). Mukus endophallus yırtıldığında çiftleşme tıpası oluşturmaktadır (Koeniger ve Koeniger, 2000). Bu sayede diğer erkek arılarla hızlı şekilde çiftleşmeye engel olduğu bilinmektedir (Koeniger ve Koeniger, 2000). Colonello ve Hartfelder (2003)'e göre mukus bezlerinin lümeninde protein sentezi gerçekleşmektedir. Bu proteinler seksüel olgunluk sürecine katkıda bulunur. Erkek arıların çiftleşme kabiliyetleri 28 gün sonra azalmaktadır (Rhodes, 2002). Moritz (1989)'a göre kraliçe arılar 12 günlük yaştaki erkek arıların spermalarıyla döllenebilirler. Seminal veziküllerin kasılmasıyla birlikte sperma kraliçe arıya iletilmektedir. Mukus bezinin sekresyonu bulbus bezinin sekresyonu tarafından örtülmüş olup bulbus bezi sekresyonu üstünde sperma bulunmaktadır (Şekil 2.6).

Çiftleşme anında endophalus kasılarak döndüğü zaman endophalusun bir parçası, kornu bezi sekresyonu, bulbusun sarımsı sekresyonu ve katılaştan mukus kraliçe arının vajinası içinde kalır. Endophallusun dışa çekilmesi sonucu erkek arı kraliçe arıdan ayrılır. Çiftleşme işareti endophallusun kraliçe arıda kalan kısmı olarak bilinmektedir (Collins, vd., 2006). Şekil 2.7’de olgunlaşmamış erkek arı görülmektedir. Bursal kornuların sarı renkte olması olgunlaşma belirtisi olarak bilinmektedir (Şekil 2.8). Endophallus dönme işlemini tamamladığında en üst kısımda mukus üzerinde sperma görülür (Şekil 2.9). Erkek bal arılarında bir spermatozoanın yapısı incelendiğinde 250-270 µm uzunluğa ve 0.7 µm genişliğe sahip olduğu görülmektedir. Bal arısı spermatozoasında kuyruk çok uzun olmasına karşın baş kısmı oldukça kısa yapıdadır. Baş bölgesi incelendiğinde akrozomal vezikülün yanı sıra doğrusal bir çekirdekten meydana geldiği görülmektedir. Kuyruk kısmı 9+9+2 mikrotübül içeren aksonemden oluşur. Kuyruk boyunca aksonemlerle aynı yöne doğru uzanan tazda yapılanmış mitekondriyal bölümler bulunmaktadır (Şekil 2.10).



Şekil 2.6. Erkek arı eklenti bezleri (Gorshkov, vd., 2015)



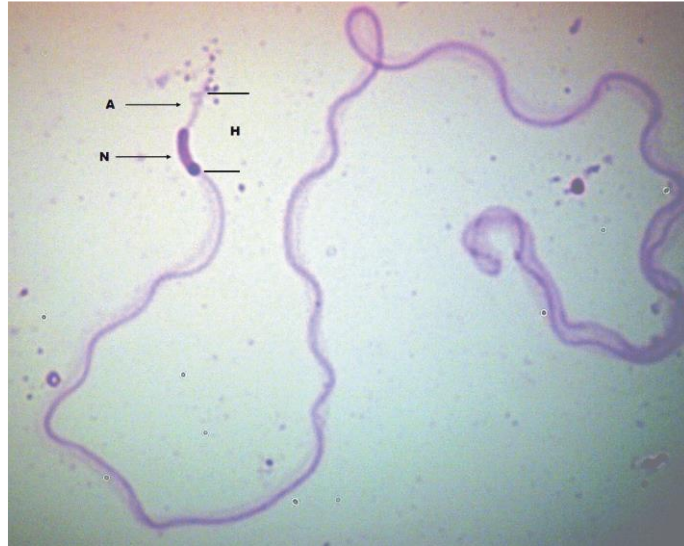
Şekil 2.7. Olgunlaşmamış erkek arı (Woyke, 2008)



Şekil 2.8. Bursal kornu,endoplallus,mukus (Woyke, 2008)



Şekil 2.9. Endophallus, mukus, sperma (Cobey, vd., 2013)



Şekil 2.10. Bal arısı spermatozoa H:Baş kısmı, A: Akrozom, N:Nükleus (Gontaz, vd., 2015)

### 2.3.3. Kraliçe Arı

Kraliçe arı, işçi arı gibi dişi karakterli olup koloni içerisindeki en önemli görevi yumurtlamaktır. Koloni yönetimi amacıyla feromon salgılaması da önemli bir diğer görevidir. Feromon, koloni hareketlerinin yanı sıra dişi karakterde olan işçi arıların davranışlarına da yön vermektedir. Kraliçe arı adayı olacak kuluçka gözleri gelişimi için yoğun arı sütüyle takviye edilir. İşçi arıda kraliçe arıda döllenmiş yumurtadan gelişmektedirler (Şekil 2.11). İşçi arı ilk üç gün arı sütü sonrasında bal ve polenle beslenir. Kraliçe arı ömrünün sonuna kadar arı sütü ağırlıklı olarak beslenir. İşçi arılar kraliçe arı olmadığı veya kraliçenin feromonlarının koloniye ulaşmadığı gibi durumlarda uygun işçi arı hücrelerini arı sütüyle takviye ederek kraliçe arıya dönüştürebilirler (Vatansever, 2004).



Şekil 2.10. Kraliçe arı

Kolonideki kraliçe arının koloni içi görevinin aksamasına sebep olan yaşlılık, sakatlanma gibi durumlarda işçi arılar tarafından kraliçe yenilemek amacıyla 1-4 arasında yüksük (kraliçe arı gözü) oluşturulur. Bu kraliçe değiştirme olarak bilinir. Yeni kraliçe arı döllenip yumurtlamaya başladığında eski kraliçe işçi arılarca öldürülmektedir (Genç ve Dodoloğlu, 2002).

Bal arısının oğul verme davranışı kalabalık kolonilerde içgüdüsel olarak görülmektedir (Şekil 2.12). 10-100 arası işçi arı petek hücresi kraliçe arı gözüne çevrilir. Yeni kraliçe arı ergen hale ulaşmış yüksükten çıktığında koloninin eski kraliçe arısı kendine bağlı arılarla birlikte koloniyi terk etmektedir (Genç ve Dodoloğlu, 2002).



Şekil 2.11. Bal arısı oğul

Bal arılarının oğula gitmesinin birçok sebebi bulunabilir. Aşırı sıklık, mevsime bağlı sıcaklık artışları, kraliçe arının yumurtlamasına uygun olmayan petekler ya da kraliçe arının yumurtlayacak alanının kalmaması, kraliçenin feromonlarının kolonideki tüm arılara ulaşmaması, işçi arıların görevsiz kalması ve kraliçe arının genetik olarak oğula meyilli olması bu sebeplerden bir kaçıdır. Kolonide doğal yollarla veya yanlış müdahaleler sırasında mevcut kraliçe arının ölmesi veya bulunmaması durumunda da kraliçe arı yüksükleri görülebilmektedir (Vatansever, 2004).

Sağlıklı bir kraliçe arı ortalama olarak günde 1500-2000 yumurta yumurtlayabilmektedir. Yumurtanın bileşenleri dış kısmında koryon adı verilen koruyucu bir tabaka, hemen bu tabakanın altında vitelin zar, stoplazma ve stoplazma içinde nükleus şeklindedir (Genç ve Dodoloğlu, 2002).

Kraliçe arı ergin hale döndükten yaklaşık bir hafta içerisinde hava koşulları uygunsa çiftleşme uçuşu için koloninin dışına çıkmakta ve oğula gitme durumu dışında bir daha koloniyi terk etmemektedir. Kraliçe arının feromonları etrafta bulunan erkek arıları cezbetmektedir. Yeteri kadar erkek arıyla çiftleşen kraliçe arı birkaç gün içerisinde yumurtlamaya başlar. Mevsim kraliçe arının yumurtlaması için uygunsa bir günde binden fazla sayıda yumurta yaptığı ve bazen de birkaç gün dinlendikten sonra yumurtlama işlemine devam ettiği bilinmektedir (Vatansever, 2004).

Şartlar uygun olduğunda kraliçe arının yaşam süresi birkaç yıl olabilmektedir.

Kraliçe arıda yumurtlama kapasitesinin yüksek olması, oğul vermeme, hastalıklar ve parazitlere karşı direnç, koloni temizliği, koloni savunması, propolis, polen ve bal verimi gibi istenilen genetik özelliklere sahip olması beklenen özelliklerden bir kaçıdır. Bu istenilen özelliklerin sürdürülebilmesi için kraliçe arının yenilenmesi gerekmektedir. (Vatansever, 2004).

Kraliçe arı yenilenmesi doğal yollarla veya kontrollü olarak iki şekilde yapılmaktadır. Doğal yollarla kraliçe arı yenilemesi oğul alma, kraliçenin öldürülerek yenilenmesi gibi yöntemleri içermektedir. Doğal yollarla kraliçe yenilenmesi zahmetsiz olması, ucuz olması gibi avantajları olmasının yanı sıra kraliçenin istenilen vasıflarda olmaması, döllen kraliçe arının yumurtlamasından ilk işçi arıların uçmasına kadar geçen sürenin 40 günden fazla olması gibi olumsuz tarafları da bulunmaktadır. Bilindiği üzere kraliçe arı ergin hale geldikten birkaç gün sonra uygun hava koşullarında çiftleşme uçuşuna çıkmaktadır. Çiftleşme davranışı havada gerçekleşmektedir. Etrafta bulunan bütün erkekler arılar kraliçe arıyla çiftleşebilmek için rekabet ederler. Kraliçe arı 10-15 civarında erkek arıyla çiftleşebilmektedir. Genetik ve istenilen özellikler yönünden vasıfsız olan erkek arılarla çiftleşen kraliçe arıda verim düşüklüğü gözlenebilmektedir. Ayrıca kraliçede genetik ve fiziksel olarak standartların çok altında olabilmektedir. Doğal yolla çiftleşen kraliçe arının yumurtlamasını takiben işçi arılar 21 günde ergin hale gelebilmektedirler. Ergin hale gelen işçi arıların koloniye ürün anlamında katkıda bulunmaya başlaması çok daha uzun zaman almaktadır. Kontrollü kraliçe arı üretimi doğal yöntemlere göre daha zahmetli ve maliyeti yüksek olmasına karşın kraliçe arı üretimi ve kraliçe arının döllenmesinde kullanılacak yöntemlere göre amaca yönelik kaliteli kraliçe arılar üretmek mümkün olabilmektedir. Bu amaçla doolitle, miller gibi metotlar veya özel olarak kraliçe üretim kitleleri yararlı olabilmektedir (Vatansever, 2004).

### **3. BAL ARILARINDA SUNİ TOHUMLAMA**

#### **3.1. Bal Arılarında Suni Tohumlamannın Tarihçesi**

Arıcılık alanında suni tohumlamannın uygulaması Genç ve Dodoloğlu, (2002)'ye göre 1814 yılında kıldan yapılmış bir fırça yardımıyla Huber spermayı vajinaya aktarılması ile başlamıştır. 1926'da Dr. Watson erkek arılardan bir şırınga yardımıyla topladığı spermaları mikroskop kullanarak kraliçe arıya iletmeyi başarmıştır. Nolen, özel bir şırınga geliştirmiş ve kraliçe arıyı hareketsiz kılmak için eter kullanmıştır. 1980-1982 yıllarında Kaptanoğlu ve Peng geliştirdikleri özel teknik yardımıyla erkek arıdan mikroskop olmaksızın daha fazla sperma toplayabilmişlerdir (Genç ve Dodoloğlu, 2002).

Uygur'a (2004) göre, Watson ve Nolan'ın vagina valfini bilmemeleri yumurta kanallarına spermanın enjeksiyonunu tam olarak yapamamalarına ve istenilen başarının elde edilememesine neden olmuştur. Laidlaw 1930'da anestezi amacıyla CO<sub>2</sub> kullanmayı denemiş ve olumlu sonuç elde etmiştir. Ayrıca Laidlaw 1944 yılında kraliçe arıda dölyolunda vajinal valf olduğunu tespit etmiştir). Mackensen, Laidlaw'ın tohumlama esnasında anestezik olarak kullandığı CO<sub>2</sub>'i tohumlamadan sonra en az bir gün arayla iki kez uyguladığında, suni tohumlanmış kraliçe arıların doğal çiftleşen arılar gibi erken yumurtlamaya başladıklarını saptamıştır. Mackensen ve Roberts 1948 yılında bal arılarında suni tohumlamada geliştirdikleri bir aletle vulvayı görünür şekilde iki kanca yardımıyla aarak özel bir şırınga yardımıyla valfi aşıp oviducta kadar ulaşabilmişlerdir. Bu alet günümüzde bal arılarında yaygın olarak kullanılan aletler arasındadır.

#### **3.2. Suni Tohumlama Amacıyla Kraliçe Arıların Üretilmesi ve Çiftleşme Kutularına Verilmesi**

Birçok kraliçe üretim yöntemi bulunmasına rağmen en çok tercih edilen yöntem Dolittle yöntemidir. Suni tohumlama amacıyla üretilecek kraliçe arıların daha fazla arı sütüyle beslenip istenilen kalitede olması için başlatıcı kolonilere verilen transfer çıtasındaki yüksük sayısı 30'u geçmemelidir (Genç ve Dodoloğlu, 2002). Transfer işleminde sonraki onuncu günde çıkmak üzere olan yüksükler alınarak çiftleşme kutularına dağıtılmaktadırlar. Çiftleşme kutularında yüksüklerden çıkan bakire kraliçe arılar 5 ile 10 günlük yaş aralığında suni tohumlama için elverişli olabilmektedirler (Cobey, 2007).

### **3.3. Suni Tohumlama Amacıyla Erkek Arıların Üretilmesi**

Suni tohumlama zamanı geldiğinde ortamda istenilen sayıda cinsel olgunluk aşamasına ulaşmış erkek arı olması gerekmektedir. Erkek arı döllenenmemiş yumurtadan geliştiği için genetik olarak kraliçe arı kadar önemi bulunmaktadır. Sağlıklı erkek arı yetiştirmenin birçok yolu bulunmakla birlikte genellikle tercih edilen yöntem istenilen damızlık vasıflara sahip koloniye verilen erkek arı gözlü peteklere kraliçe arının yumurtlamasını sağlamak ve yumurtalar pupa haline ulaştıklarında mevcut diğer kolonilere dağıtmaktır. Erkek arı üretimi kraliçe arı üretiminden yaklaşık beş-altı hafta önce başlamaktadır. Mevcut kraliçe arı erkek gözlü petekle birlikte kraliçe ızgarası kullanılarak sınırlandırılmakta ya da döllenenmemiş kraliçe arı kullanılmaktadır. Çiftleşmemiş kraliçe arı CO<sub>2</sub> ile belirli süre anestezi edilerek yumurtlama teşvik edilebilmektedir. Bu işlemlerin sonrasında pupa formuna geçen erkek arı gözlü çıtalar kraliçe arısı alınmış güçlü kolonilere verilerek belirli aralıklarla koloniye işçi arı gözü içeren ıtalarla yavru takviyesi yapılmaktadır. Ayrıca erkek arı kolonilerinden kaliteli sperma alabilmek amacıyla şurup ve polen takviyesiyle beslenmektedirler (Genç ve Dodoloğlu, 2002).

### **3.4. Suni Tohumlama Amacıyla Üretilen Erkek Arıların Toplanması**

Erkek arıların çıkımı gözlenip çıkan erkek arılar işaretlenerek yaklaşık iki haftalık yaşta olduklarında cinsel olarak verimli zamanlarında suni tohumlama amacıyla toplanmaktadırlar (Şekil 3.1). Çiftleşme olgunluğuna ulaşmış erkek arılar çiftleşme uçuşundan dönüşleri sırasında koloni önüne konulan ızgara yardımıyla yakalanabilmektedirler (Şekil 3.2). Toplanan erkek arılar koloni dışında uzun süre yaşayamadıklarından mümkün olduğunca hızlı kullanılmalıdırlar (Genç ve Dodoloğlu,2002).



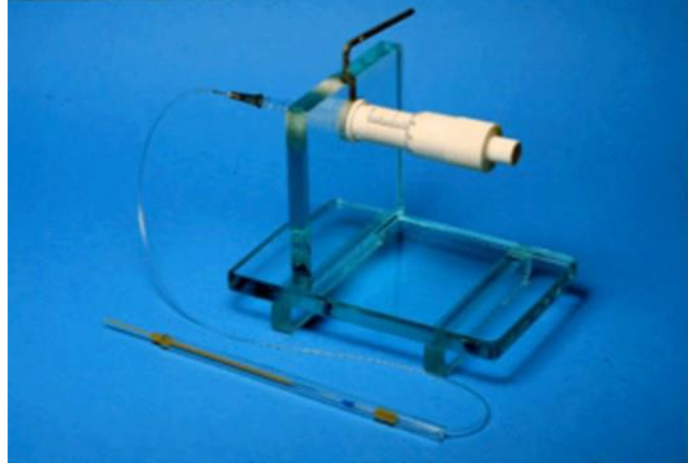
Şekil 3.1. Sperma almak amacıyla işaretlenen erkek arılar



Şekil 3.2. Koloni girişine konulan erkek arı yakalama düzeneği

### 3.5. Erkek Arılardan Sperma Alınması

Sperma almak amacıyla genellikle Mackensen'in şırınga düzeneği kullanılmaktadır. Düzenekte özel hidrolik su basıncıyla çalışan bir tüp ve ucunda sperma çekmeye yarayan cam kanül yer almaktadır (Şekil 3.3). Düzenegin içi saline solüsyonu gibi uygun sıvılarla doldurulur ve cihazın vidası çevrilerek sperma çekilir ya da boşaltılır (Genç ve Dodoloğlu, 2002).



Şekil 3.3. Harbo sıringa (Cobey, vd., 2013)

Sperma elde etmek amacıyla toplanan erkek arılar genişçe toplama kaplarında tutulduklarında erkek arıların uçarak ısınmaları sperma alma uygulamasında başarı şansını artırmaktadır (Collins, 2003). Uygun konumda kavranan erkek arılar thorax'a ve abdomen'e uygulanan basınç yardımıyla uyarılmakta ve erkek arının çiftleşme organının ters dönmesi sağlanmaktadır (Harbo, 1985; Moritz, 1989). Erkek arının endophalus'u 2 aşamada pozisyonunu tamamlamaktadır. Erkek arının thorax ve başına doğru uygulanan basınçla genital organ kısmen ortaya çıkmaktadır. Bu konumda abdomendeki yumuşaklık ve kornulardaki turuncu rengin görülememesi erkek arıda sperma alınabilmesi için gereken olgunluğun bulunmadığını işaret etmektedir (Cobey, vd., 2013). Mukus bezinin sekresyonunun üzerinde bulbus bezi sekresyonu ve üstünde de sperma görülmektedir (Colonello ve Hartfelder, 2003). Sperma alınırken dikkat edilmesi gereken husus spermayı çekerken mukus ile temastan kaçınmaktır (Şekil 3.4). Aksi takdirde spermanın alındığı cam kanül tıkanabilmektedir. Sperma farklı rengiyle mukustan ayırt edilebilmektedir (Şekil 3.5). Spermanın kuruyarak zarar görmemesi amacıyla sperma alma işleminin mümkün olduğunca hızlı bir şekilde yapılması gerekmektedir. Bir kraliçe arıyı verimli şekilde tohumlamak için 8 - 10 µl spermaya ihtiyaç olmakla birlikte ortalama olarak her bir erkek arıdan 1 µl kadar sperma alınabilmektedir (Cobey, vd., 2013).



Şekil 3.4. Mukus (Cobey, vd., 2013)



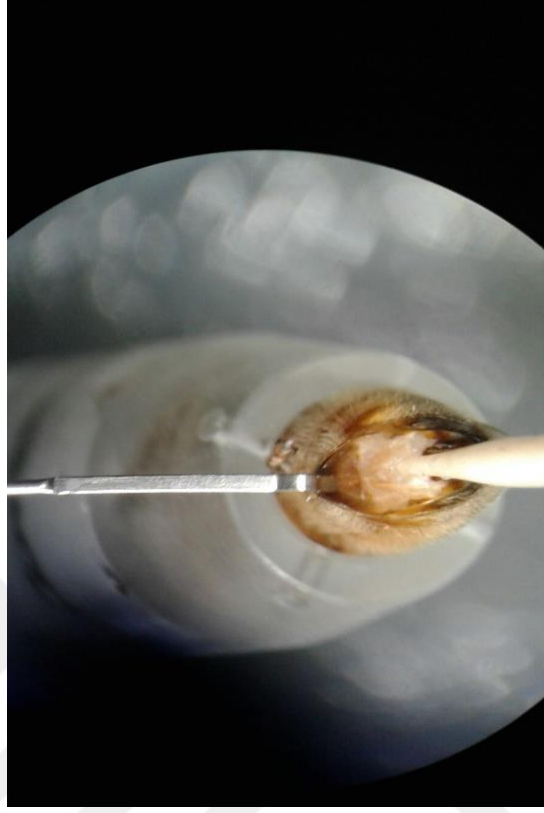
Şekil 3.5. Bal arısı sperma (Cobey, vd., 2013)

### 3.6. Kraliçe Arıda Suni Tohumlanma

Suni tohumlama amacıyla yetiştirilen kraliçe arıların suni tohumlama zamanı gelene kadar çiftleşme uçuşuna çıkmaması gerekmektedir. Ancak kraliçe yaşlandıkça ovaryumları suni tohumlama için gereken fiziksel yapısını kaybettiğinden suni tohumlama uygulaması güçleşmektedir. Suni tohumlama yapılacak kraliçe arı koloniden alınarak birkaç bakıcı işçi arıyla beraber uygulama odasına getirilir ve CO<sub>2</sub> ile anestezi uygulanarak suni tohumlama için hazırlanır (Genç ve Dodoloğlu, 2002).

Sabit olarak tespit edilen kraliçe arının vajinası sağlı sollu karın kancası ve iğne tutucu yardımıyla açığa çıkarılır. İğne uçlu cam kanül yardımıyla vajinaya girilerek kontrollü şekilde vajinal valf geçilerek sperma üreme kanalına bırakılır (Şekil 3.6). Vajinal valf geçilememişse sperma verme işlemi sırasında sperma oviduct kanalı tıkalı olduğundan dışarı taşacaktır. Tohumlama işlemi tamamlandıktan bir gün sonra ikinci

defa kraliçeye tekrar CO<sub>2</sub> ile anestezi uygulanması kraliçe arının daha erken yumurtlamaya başlamasına yardımcı olmaktadır (Genç ve Dodoloğlu, 2002).



Şekil 3.6. Bal arısı suni tohumlama

Suni tohumlama esnasında olası aksaklıkların önlenmesi ve başarı şansını artırmak için kraliçe arının vajinal valfinin geçilebilmesi amacıyla kraliçe arının duruş pozisyonu ve açısının uygun olması gerekmektedir. Ayrıca kraliçe arının karın bölümlerinin bir kaçının yerleştirildiği sabitleyici tüpün dışında kalması gerekmektedir. Vajinada uygun pozisyonun oluşabilmesi için kraliçe arının yakalanan iğnesinin biraz yüksekte olması avantaj sağlamaktadır. Uygun açıyla girildikten sonra vajinal valfin geçilebilmesi amacıyla kanül ucunun hafif ileri geri maniplasyonu gerekmektedir. Suni tohumlama yapılacak kraliçe arının 5-12 günlük yaşta olması suni tohumlamada başarı şansını artırmaktadır (Cobey, vd., 2013).

## 4. BAL ARISINDA SPERMA MUAYENESİ

Spermanın saklanmasıyla ilgili çalışmalarda spermatozoonlardaki saklama koşullarına bağlı olarak oluşabilecek değişimlerin belirlenebilmesi için sperma parametrelerinin mesî gereklidir (Paillard, vd., 2017). Bal arısı spermasının değerlendirilmesinde kullanılan bazı sperma parametreleri aşağıda belirtilmiştir.

### 4.1. Motilite Testi

Gontarz'a (2016) göre bir eppendof tüpü içinde 0.5 mL %0.9 NaCl ve sperma karıştırılır. Seyreltilen sperma lam üzerinde gözlemlenerek uygun değerlendirme yapılır. Değerlendirme yapılırken % 0, % 20, % 40, % 60, % 80 ve % 95 ve üzeri şekilde sonuçlar kaydedilir (Taylor, vd., 2009).

### 4.2. Spermatozoa Yoğunluğu

Spermatozoa yoğunluğunun değerlendirmesi amacıyla 1 µl sperma 1 ml Kiev sulandırıcısı ile sulandırılır. Sulandırılan sperma thoma lamına konularak mikroskop altında 400x büyütmede 5 orta kare sayılır. Bulunan değer aşağıdaki formülasyona göre hesaplanarak ifade edilir (Tekin, 1994; Cobey, 2013).

Yoğunluk = Sayılan Spermatozoa / Sayılan Büyük Kare (5) x Büyük Kare Hacmi (1/250) x Sulandırma oranı (1/1000)

### 4.3. Plazma Membran Bütünlüğü

10 µl sperma 37 °C'de 100 µl 100 mOsm'lük HOST (Hipo-Ozmotik Swelling Test) solüsyon içerisinde 30 dakika bırakıldıktan sonra 200 adet spermatozoa sayımı yapılır. Morfolojik olarak sarmal ve kıvrık kuyruklu spermatozoonlar tespit edilerek belirlenir (Alçay, vd., 2019).

### 4.4. Akrozom Bütünlüğü

10 µl sperma üzerine 100 ml phosphate buffer saline (PBS) ilave edilir. 100 RCF devirde 5 dakika süreyle santrifüj edildikten sonra sperma PBS ten ayrılır. İkinci kez üzerine 100 ml PBS ilave edilerek alınan kısım tamamlandıktan sonra tekrar santrifüj edilerek froti çekilir. PSA-FİTC solüsyonuyla karanlık odada boyanır ve 37 °C'de 1 saat karanlık ortamda bekletilir. Floresan mikroskopunda en az 200 spermatozoon değerlendirilerek yüzde olarak boyananlar belirlenir (Alçay, vd., 2019).

## 5. BAL ARISI SPERMASININ SAKLANMASI

Arılarda sperma kraliçe arının sperma thekasında uzun bir zaman zarar görmeden muhafaza edilebilmektedir. Spermatika, içerdiği protein, şeker ve antioksidanların yanı sıra oksijenli ortamı sayesinde sperma için uygun bir ortam oluşturmaktadır (Phiancharoen, vd., 2004). Bal arılarında spermanın saklanabilmesi için spermaya ilave edilen sulandırıcılarda pH, uygun ozmotik basınç ve gerekli besinin dengeli şekilde bulunması gerekmektedir. Bal arısı sperması 15 °C-28 °C sıcaklıkta belirli süre bekletilebilmekte ya da 11 °C-13 °C arasında ışıktan korunarak saklanabilmektedir. 12 °C'den 25 °C'ye kadar ilk 6 hafta fazla spermatozoon kaybı olmamıştır. (Collins, 2000a). Sperma için en uygun depolama sıcaklığının 12 °C ile 16 °C arasında olduğu bildirilmiştir. Sperma canlılığının 12 °C'de 39 haftada % 65 olduğu görülmüştür (Collins, 2000a; Collins, 2000b).

### 5.1. Bal Arısı Spermasının Kısa Süre Saklanması

Arı sperması 16 °C ile -196 °C arasında depolanabilmektedir. Taze arı sperması kapillar nitelikteki cam tüp içerisinde, tüpün iki tarafında küçük bir miktar sulandırıcı, ortada seyreltilmiş sperma bulunduğu haldetüpün iki ucu mühürlenerek saklanabilmektedir (Burley, vd., 2008). Bu şekildeki kapillar tüpler özel inkübatörlerde (16±1°C'de) ışıktan korunarak muhafaza edilebilmektedir (Paillard, vd., 2017).

Arı sperması oda sıcaklığında birkaç hafta kadar tutulduğunda sağlıklı saklama koşulları açısından oldukça başarılı olmuştur (Cobey, 2007). Bal arısı sperması için saklama sıcaklığı 10 °C altında ve 32 °C üstünde olduğunda spermanın fertilizasyon başarısı düşmeye başlamaktadır (Harbo ve Williams, 1987).

### 5.2. Bal Arısı Spermasının Uzun Süreli Saklanması

Kriyopreservasyonun başarılı fertilizasyon amacıyla kullanılan üreme tekniklerine destek olan ve avantaj sağlayan bir yöntem olduğu bilinmektedir. Kriyopreservasyon yöntemlerinin kullanılması genel olarak bazı olumsuz durumları da barındırmaktadır. Bu olumsuzlukların başlıcaları arasında DNA hasarı, hücre membran geçirgenliğinin bozulması, mitokondriyal hasar, canlılık ve motilitenin olumsuz etkilenmesi sayılabilmektedir. Uygun sulandırıcı ile seyreltilen sperma payetin iki tarafı hava olacak şekilde kapatılarak soğuk şokundan korunmak için payetin sıcaklığı su içerisinde 2 saatte 4 °C sıcaklığa kadar düşürülmektedir. Daha

sonra 4 °C sıcaklıktan dakikada 3 °C soğutma ile – 40 °C sıcaklığa soğutularak –196 °C sıvı azot içine aktarılmaktadır (Paillard, vd., 2017).

Bal arısında uzun süreli sperma depolanması, kriyopreservasyon yöntemleri kullanılarak uygulanabilmektedir. Bu amaçla sperma çeşitli kriyoprotektanlar [Dimetil sülfoksit (DMSO), glycerol v.b] kullanılarak sıvı azot içerisinde saklanabilmektedir (Harbo, 1979). Fakat bu şekilde uzun süre depolanan spermalarla döllen kraliçe arıların önemli miktarda erkek yumurtası yani döllenmemiş yumurta yumurtladığı tespit edilmiştir. Bu durumun sebebi olarak, spermanın dondurulması sırasında uğradığı genetik hasar olduğu düşünülmektedir (Harbo, 1981). Dolayısıyla uzun süre sperma depolamak için uygun depolama tekniklerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Cobey, 2007). Kriyoprotektan/Kriyopreservasyon yöntemlerinin başarısını etkileyen faktörler; kriyoprotektanların toksitesi, sıcaklık hassasiyeti, dondurma hızı oranı, soğuk şoku olarak bilinmektedir (Hopkins ve Herr, 2010). Sulandırıcılara katılan yumurta sarısı arı spermasında kraliçe arıya suni tohumlama uygulaması esnasında kullanılan kanülde tıkanıklıklara sebep olduğundan tercih edilmemektedir (Wegenner, vd., 2014).

Sperma dondurulmadan önce belli bir düşük sıcaklığa kadar soğutma işlemi uygulanmaktadır. Bu amaçla iki yöntem kullanılmaktadır. Birinci yöntemde oda sıcaklığından buzlu su banyosu içerisinde bulunan sperma sıcaklığı 2 saatte buzdolabında 4 °C ye soğutularak kademeli olarak buzlu su banyosunda 0 °C sıcaklığa soğutulmaktadır. İkinci yöntemde ise hızlı şekilde buz içerisinde oda sıcaklığından direkt 0 °C'ye soğutulmaktadır. Bu işlemin ardından hızlı bir şekilde -196 °C deki sıvı azot tankına 0,5 ml'lik cam tüplerde aktarılmaktadırlar (Hopkins ve Herr, 2010). Bir başka sperma kriyopreservasyon çalışmasında/teknikinde sperma 1/5 oranında sulandırılmakta ve spermanın sıcaklığı su banyosunda 1 saatte 5 °C'ye soğutulmaktadır. 2 saat 5 °C'de ekilibasyon işlemi için bekletilmektedir. 0,25'lik payetlere doldurulduktan sonra payetin sperma kısmına bir miktar hava ve sonrasında sulandırıcı konularak kenarları polivinyl alkol gibi bir madde ile veya preslenerek kapatılmaktadır. Daha sonra sıvı azot buharında 10 dakikada -110 °C soğutulduktan sonra -196 °C sıvı azot içerisine konularak saklanmaktadır. Bu şekilde en az bir ay depolanabilmektedir (Taylor, vd., 2009). Arı sperması nitelik bakımından memeli spermasına göre daha hassastır ve dondurma çözme esnasında zarar görebilmektedir. Uygun kriyopreservasyon işlemleri arasında en iyi sonucun DMSO kullanılarak elde edildiği görülmüştür (Alçay, vd., 2015).

## 6. KRİYOPROTEKTANLAR

Bal arılarında spermanın uzun süreli depolanarak kullanılması ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Fakat bu konuda memeli hayvanlardaki kadar başarı elde edilememiştir. Kullanılan kriyoprotektan ajanların spermada genetik hasara sebep olduğu düşünülmektedir (Wegener ve Bienefeld, 2012). Spermanın dondurulması ve çözülmesi sırasında spermatozoonlar soğuk şokundan etkilenmektedirler. Kraliçe arılarda dondurulup çözümlenen sperma ile yapılan tohumlamadan sonra yapılan spermatheka muayenesinde spermatozoon sayısının azaldığı ve fertilité yeteneğinin düştüğü gözlenmiştir (Harbo, 1979). DMSO ve yumurta sarısı içeren kriyoprotektanlar memelilerde başarıyla kullanılmaktadır. Ancak kriyoprotektanların kraliçe arının üreme kanalları ve arı spermatozoonu için zararlı etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Harbo, 1986; Wegener, vd., 2012). Bu durumdan dolayı arı sperması santrifüj edilerek kullanılabilir. Sperma dondurulup çözüldükten sonra kriyoprotektanları spermadan ayırmak amacıyla bu işlem yapılmaktadır (Wegener, vd., 2014). Dondurulup çözülmüş arı spermasında bulunan spermatozoonlar kırılğan ve hassastırlar. Bu nedenle dondurulup çözüldüklerinde santrifüj işleminden olumsuz etkilenebilmektedirler. Suni tohumlanan arıların yumurtalarında gelişen işçi arı yüzdesinin artması başarı olarak ifade edilmektedir (Wegener, vd., 2014). Kullanılan kriyoprotektanlar arasında en az hasara sebep olanın DMSO olduğu belirtilmektedir (Taylor, vd., 2009).

## 7. OKSİDATİF STRES

Reaktif oksijen türevlerinin (ROS) sebep olduğu birçok sorun bulunmaktadır. Aslında ROS'un üreme faaliyetleri için belirli oranda bulunması gerekmektedir. Spermatozoonların üretimi sırasında hücre bölünmesi, spermatozoonların taşınması, spermatozoonların fertilizasyon yeteneği kazanması için gerekli olan kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunun kazanılması, spermatozoonların ileri yönlü ve aktif hareket edenlerinin yüzde olarak sayısını ifade eden motilitenin artması gibi pek çok durumda görev almaktadır. ROS olması gerekenden fazla bulunduğu lipit peroksidasyonu sonucu spermatozoonlara zarar vermektedir. Lipid peroksidasyonunun DNA hasarı, hücre içi enzimlerin azalması, hücre solunumunun engellenmesi ve ağır motilite kayıplarına sebep olduğu bilinmektedir. ROS bileşiklerinin hücre hasarı oluşturabilmesi için, antioksidan kapasitesinin azalması, hücrelerin oksijen alabilmeleri için gerekli olan enzim faaliyetlerinin aksamasına sebep olan durumlar, hücredeki metabolik aktivitelerin artmasına sebep olan durumlar, hücrede yangısal durumların görülmesi, hücre duvarında iyon geçişinin aksaması, radyasyon gibi olumsuzlukların bulunması gerekmektedir (Petruska, vd., 2014).

Serbest radikaller, iyonize oksijen ve peroksitler oksidatif strese neden olabilmektedirler. ROS spermatozoon hücre yapısını bozarak motilite düşüklüğü, spermatozoanın oosit penetrasyon yeteneğinde olumsuzluklara neden olması dışında spermada özellikle DNA kökenli kalıtsal bir takım farklılıklara da sebep olmaktadır. ROS ve total antioksidan miktarı arasında pozitif korelasyon bulunmaktadır. Denge bozulduğunda özellikle lipit yapılı spermatozoa membran bozuklukları ve DNA hasarı oluşmaktadır (Tremellen, 2008).

Griveau (1995), insan spermatozoasının zararlı oksijen türlerine maruz kalmasının sonucu olarak çoklu doymamış yağ asitlerinin hücre membranının yapısının bozulması ve hücre membranında lipit peroksidasyonuna bağlı unsurların artmasının olumsuz etkisi olarak akrozom reaksiyonu, spermatozoa kapasitasyonu ve motilite işlevlerinin bozulmasının görüldüğünü belirtmiştir. İnsanlarda lipit peroksidasyonuna karşı koruyucu olan spermada antioksidan reaksiyonuna sebep olan Glutatyon peroksidaz, Süperoksit dismutaz, Glikoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) enzimlerinin önemi vurgulanmıştır. GSH yani aktif glutatyon, Okside olmuş glutatyonun (GSSG; Glutatyon disülfid) geri dönüşümü için gerekmektedir. Ayrıca bu süreç NADPH (Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat) yardımıyla glutatyon

reduktaz tarafından gerçekleştirilmektedir. Dolayısıyla çalışmada glutatyon reduktazın yeterli olmasına karşın GSSG'nin ortamda fazla olması spermatozoonda NADPH eksikliğiyle ilişkilendirilmiştir. Oksidatif fosforilasyon pentoz fosfat yolu için gerekli olan NADPH, G6PDH enzimi yardımıyla üretildiği vurgulanmıştır. Çalışmada G6PDH'ın azalması ya da kaybının NADPH eksikliğine sebep olmasının pentoz fosfat yolunun işlevini olumsuz etkileyeceği ve antioksidan koruma kalkanının aksaması sonucu lipid yapıdaki spermatozoon mebranında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (hidrojen peroksit) gibi zararlı unsurların etkilerinin görülmesine bağlı olarak spermatozoonun işlev kaybına uğrayabileceği ifade edilmiştir.



## 8. ANTIOKSİDANLAR

Spermada ROS'un zararlı etkilerinin en aza indirilmesi amacıyla bulunan enzimatik antioksidanlar başlıca süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve katalazdır. Enzimatik olmayan önemli antioksidanlar ise ürat, vitamin C, vitamin E, taurin, hipotaurin ve karatenoidlerdir (Petruska, vd., 2014). Spermatozoa membranında bulunan çeşitli enzimler ve metabolik sistemlerin ROS zararlarına karşı koruma sağladığı bildirilmiştir. Bal arılarında oksidatif strese karşı direnç gösteren ve yok eden enzimler bulunur. Ahmad, (1991)'de yaptığı bir çalışmada enzimatik antioksidanlardan süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon transferaz, glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidazın insektlerdeki miktarıyla ilgili değerlendirmede bulunmuştur. Çalışmada insektlerde özellikle üreme organları, kaslar, sindirim ve boşaltım aktivitelerindeki değişime paralel olarak antioksidan kapasitesinde değişim olduğunu gözlemlemişlerdir. Weirich'e (2002) göre kraliçe bal arısının spermatheka'sının yapısı sayesinde spermatozoonlar uzun süre hayatta kalabilmektedir. Spermatheka'da bunu sağlayabilmek amacıyla özel bir ortam bulunmakta olup spermathekada depolanan spermatozoonların metabolizması yavaşlamaktadır. Weirich, vd., (2002) yaptıkları çalışmada bal arılarında kraliçe arının spermatheka'sında süperoksit dismutaz, glutatyon transferaz ve katalaz enzimlerinin aktivasyonunu belirlemiştir. Bu enzimlerin spermathekanın yanı sıra kaslarda, bağırsaklarda ve hemolenfde bulunduğu tespit edilmiştir. Spermmanın oda sıcaklığında uzun süre canlı kalabilmesinde özellikle belirtilen üç antioksidanın önemli rolünün olduğunu vurgulamışlardır.

Dadkhah, vd., (2016), yaptıkları çalışmada hassas olan bal arısı spermasının saklanabilmesiyle ilgili sahada kullanılan yumurta sarısı ve soya lesitininin sperma sulandırıcısına katılmasını değerlendirmişlerdir. Bileşiminde % 10 DMSO ve % 11 gliserol bulunan tampon sulandırıcıya ayrı ayrı % 0,5 soya lesitin, % 2 soya lesitin ve % 20 yumurta sarısı ilave etmişlerdir. Çalışmada spermadan bir kısım, sulandırıcıdan on iki kısım katılarak payetlere bal arısı için payetleme prosedürüne uygun olacak şekilde (boşluk-sulandırıcı-boşluk-sperma-boşluk-sulandırıcı-boşluk) çekildikten sonra sıcaklık kademeli olarak 5 °C'ye düşürülerek, payetler sıvı nitrojende dondurularak saklanmışlardır. Taze sperma, soğutulmuş sperma ve dondurulmuş sperma örnekleri motilite ve canlılık yönünden değerlendirilmiştir. Taze sperma verileri incelendiğinde yumurta sarısı katılan sulandırıcı başarılı bulunmuştur. %2

oranında katılan soya lesitin sulandırıcısı motilitesi ( $4,5 \pm 0,2$ ), %0,5 oranında katılan soya lesitin motilitesi ( $4,12 \pm 0,12$ ) verilerine göre yüksek bulunmuştur. Ayrıca soğutulmuş spermada % 2 oranında katılan soya lesitin ( $4,62 \pm 0,12$ ) yumurta sarısı değerine ( $4,5 \pm 0,2$ ) yakın olmakla birlikte %0,5 oranında soya lesitin içeren sulandırıcıdan ( $3,87 \pm 0,24$ ) başarılı bulunmuştur. Dondurma ve çözürme sonrası da yumurta sarısı sulandırıcısı motilite ( $3,6 \pm 0,24$ ) diğer gruplarla karşılaştırıldığında motilitedeki artışın önemi vurgulanmıştır. Çalışmada motilite değerleri yüzde 0, 20, 40, 60, 80 ve 90 üstü olarak değerlendirilmiş ancak 0 ile 5 arasında ifade edilmiştir (Taylor, vd., 2009).

Spermatozoon canlılık yüzdesi bakımından incelendiğinde, yumurta sarısı sulandırıcısı canlılık oranı ( $\% 69,75 \pm 2,32$ ), soya lesitin % 2 ( $\% 45 \pm 2,32$ ) ve soya lesitin % 0,5 ( $\% 38,5 \pm 2,32$ ) canlılık oranı kıyaslandığında yumurta sarısı sulandırıcısının avantajlı olduğu kanısına varılmıştır. Her iki soya lesitin sulandırıcısı kıyaslandığında önemli fark olmadığı görülmüştür. Sonuç olarak % 20'lik yumurta sarısı ilavesi bal arısı spermasının saklanması için soya lesitin sulandırıcısına göre motilite ve canlılık yönünden uygun olduğu vurgulanmıştır.

King, vd. (2011), bal arısı spermasının bir bölümü olan seminal sıvıların spermayı uzun süre canlı tutmak için gerekli pek çok bileşene sahip olduğunu vurgulamış ve seminal sıvıların içerisindeki proteinlerin önemine değinmiştir. Çalışmada protein içeren seminal sıvının yanı sıra  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  de üç dakika ısıtılarak proteinleri yapısal özelliklerinden arındırılmış seminal sıvının etkileri araştırılmıştır. Farklı miktarlarda hayem solüsyonuyla sulandırılarak yapılan ölçümlerde seminal sıvının sperma canlılığı üzerine olumlu etki ortaya koyduğu gözlenmiştir. Sulandırma oranları 10, 20, 100 ve 500 kat olacak şekilde yapılmıştır. Çalışma canlılık oranları incelendiğinde 10, 20 ve 100 kat sulandırılan spermada protein içeren seminal sıvının etkisi % 90 üzeri olarak görülmekle birlikte sulandırma oranı arttıkça etkinin azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca protein içeren seminal sıvının içermeyene göre etkinliğinin yüksek olduğu da görülmüştür. Protein olmayan seminal sıvıda da protein olmamasına rağmen az da olsa olumlu etki görülmüştür. Sulandırıcıda fruktoz bulunması ya da bulunmamasının sperma canlılığı üzerine fazla etkisi olmamış ancak bekleme süresine bağlı olarak önem kazandığı vurgulanmıştır.

Rousseau ve Giovenezzo (2016) çalışmalarında arıların kış mevsiminden sonra ilave besinlerle beslenmelerinin fertilité üzerine etkilerini araştırmışlardır. Bu amaçla çalışma her bir grupta 5'er koloni olacak şekilde 4 grup kullanılarak sırasıyla kontrol

grubu, 1/1 şurupla beslenen grup, polen ilavesi şeklinde proteinle beslenen grup ve her iki besinle de beslenen grup olacak şekilde planlanmıştır. Erkek arılar özenle takip edilerek 3 haftalık yaşta toplanmışlardır. Toplanan erkek arılar her grup için uçmalarına ve dışkılamalarına elverişli olacak şekilde uygun ortamlara alınmışlardır. Çalışma sonucuna göre diğer gruplar kontrol grubuna göre abdomen genişliğinde avantaj sağlamışlardır. Thorax genişliği bakımından, kontrol grubunu polen ve şurup birleşimi ile beslenen grup takip etmiştir. Vücut ağırlıkları açısından önemli bir fark görülmemiştir. Sperma volümü incelendiğinde kontrol grubundan yüksek olmakla birlikte deneme grupları arasında belirgin fark gözlenmemiştir. Sperma yoğunluğunda kayda değer fark görülmezken ( $2,77 \times 10^9$ ), sperma canlılık yüzdesi kontrol grubunda yaklaşık % 81 ve polen ve şurup karışımı beslemede % 83'e yakın olup, artmakla beraber istatistiksel önemde bir gelişme saptanmamıştır.

Wegener ve Bienefeld (2012), bal arılarında sperma sulandırıcısına katılan kriyoprotektanların bal arısı sperması üzerine istenmeyen olumsuzlukları üzerine araştırma yapmışlardır. Çalışmada en fazla olumlu etki görülen DMSO ve etilen glikolün karşılaştırılmasının yanı sıra 1,3-probendiol, 2,3-butanediol ve dimetil formamide kriyoprotektan ajanları da incelenmiştir. İlave olarak DMSO ve etilen glikol, spermathekadaki sperma sayısı ve fertilizasyon yeteneği yönünden karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak döllen kraliçe arılarda spermathekada yeteri kadar spermatozoon görülmemiştir. Ancak % 5'lik probendiol katılan grupta spermathekadaki sperma sayısı  $3 \times 10^6$  civarında olup kontrol grubuna oldukça benzer değerde olduğu görülmüştür. Spermathekadaki sperma sayısı 1 ila 2 milyon arasında olup % 10 DMSO için % 5'lik DMSO ve etilen glikol karışımından bir miktar daha düşük olduğu görülmüştür. Fakat önemsiz bulunmuştur. Spermatika yumurta sayısının % 20 DMSO, % 5 ve % 20 etilen glikol kullanılan grupta  $7 \times 10^5$  in altında olduğu dikkat çekmiştir. Tüm kriyoprotektanların genel olarak spermatikada spermatozoon sayısında azalmaya sebep olduğu görülmüştür. Ayrıca DMSO içeren sperma ile dölenen kraliçe arılarda yumurta miktarına karşın larva oranları düşük çıkmıştır. Bütün kriyoprotektan ajanların arı sperması için olumsuz etkisinin olduğu vurgulanmıştır.

Rajamohan, vd. (2020), bal arılarında spermayı uyarıcı etkisi olmayan bir sperma sulandırıcısının doğal olarak akrozom reaksiyonu, aşırı sperma hareketliliği ve sperma dölleme yeteneği kazanmasının oluşmasına engel olduğunu bildirmişlerdir. Bu amaçla yaptıkları çalışmada aktivasyon yeteneği bulunmayan tris sulandırıcısı kullanılmıştır. Çalışma 15 °C dolaylarında sıcaklıkta 1 gün ve 2 aylık zaman aralığında

değerlendirilmiştir. Çalışmada kullanılan sulandırıcılardan başlangıç sulandırıcısı olarak 50 mM Tris sulandırıcısı, 3 katı oranında potasyum klorit ve 151 mM sodyum klorit katılarak hazırlanmıştır. Bu sulandırıcı dışındaki 6 sulandırıcı ise hazırlanan sulandırıcıya çeşitli şeker ve antibiyotik ilavesiyle hazırlanmıştır. Sulandırıcılar hipertonic özelliktedir. Ayrıca Tris içeren aktive edici sulandırıcı standart olarak hazırlanmıştır. Çalışmada uyarıcı etkisi bulunan sperma uyarıcı yeteneği bulunmayan sulandırıcıyla karşılaştırıldığında uyarıcı etkisi olmayan sulandırıcının canlılık oranı (% 67,6 ±10,9) olumlu bulunmuştur. Uyarıcı etkisi olan sulandırıcı ile sulandırılan spermanın 1 gün sonra ciddi oranda canlılığında düşüş olduğu görülmüştür. Bu duruma karşın özellikle aktive olmayan sulandırıcılardan başlangıç sulandırıcısına katılan Egta, Edta, fruktoz, thelaroz ve gentamisin bulunan sulandırıcı 60 gün sonra dahi yüksek canlılık oranı (% 22 ±7,8) göstermiştir. Aktive sulandırıcı ise sadece bir günde 14 °C sıcaklıkta (% 21,3 ±10,7) canlılık oranı göstermesinin önemi vurgulanmıştır. Ayrıca her iki sulandırıcının suni tohumlamadaki etkilerini incelemek amacıyla kraliçe arıda suni tohumlama yapılarak 1 ile 2 ay içerisinde gelişen larvaların işçi arı yüzdesine bakılmıştır. Bu doğrultuda 7 tane kontrol grubu, 20 tane uyarıcı etkili sulandırıcı ve 16 adet kraliçe arıya çalışma grubu için suni tohumlama yapılmıştır. Sonuçlar ve işçi arı yüzdeleri arasında önemli bir fark görülmemiştir.

Abdelkader, vd. (2019), yaptıkları çalışmada pestisitlerin erkek arılarda cinsel gelişim ve aktiviteleri üzerine olumsuz etkilerini belirlemek amacıyla spermada bulunan çeşitli antioksidan seviyelerini incelemiştir. Bu amaçla % 50'lik şeker çözeltisi içerisine 1/1000 oranında DMSO ilave etmişlerdir. Hazırlanan şurup özel olarak hazırlanmış kraliçe arısı alınmış küçük kolonilere 20 gün süreyle verilmiştir. Çalışmada spermada bulunan antioksidan miktarında önemli derecede artış dikkat çekmiştir. Ayrıca erkek arı spermasında bulunan protein miktarında düşüş olduğu gözlenmiştir. Çalışmada pestisite maruz kalma durumunda spermada antioksidan seviyesinde artışın ve doğal olarak oksidatif stres unsurlarına karşı temel mekanizmanın önemi vurgulanmıştır. Bal arılarında antioksidan savunmada başlıca enzimlerin süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz olduğu ve pestisite maruz kalan erkek arılarda antioksidan aktivitedeki yükselmesine dikkat çekilmiştir.

Paillard, vd. (2017), bal arısı spermasının 16 °C ile -196 °C'de saklanabilirliğini karşılaştırdıkları çalışmada ayrıca dondurma ve çözündürme sonrası spermanın durumu ve DMSO'in kraliçe arıdaki toksik etkisini giderebilmek adına yapılan, suni tohumlamadan önce spermanın santrifüjasyonla ayrıştırılmasının etkilerini

değerlendirmişlerdir. Bu amaçla 16 °C ve -196 °C Hopkinsin geliştirilmiş sulandırıcısını eşit oranda sulandırıcı ve sperma katarak denemişlerdir. İlave olarak Hopkins modifiye sulandırıcısı sulandırıcının 5 katı oranda sulandırılmış ve Harbo geliştirilmiş sulandırıcı 3 kat sperma 2 kat sulandırıcı hesaplanarak 2 kademeli olarak sulandırılmıştır (Hopkins, vd., 2012). Çalışmada 3,6 ve 11 aylık zaman diliminde değerlendirme yapılmıştır. Canlılık değerlendirilmesi amacıyla modifiye Kiev solüsyonuyla 500 kat sulandırılan 1 µl sperma, 50 kat olacak şekilde 10 µl propoideum iodide ve 500 µl sperma modifiye Kiev solüsyonu hesabıyla boyanarak 40 büyütmede en az 200 spermatozoa sayılmak suretiyle değerlendirilmiştir. Değerlendirilen spermanın canlılık oranı çalışmadan önce 0. gün değeri % 87-91 aralığında tespit edilmiştir. 16 °C'de 11 ay sürede canlı sperma kalmamıştır. 3 ay ve 6 ay, 16 °C ısıda saklanan ve dondurulan sperma arasındaki fark dondurularak saklanan lehine olmasına rağmen önemsiz bulunmuştur. Ancak 11 ay saklanan sperma spermada dondurularak saklanan sperma (%76±5) önemli derecede başarılı görülürken 16°C ısıda saklanan spermada spermatozoonların tamamı canlılığını yitirmiştir. Dondurularak saklanan spermada santrifüj edilen ve edilmeyen arasında belirgin bir fark gözlenmemiştir. Canlılık oranının % 70-80 arası olmasının önemi vurgulanmıştır. Spermada dondurulmadan saklanan payetlerde canlılık tespit edilmediğinden çalışma uzun süreli dondurularak saklanan payetlerde bakılmıştır. Santrifügasyon işlemi yapılarak ya da yapılmayarak uygulanan suni tohumlama işlemi sonrası kraliçe arıların spermathekalarındaki spermatozoon sayılarının yüzdesel olarak yakın değerlerde olduğu değerlendirilmiştir. Bu amaçla 1 ml modifiye edilmiş Kiev solüsyonu 1 µl sperma ile karıştırılmıştır. Hemasitometrede 4 orta kare sayıldıktan sonra bulunan değer sulandırma oranı ile çarpılıp bulunan değer 10 katı alınarak hesaplanmıştır. Spermatikada canlılık oranı % 10 ile % 70 arasında olup spermatikada bulunan spermatozoon sayısının  $5 \times 10^3 - 15 \times 10^4$  arasında değerlerde olduğu görülmüştür. Sonuç olarak bal arısı spermasının uzun süreli saklanmasında dondurularak saklamanın önemi vurgulanmıştır. Ayrıca dondurma çözündürme sonrası ve suni tohumlama uygulanan kraliçe arılarda suni tohumlama öncesi santrifügasyon işleminin sperma canlılığını önemli ölçüde etkilemediği bildirilmiştir.

Almeda ve Espencer (2002), bal arılarında spermanın saklanma koşullarını iyileştirmek ve geliştirmek için doku kültürü ve hindistan cevizi suyunun sperma sulandırıcısına katılması çalışmasını yapmışlardır. Çalışmada ilk 3 medyum hindistan cevizi suyu içermektedir. Diğer medyumlar hazır ticari medyumlardan oluşmaktadır.

Kullanılan doku kültür medyumları hazır ticari medyumlardır. Çalışmada toplamda 2 aylık süre için 9 farklı zamanda motilite ölçümü yapılmıştır. Motilite değerleri 0 ila 4 arası yüzdesel karşılıklarına göre değerlendirilmiştir. 0 (motilite yok), 1 (0-% 10 ), 2 (% 11-50), 3 (% 51-75 ) ve 4 (% 76-100) arası değerlere karşılık gelmiştir. Motilite farklı günlerde bakılmış ve 1 aylık sürede ilk medyum 1 ve 15 günde motilite '4', 30. gün motilite '1' şeklinde değerlendirilmiştir. 2. medyum ilk gün motilite '4', 15. gün '3', ve sonrası '1' iken, 3 medyum ilk gün motilite '4', 15. gün '2' ve 30. gün '1' değerlerinde olduğu görülmüştür. Diğer ticari medyumlar 4. ve 5. medyum 2 °C- 5 °C sıcaklıkta ilk gün '3' sonrası '1' ve 6. medyum -70 °C sıcaklıkta motilite yönünden gözlemlenmiş ve ilk gün motilite '1' olduğu vurgulanmıştır. Suni tohumlama yapılan kraliçe arılarda iki hafta kadar saklanan hindistan cevizi suyu bulunan sulandırıcı için işçi arı yüzdesi olması gerektiği gibi sorunsuz olduğu gözlenmiştir. 1 ay saklanan sperma ile döllenmiş kraliçe arılarda sperma canlılığının oldukça düşük değerlerde olduğu gözlenmiştir. Kullanılan medyumlardan ilk 3 farklı doku kültür sulandırıcısı ve hindistan cevizi suyu içermektedir. 8-10 °C de ilk medyum 80 gün diğer medyumlar (2. ve 3. medyum) için 1 aylık sürede yüzde 1 ila 10 arası canlılık gözlenmiştir. Çalışmada kullanılan 4, 5, 6. medyumlar için 4 ve 5, 3-5 °C'de 6. medyum -70°C de 5 gün için değerlendirilmiştir. Sonuç olarak 4,5,6 numaralı ticari medyumlar için kayda değer sonuç oluşmamasına rağmen hindistan cevizi suyunun önemini vurgulamak adına umut verici olmuştur. Kısa süreli saklama için hindistan cevizi suyu içeren sulandırıcıların kullanılabileceği görüşü oluşmuştur.

Liu, vd. (2020), kraliçe arının sperma depolama organında bulunan spermatozoonların uzun süre zarar görmeden nasıl saklanabildiğiyle ilgili depo organında bulunan metabolizmaya katkıda bulunan maddelerin katkısını araştırmışlardır. Bu amaçla çiftleşmemiş kraliçe arı ile döllenmiş kraliçe arı sperma depo organları içerisindeki fiziksel ve kimyasal değişiklikleri incelemişlerdir. Spermatikaların ekstraktlarının uygun şekilde hazırlanmasının ardından Mass Spectrum analiz ve LC-MS data filtering analizleri uygulanmıştır. Spermanın depo organında depolanmasında birçok yağ ve yağ asitleri, yağ esterleri, aminoasitler ve metabolizma düzenleyici maddelerin etkili olduğunu belirtmişlerdir. Özellikle yağlar, yağ benzeri maddeler, gilserofosfolipit (GLP), prenol yağlar, sterol yağların yanı sıra bu maddelerin aktif olarak kullanılması için gerekli olan GLP metabolizması, çeşitli uyarım mekanizmaları, trikarboksilik döngü (TCA), sfingolipid metabolizması gibi etkin metabolizma mekanizmalarının görev aldığı bildirilmişlerdir. Yapılan çalışmada

çiftleşen olgun kraliçe arıda spermatikada birçok yapısal, fiziksel ve kimyasal ve mekanizmanın etkin olduğu görülmüştür.

Yániz, vd. (2019), bal arısı spermasının motilite değerlerini, bekletme süresi, çalışma süresi, sulandırıcıların etkilerini Laja 10, Laja 20 ve Ísas 10, Makler özel numune lamları ve lam kullanılarak yapılan analiz sonuçlarını değerlendirmişlerdir. Kullanılan Kiev solüsyonunun dışında potasyum içeren, trehaloz içeren ve BSA içeren 3 farklı solüsyon daha bulunmaktadır. Sulandırıcıların çalışma lamları üzerine etkisi incelendiğinde Kiev sulandırıcısı, potasyum ilaveli Kiev ve Trehaloz bulunan Kiev sulandırıcıların da L10 diğer çalışma lamlarına göre daha başarılı bulunmuştur. Ayrıca potasyum içeren Kiev solüsyonunun ozmotik strese sebep olduğu ve anormal spermatozoa oranının arttığı belirtilmiştir. Çalışmada Laja lam kullanıldığında motilitede düzensiz harekette artış görülmüştür. Ancak bal arısı spermasının kendine özgü dairesel motilite hareketinde düşüş dikkat çekmiştir. Makler ve normal lam kullanıldığında sulandırıcıya katılan BSA'nın lam yüzeyinde tutunma kabiliyetini düşürdüğü gözlenmiştir. Aynı şekilde BSA bulunan Kiev'de belirgin değişiklik olmamıştır. Ancak spermatozoonların kıvrım hareket davranışlarındaki artış kayda değer bulunmuştur. Canlılık yüzdelere bakıldığında normal lamen diğer çalışma lamlarına göre değerlerinin % 14-18 arası daha düşük değerde olduğu belirtilmiştir. Çalışmada beklenme süreleri olarak yarım saatlik süre için belirgin farklılık tespit edilmemiştir.

Weirich, vd. (2002), bal arılarında oksidatif strese karşı önemli savunma enzimleri olan süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon S transferaz enzimlerinin kan ve çeşitli doku ve bölümlerindeki oranlarının karşılaştırıldığı çalışmada bal arısı spermasının yanı sıra spermatozoonda da katalaz etkileşim oranı güçlü çıkmıştır. Bal arısı hemolenfi ve inceleme kapsamındaki kraliçe arı spermatheka'sı, kaslar ve bazı civar bölmelerde katalaz ve glutatyon S transferaz enzim aktivitelerinin etkin olduğu görülmüştür. Dişi karakterli olan işçi arıların glutatyon S transferaz aktivitesi doku bölmelerinde çok yüksek değerlerde olduğu görülürken olgun kraliçe arılarda ise katalaz aktivitesinin önemli oranda yüksek bulunduğu değerlendirilmiştir. Böceklerin kan sıvısı anlamına gelen hemolenfte ise katalaz oranı göreceli olarak işçi arılarda çiftleşmiş ya da çiftleşmemiş kraliçelerden yüksek çıkmasına rağmen seviye olarak kayda değer bulunmamıştır. Katalaz bakılan kısımlardaki kas hareketlerinin fazla olmaması da gözlemlenmiştir. Ayrıca kraliçe arılardaki sperma depolama organı olan spermatheka'daki glutatyon S transferaz enziminin yanı sıra katalaz enzim seviyesinin

çiftleşmemiş kraliçe arılara göre çiftleşmiş kraliçe arılarda daha yüksek oranlarda olduğunun görülmesi dikkat çekici bulunmuştur. Glutasyon S transferaz enzim aktivitesinin özellikle hemolenfteki seviyesinin sınırlı olduğu ve üreme açısından bakıldığında belirleyici oranlarda olmadığı görülmüştür. Süperoksit dismutaz aktivitesi hemolenf, kısmi bölümler ve spermathekada ayırt edilecek bir farklılık göstermemesine rağmen spermathekadaki spermada bulunan seviyesinin hücresel düzeyde görülmemesi ağırlıklı olarak seminal plazmada bulunması kayda değer bulunmuştur.

Taylor, vd., (2009) farklı sulandırma oranlarında seyreltilen spermada öngörülen sulandırma oranları ve farklı kriyoprotektan ajanlar kullanılarak dondurma, çözündürme sonrası sperma kalite kriterleri üzerine yaptıkları çalışmada, sulandırma oranı için 4 µl standart sperma için 12, 24, 36, 48 µl sulandırıcı kullanılmıştır. Sulandırılan sperma 0,25 ml'lik payetlere çekildikten sonra 90 dk kadar oda sıcaklığında bekletilmiş bu sürede gerekli analizler dondurulmadan önce yapılmıştır. Dondurma yöntemi olarak uygun ölçülerde sulandırılan sperma sulandırma oranına göre % 10 kriyoprotektan ajan ilave edildikten sonra 0,25'lik payetlere sulandırıcı-hava-sperma-hava-sulandırıcı olacak şekilde çekilerek özel sistemler yardımıyla ısıyı kontrollü olarak oda sıcaklığından 2 dk içerisinde - 80 °C'ye düşürülmesinin ardından -196 °C'de sıvı azot içerisinde dondurulmuştur. Çalışmada piyasada sık olarak kullanım gören kriyoprotektanlara yer verilmiştir. Kontrol gurubu olarak modifiye Kiev solüsyonu (sodyum sitrat, sodyum bikarbonat, potasyum klorür, sülfanilamid, glikoz) kullanılmıştır. Çalışmada sulandırıcı 4 ve sulandırıcı 2 başarılı bulunmuştur. Sulandırıcı 4 Kiev solüsyonuna ilave olarak katalaz içermekte olup antibiyotik olarak amoksisilin kullanılmıştır, ancak glikoz bulunmamaktadır. Sulandırıcı 2'de ise antibiyotik olarak amoksisilin kullanılmıştır. Ayrıca arjinin ve lizin aminoasitleri yer almaktadır. Motilite değerlendirmesi memeli hayvanlardan farklı olarak sirküler hareketleri canlılık gibi düşünülerek tanımlanmıştır. Değerler 0, 20, 40, 80 ve 95 üstü olarak tanımlanmış ancak 0 ile 5 arası değerlendirme ile ifade edilmiştir. 10 µL sulandırılmış sperma 40 büyütme ışık mikroskopunda incelenmiştir. Diğer sulandırıcılara göre başarılı bulunan sulandırıcı 2 ve 4 motilite değerleri 3'ün üzerinde olup yakın değerlerde olduğu görülmüştür. Bikarbonat ve potasyum iyonlarının bal arısı sperması motilitesi üzerine olumlu etki gösterdiği vurgulanmıştır. Ayrıca bikarbonat içermeyen sulandırıcının başarılı bulunmasının pH değerinin kraliçe arı spermatikası pH'sı olan 9,7 değerine yakın olması (9,6) sebebiyle olduğu

düşünülmüştür. Ancak pH değeri yüksek olan sperma sulandırıcısının (10,7) motilite oranını olumsuz etkilediği tespit edilmiştir. Çalışmada sulandırıcıya katılan aminoasitin motilite üzerine olumlu etkisi olduğunun önemi vurgulanmıştır. Sulandırıcı 4 glikoz içermemesi şekerlerin bal arısı sperması için motilite açısından çok önemli bulunmadığını göstermiştir. Katalaz enzimi oksidatif strese karşı etkili olduğu bilinmektedir (Aitken, vd., 2006). Çalışmada katalaz enzimi katılan sulandırıcıların kontrol grubuna göre başarılı olduğu görülmüştür. Kriyoprotektanlar arasında farklı çalışmalarda da belirtildiği üzere DMSO daha başarılı bulunmuştur. DMSO katılan aynı sulandırıcılarda canlılık oranı (%45,47±1,69) DMA ve gliserole oranla yaklaşık 3 kat yüksek değerlerde olduğu görülmüştür. DMA ve gliserol arasında belirgin bir fark görülemediği. Çalışmada sperma sulandırıcısına katılan oran üç kriyoprotektan için de aynı oranda, DMSO için yapılmış çalışmalarda kullanılan %10 olarak belirlenmiştir. Sulandırma oranları incelendiği zaman dondurma işlemi uygulanan sulandırıcılar arasında başarılı bulunan sulandırıcının oranları tüm sulandırma oranlarına göre karşılaştırıldığında 3 kat sulandırma 1 kata göre başarılı bulunurken 3 kata göre 9 kat sulandırmada sperma canlılık oranlarında artış olduğu görülmüştür. 3 kat sulandırmayla 6 kat arasında sperma canlılık oranı dikkate alındığında belirgin fark görülemediği. 9 kat sulandırma değerleri daha olumlu olduğu görülmüştür. Dolayısıyla belirli sulandırma oranları dikkate alındığında sulandırma oranının canlılığı desteklediği öngörülmüştür. Çalışmada genel olarak sulandırıcı 4 başarılı bulunmuştur. Sodyum, potasyum, bikarbonat ve katalaz enziminin özellikle canlılık ve motilite üzerine olumlu etkisi önemli görülmüştür. Çalışmada motilite ve canlılık yönünden başarısız olduğu değerlendirilen sulandırıcı 1'in osmotik basıncının (730) mOsmol/mL nin üzerinde olduğu bal arısı sperması osmotik basıncının (467±13) mOsmol/mL değerinin oldukça üstünde olmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Wegenner, vd. (2012), bal arılarında spermanın dondurularak saklanması ve sonrasında kraliçe arının tohumlaması ile ilgili başarının belirlenebilmesi amacıyla kriyoprezervasyon işleminin etkilerinin değerlendirilmesiyle ilgili yaptıkları çalışmada ortalama 2 ila 3 haftalık yaşta erkek arılardan sperma almışlardır. Sperma dondurma protokolü özel soğutucu yardımıyla spermanın sıcaklığı -35 °C'ye düşürüldükten sonra ekilibasyon işlemi olmaksızın -196 °C'de sıvı azot içerisine almak şeklinde uygulanmıştır. Çalışmada dondurulan bal arısı spermasının 11 aya kadar saklanabileceğine vurgu yapılmıştır. Kriyoprezervasyon işlemi uygulanarak saklanan

bal arısı spermasının çözdürülmesi için 35 °C'de 60 saniye bekletmek yeterli görülmüştür. Motilite yönünden incelemek amacıyla öncelikle 30 dakika kadar 30 kat Kiev sulandırıcısıyla sulandırılarak 35 °C'de bekletilmiş sonrasında bir damla kadar alınarak ısıtma tablalı mikroskopta bal arısı spermatozoasına özgü hareket gözlenmiştir. Çalışmada en az 200 spermatozoon sayılmış bu amaçla faz kontrast mikroskobundan yararlanılmıştır. Ozmotik stres değerlendirilmesi amacıyla hazırlanan özel solüsyondan yararlanılmıştır. 55 mM KCl, 82.6 mM Na<sub>3</sub>-citrate, 20 mM HEPES, 30 mM trehalose, 25 mM NaHCO<sub>3</sub> içeren solüsyon içerisine 0.86 M tuz ilave edilerek hazırlanan solüsyona eşit oranda 5'er µl katılan sperma 35 °C'de 5 dakika bekletilip 140 µl tuz ilavesiz solüsyonda sulandırılarak özel floresan boya ile boyandıktan sonra incelenmiştir. Çalışmada çözdürme sonrası motilite parametrelerinin taze sperma ile karşılaştırıldığında ortalama olarak taze sperma % 93,3-99,9 arasında bir değere sahipken kriyoprezervasyon uygulanarak dondurulan spermada çözme sonucu tespit edilen değerlerin % 8-9,6 arası değerlerde olduğunun önemine vurgu yapılmıştır. Çalışmada ayrıca ozmotik stres değerlemesinde taze spermada ozmotik stres negatif hücre değerinin % 53,3-73,3 arasında olduğu tespit edilirken kriyoprezervasyon işlemi uygulanan dondurulmuş spermada % 27,9-32,1 değerlerinde olduğu görülmüş ve önemsiz olduğu sonucuna varılmıştır.

Alçay, vd. (2019), bal arısı spermasının dondurulmasıyla ilgili yaptıkları çalışmada BSA eklenmiş TL-hepes içeren sulandırıcıdan ml'ye 1, 3 ve 5 mg oranında katarak hazırlanan sulandırıcının bal arısı sperması üzerine etkilerini değerlendirmişlerdir. Bal arısı spermasında osmotik stres'in belirlenmesi amacıyla HOST'dan faydalanmışlardır. Bu amaçla bal arısı için uygun olduğu düşünülen 100 mOsm HOST solüsyonun 0,1 ml'sine 10 µl sperma katılarak 37 °C yarım saat tespit edilerek spermatozoonun son veya esas kısmında kıvrılma görülenler değerlendirmeye alınmıştır. HOST değerlendirmesinde kontrol gurubu (59,20±3,58) ile ml'ye 1 mg katılan sulandırıcı (61,53±4,15) değerlerinin birbirine yakın değerlerde olduğu görülmüştür. Buna karşılık ml'ye 3 mg eklenen grup (66,06±3,15) ve 5 mg katılan grup (67,73±4,07) HOST değerlerinin birbirine yakın değerlerde olduğu görülmüştür. Çalışmada spermatozoa membran akrozom bütünlüğünün incelenmesi amacıyla 0,1 ml phosphate buffer saline çözeltisi ile 10 µl sperma karıştırılarak 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj devir sayısının 100 RCF olması önem arz etmektedir. Örnek üzerindeki süpernatant alındıktan sonra PBS ilave edilerek ikinci kez santrifüj edilmiş

ve 15 dk aseton ile tespit edilmiştir. Aseton ile tespit edilme süresince 4 °C ısıda bekletilmiştir. Özel olarak hazırlanan PSA-FİTC boya ile 37 °C sıcaklıkta 60 dk karanlık ortamda inkübe edildikten sonra floresan mikroskop yardımıyla değerlendirilmiştir. Akrozom defekt değerlendirmesinde kontrol grup (24,20±3,82), BSA1 (24,34±2,79), BSA3 (21,17±2,97) ve BSA5 (18,80 ±3,44) ortalama değerde olduğu dolayısıyla ml'ye 1mg oranında katılan grup ve 3 mg katılan grubun hem kontrol hemde 5 mg katılan gruba yakın olduğu değerlendirilmiştir. Motiliteyi belirlemek amacıyla uygun miktarda alınan sperma 37 °C'de ısıtılmalı tablalı faz kontrast mikroskopunda gözlenmiştir. motilite ortalama değerleri incelendiğinde sulandırıcıya katılan BSA eklenmiş TL hepes bazlı sulandırıcı oranı arttıkça motilite oranının arttığı gözlenmiştir. Kontrol (39,33±3,71), BSA1 (43,66±4,41), BSA3 (50 ±4,62), BSA5 (54,33±3,71). Çalışmada protein eklenen hepes bazlı sulandırıcıyla farklı oranlarda sulandırılan bal arısı sperması incelendiğinde en yüksek oranda katılan sulandırıcının sonuçlarının özellikle motilite başta olmak üzere kontrol grubu ve diğer çalışma gruplarına göre başarılı olduğunun önemi vurgulanmıştır.

### 8.1. Shilajit

Shilajit bazı bölgelerde kayaçların rizosfer tabakası arasından sızan kahverengiden siyah renge kadar değişik renklerde bulunan ve kayaçlardaki mikrobiyal, bitkisel, metabolik ürünler ve humus bileşikleri içeren bir maddedir (Şekil 8.1).



Şekil 8.1.Shilajit (Agarwal, vd., 2007)

Pakistan, Hindistan, Tibet, Nepal, Sikkim ve Bhutan toprakları üzerinde yer alan dağ toplulukları olarak adlandırılan Himalaya dağlarında ve yine Afganistan, Avusturalya ve Rusya da bazı dağlarda bulunur. Shilajit kabaca humik bileşikler ve

humik olmayan metabolitler olarak adlandırılan hücrede bulunan metabolik ara ürün ve ürünlerdir (Ghosal, 2002). Çok uzun yıllardan beri bazı ülkelerde tıp alanında kullanılmaktadır. Carrasco-Gallardo, vd. (2012), shilajit içerisinde selenyum ve çeşitli mineral maddeler, dibenzo-alfa pironların yanı sıra humus içeren humins, humik asit ve fulvik asit bulunduğunu bildirmiştir. Shilajitin yapısında bulunan fulvik asit antioksidan ve antiinflatuar maddeler içermektedir. Xiao, vd. (2018) tarafından keçiler üzerinde yapılan çalışmada, fulvik asitin belirli oranda anormal spermatozoon oranında ve malondialdehit seviyesinde azalmaya sebep olduğu, ilave olarak membran ve akrozom bütünlüğünü koruduğu ve motilite de artışa sebep olduğu görülmüştür. Bhattacharya, vd. (1995), yaptığı çalışmada shilajitin nitrik oksit ve hidroksil radikallerinin sebep olduğu zararlı etkilere karşı etkili olduğunu belirtmiştir. Çalışmada ratlarda artan miktarda shilajit uygulamasına bağlı olarak süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz aktivitelerinde artış olduğunu gözlemlemiştir. Ghosal'a (1990), göre shilajit tıpta ürogenital hastalıklar, sarılık, safra taşı, sindirim problemleri, sinir rahatsızlıkları, kronik solunum yolu hastalıkları, anemi gibi birçok rahatsızlık sağaltımında kullanılır. Araştırmacı ayrıca shilajitin afrodisyak özeliğinin olduğunu da belirtmiştir. Stohs (2014), yaptığı derleme çalışmasında bir çok kaynakta shilajitin antioksidan, antiinflatuar, immunomodilatör , adaptojenik etkilerinin yanı sıra spermatogenesis üzerine olumlu etkilerinin vurgulandığını bildirmiştir. Mishra, vd. (2018), erkek farelerde shilajitin infertiliteye etkisiyle ilgili yaptıkları çalışmada shilajitin toksik maddelerin üreme sistemi üzerine olumsuz etkilerine karşı koruyucu özellik gösterdiğini belirtmiştir. Bu sebeple gelişen infertilite sorunlarının shilajit yardımıyla tedavi edilebileceğini vurgulamıştır. Çalışmada kadmiyum uygulanan farelerde bazı üreme organlarının (veziküler bez, testis, epididimis) ağırlıklarının azaldığı gözlenmiştir. Hastalanan hayvanlarda shilajit uygulamasının ardından üreme organlarının ağırlıklarının arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada sperma oluşumunun hasta fareler de azaldığı, shilajit tedavisiyle sperma miktarında ve motilitede artış sağlandığı gözlenmiştir.

Pandit, vd. (2016), insanlar üzerinde yaptıkları çalışma 45-55 yaş arası gönüllü sağlıklı erkekler ile yapılmıştır. Hastalar iki gruba ayrılmış ve bir gruba shilajit verilirken diğer gruba sadece plasebo ilaçlar verilmiştir. Araştırmacılar shilajitin serbest testosteron seviyesini kayda değer miktarlarla artırdığını belirtmişlerdir. Ayrıca aynı çalışmada FSH ve LH seviyelerine de bakılmış shilajit tedavisi sonucu LH seviyesi korunurken FSH seviyesinin arttığı gözlenmiştir.

Idrees, vd. (2016), yaptıkları çalışmada dişi tavşanlarda üreme kabiliyeti üzerine olumlu etkileri ve antioksidan özelliği bulunan selenyum ve E vitamininin shilajit ile kombinasyonlarının fertilizasyon yeteneği bakımından etkilerini araştırmışlardır. Gebelikte aktif hormon olan serum progesteron düzeyi incelenmiş ilave olarak gebelik içerisinde ovaryum da korpus luteumun durumu, fetüs ve fetüsün uterusu tutunma durumu ve sayısı, plasenta ve fetüsün ağırlıkları değerlendirilmiştir. Çalışmada selenyum+shilajit uygulanan gurubun diğer deneme gruplarına oranla avantaj sağladığı görülmüştür. Çalışma sırasında istenmeyen etki tespit edilmemiştir. Gebeliğin 12. ve 24. gününde kontrol grubu dışındaki dördüncü grupta korpus luteum sayısının artması dikkat çekmiştir. İmplantasyon oranı incelendiğinde kontrol grubu dışında kalan 3. ve 4. grupların değerleri birbirine yakinken diğerlerine göre artış olduğu değerlendirilmiştir. Embriyo ağırlıkları ölçüldüğünde 4. grup başta olmak üzere 3. ve 4. grupların avantajlı olduğu görülmüştür. Ayrıca tüm çalışma gruplarında serum progesteron düzeylerindeki artış dikkat çekmiştir. Dolayısıyla kontrol grubu ve 4 ayrı gruptan oluşan çalışmada shilajitin olumlu etkisi olduğu değerlendirilmiştir. Çalışmada her grupta 6 adet dişi tavşan yer almaktadır. Kontrol grubu dışında selenyum ve E vitamini belirlenen dozlarda shilajitle ayrı ayrı kombine edilmesinin yanında üçünün birlikte çalışıldığı 4 grup oluşturulmuştur. Çalışmada gebeliklerinin belirlenen zamanlarda ötenazi edilen tavşanlarda uterusu implantasyonu gerçekleşmiş fetüs sayısı, plasenta ve yavru ağırlıkları, gebelik korpus luteumlarının durumlarının belirlenmesine ilave olarak serum progesteron düzeylerine de bakılmıştır. Sonuç olarak çalışma gruplarının kontrol grubuna göre avantajlı görüldüğü ifade edilmiştir. Ayrıca her üç bileşeninde birlikte bulunduğu grup önemli derecede başarılı bulunmuştur.

Biswas, vd. (2010), yaptıkları çalışmada spermatozoa azlığı teşhisi konulan mevcut sperma yoğunluğu  $20.10^6$ 'dan az olan hastalara 3 aylık periyotta shilajit sağaltımı uygulanmıştır. Hastalar FSH, LH ve testesteron serum miktarlarının yanı sıra sperma hacmi, motilite ve sperma yoğunluğu yönünden incelenmiştir. Ayrıca oksidatif etki amacıyla malondialdehit seviyesine bakılmıştır. Hastaların % 80'inde önemli oranda olumlu etki görülmüştür. Sperma hacminde % 37,6 yükseliş görülürken sperma yoğunluğunda yaklaşık % 19 artış gözlenmiştir. Malondialdehit seviyesindeki azalma kayda değer bulunmuştur. Ayrıca testesteron, FSH ve LH miktarındaki artış dikkat çekici görülmüştür. Motilitede ölçüm zamanına oranla artış göstermiştir. 3 aylık zaman diliminde shilajitin motilite üzerine etkisi önemli bulunmuştur. Sağaltımdan 3 ay sonra

0,5, 1 ve 2 saat zaman aralıkları içerisinde spermada gözlenen motilite bulguları sağaltıma başlamadan önceki değerlerle karşılaştırılmış ve sonuçların önemi vurgulanmıştır. İlk yarım saatte ortalama % 12,4 motilite artışı gözlenirken 1 saatte % 13,2 ve 2 saat sonra % 17,4 lik artış gözlenmiş ve önemli bulunmuştur.

Bu durum shilajitin oksidatif stres ve motilite üzerindeki pozitif etkisinin görülmesi açısından önemlidir. Shilajit birçok ülkede de reproduktif sorunların giderilmesi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır.



## 9. MATERYAL VE YÖNTEM

Bal arısı spermasının uzun süre saklanmasında spermatozoonun hassas yapısından dolayı memeli hayvanlarda olduğu kadar yüksek başarı elde edilememiştir (Cobey, 2007). Shilajit'in, yapılan çalışmalarda insan ve bazı memeli hayvanlarda birçok infertilite probleminin aşılmasında olumlu sonuç verdiği görülmüştür. Bu çalışmanın amacı shilajitin güçlü antioksidan etkisinden yararlanılarak bal arısı spermasının uzun süreli saklanmasında özellikle dondurma ve çözündürme sırasında görülen olumsuzlukların giderilmesine katkıda bulunmaktır.

### 9.1. Materyal

#### 9.1.1. Çalışma Planı ve Kolonilerin Hazırlanması

Çalışmada ilk önce kovan temini yapıldı ve kovanların konacağı yer olarak Amasya ili Suluova ilçesi Çeltik bölgesinde tarım yapılmayan bir bölge belirlendi. Koloniler birbirlerine engel olmayacak şekilde aralıklı ve rüzgarı karşıdan almayacak şekilde yerleştirilmiştir. Çalışmada kullanılacak koloniler Batı Karadeniz Bölgesine uyumlu Anadolu ırkı kolonilerdir. Koloniler belirlenirken, genç kraliçe arıya sahip, nisan ayında en az yedi çıta arı mevcudiyeti bulunan ve yumurtlama kapasitesi yüksek koloniler tercih edilmiştir. Çalışmada kullanılacak kolonilerin petek örme ve yumurtlama durumu, mevcut bal ve polen stoku, kontrol edilerek kolonilerdeki mevcut aksaklıklar giderilmiştir. Seçilen kolonilerin varroa sağaltımları itinayla yapılmıştır. Çalışma amacıyla istatistiksel veriler göz önünde bulundurularak 25 adet çalışma kolonisi ve 10 adet destek kolonisi belirlenmiştir. Koloniler 1/1 oranında gün aşırı şurup verilerek kolonilerin çalışma için yeterli mevcudiyete gelmeleri ve petek kabartmaları sağlanmıştır. Çalışmada kullanılmak üzere kolonilere erkek çıtaları verilerek yeteri kadar kabarmış erkek çıtası temini sağlanmıştır. Çalışmada bal arılarına verilecek miktar eksiksiz ayarlanabilmesi amacıyla shilajit'in 200 mg'lık kapsül formu tercih edilmiştir.

#### 9.1.2. Kolonilerin Seçimi ve Grupların Oluşturulması

Seçilen 25 adet koloninin mevcut arılı çıta sayıları eşitlenerek kontrol, SH-1, SH-2, SH-3, SH-4 olacak şekilde 5'er kovanlı 5 ana gruba ayrılmıştır (Şekil 9.1). Her grup için çalışma kolonilerine belirli aralıklarla işçi arı takviyesi yapmak ve erkek arı larvası vermek amacıyla 2 adet güçlü katlı ve en az 13-15 çıta arı popülasyonuna sahip destek kolonisi ayrılmıştır.



Şekil 9.1. Erkek arı üretimi için tasarlanmış 6 çıtalı ruşet deneme kovanları

## 9.2. Yöntem

### 9.2.1. Seçilen Kolonilerin Çalışma İçin Düzenlenmesi

Seçilen çalışma kolonilerinin erkek arı üretiminin sağlıklı biçimde sürdürülebilmesi için düzenlenmeleri gerekmektedir. Bu amaçla kolonide bulunan esmerleşmiş veya özelliğini kaybetmiş petekler yenileriyle değiştirildi. Kolonilerden birbirlerine kapalı yavrulu çıta aktarılarak ortalama güçleri eşitlendi. Kolonilerde bulunan kraliçe arıların yumurta verimi, kolonilerin polen ve bal stoku durumu kontrol edilerek eksiklikler giderildi. Kolonilere sürekli ham petek verilerek yeteri kadar kabarmış işçi ve erkek arı peteği elde edildi. Destek kolonileri çalışma kolonilerinin sürekliliğinin sağlanması açısından büyük önem arz etmektedir. Destek kolonileri itinayla seçilerek diğer kolonilerden devşirme yapılarak istenilen güce ulaşmaları sağlandı. 1/1 şurup ve polenli kek ile desteklenerek yavru potansiyellerinin artması sağlandı. Güçlü katlı kolonilerin haftalık kontrolleri yapılarak oğul vermemesi için gereken önlemler alındı. Seçilen 25 adet çalışma kolonisinin kraliçe arıları bir adet kapalı yavrulu çıta arısıyla birlikte 2 adet polenli ballı çıta ile ruşet kolonilere alınarak çalışma kolonileri kraliçe arısız bırakıldı. Kraliçe arısı olmayan koloniler belirli aralıklarla kontrol edilerek yeni kraliçe arı yüksükleri bozularak koloninin işçi arı sayısını stabil tutmak amacıyla destek kolonilerinden açık ve kapalı yavrusu bulunan çıta takviyesi yapıldı. Destek kolonilerine verilen erkek çıtalı 4-5 günlük larvalı olduğunda alınarak çalışma kolonilerinde polenli çıtalı arının yanındaki çıtaya yani 3 ve 8 numaralı çıta alanlarına verildi. Destek kolonileri polenli arı keki ve ikame şurupla beslenerek yavru teşvik edildi. İşçi arı ve erkek arı takviyesiyle boşalan bölgelere

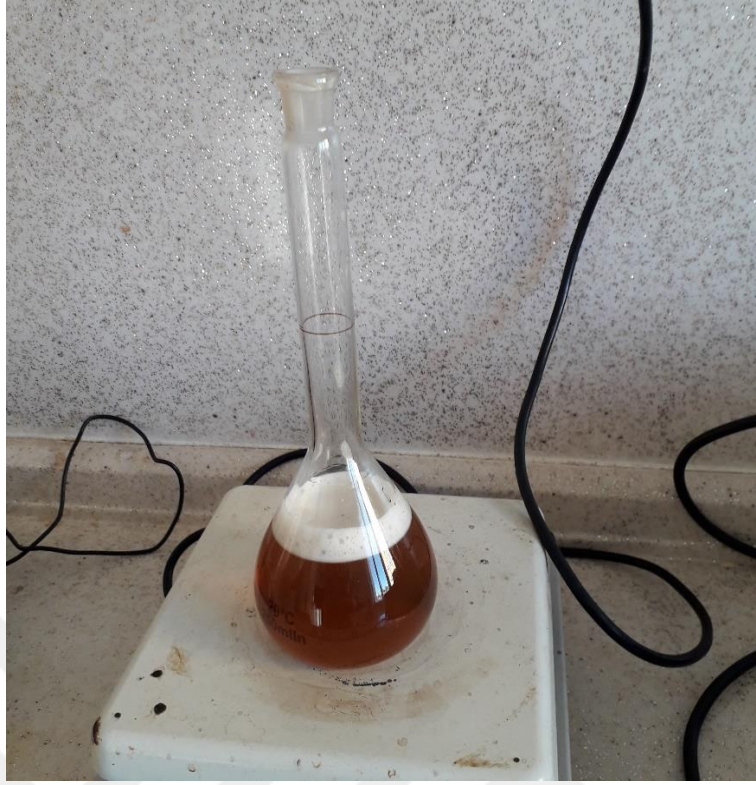
düzenleme yapılarak kabarmış hazır çıta verildi.

### 9.2.2. Çalışma Grupları İçin Şurupların Hazırlanması

Çalışma grupları SH-0, SH-1, SH-2, SH-3, SH-4 şeklinde 5'er koloni olarak belirlendi. Besleme amacıyla bir ölçek su, bir ölçek şeker hesabıyla şurup hazırlandı. Her koloni için bir seferde 1 lt olacak şekilde şurup miktarı ayarlandı. Kontrol grubu için katkısız şurup hazırlandı. Deneme grupları için 1'er lt hazırlanan şuruplara litreye 5 mg, 10 mg, 15 mg ve 20 mg shilajit ilavesi yapıldı (Şekil 9.2). 200 mg kapsül 200 ml suda eritildi (Şekil 9.3). Böylece 1 mg/ml shilajit çözeltisi elde edildi. Hazırlanan şuruptan sırasıyla 5, 10, 15, 20 ml alınarak yerine aynı miktarda shilajit çözeltisi ilave edilerek SH-1, SH-2, SH-3, SH-3, SH-4 çalışma grupları için shilajitli şurup hazırlandı (Şekil 9.4).



Şekil 9.2. Shilajit çözeltisi



Şekil 9.3. Shilajit eritilmiş çözelti



Şekil 9.4. Hazırlanan şuruba shilajit ilavesi

### 9.2.3. Çalışma Gruplarının Beslenmesi

Çalışma grupları için hazırlanan kontrol grubu shilajitsiz, SH-1, 5 mg shilajit, SH-2, 10 mg shilajit, SH- 3, 15 mg shilajit ve SH- 4, 20 mg shilajit içeren 1/1 şekerle hazırlanan şuruplarla gün aşırı olarak beslendi. Besleme shilajit içeren şuruplar her zaman aynı gün içinde hazırlanıp gruplara verildi. Besleme akşama doğru arı faaliyetlerinin azaldığı saatlerde yapıldı (Şekil 9.5).



Şekil 9.5. Çalışma kolonilerinin beslenmesi

Rutin olarak destek kolonilerinden alınan erkek arı larvalı çıtalar kraliçe arısı bulunmayan çalışma kolonilerine verildi. Destek kolonileri rutin olarak kontrol edilerek oğul eğilimine karşı tedbir alındı. Kraliçe arıların yumurtlama durumu ve düzeni denetlendi. Destek kolonileri bol ikame yem ve şurupla beslenerek petek kabartma, yumurtlama teşvik edildi. Çalışma kolonileri gün aşırı olarak çalışma boyunca beslendi.

### 9.2.4. Erkek Arı Üretimi

Erkek arılar döllenenmemiş yumurtadan geliştiğinden, erkek arı üretimi için geniş gözlü özel petekler kullanıldı. Destek kolonilerine verilen erkek gözlü petekler kontrol edilerek 4-5 günlük larva bulunan petekler alınarak çalışma gruplarına verildi. Destek kolonilerinde eksilen peteklerin yerine yenileri konuldu. Kraliçe arısı olmayan çalışma kolonileri gün aşırı beslenerek yumurtadan itibaren 24 gün sonra çıkan erkek arılar farklı kraliçe arı işaretleme kalemleriyle işaretlendi. Olgunlaşan erkek arılar 2-3 haftalık olduklarında sperma almak için toplandılar. Erkek arı üretimi için oluşturulan kraliçe arısı bulunmayan kolonilerin yaptıkları kraliçe arı yüksükleri rutin kontrollerde tespit edilerek bozuldu (Şekil 9.6). Sperma almak amacıyla oluşturulan erkek arı

çıtasında çıkan erkek arılar sürekli kontrol edildi (Şekil 9.7).



Şekil 9.6. Erkek arı üretim sürecince oluşan kraliçe arı yüksükleri



Şekil 9.7. Erkek arı üretim çıtası ve olgunlaşmış erkekler

#### **9.2.5. Olgunlaşan Erkek Arıların Toplanması**

Çalışma kolonilerinde erkek arıların olduğu çıtalara kontrol edilerek işaretli arıların yoğun olarak bulunduğu erkek arıları barındıran çıtalardan 15-21 günlük yaşta

yeterli olgunluğa ulaşan erkek arılar toplandı (Şekil 9.8). Ayrıca hava koşullarının uygun olduğu rüzgarsız günlerde çalışma kolonileri önüne konulan kraliçe arı ızgarası üzerine biriken işaretili erkek arılar toplandı (Şekil 9.9). Erkek arılar dışarda uzun süre dayanamadıklarından erkek arı toplama çalışması mümkün olduğunca hızlı yapılmaya çalışıldı. Toplanan arıların strese maruz kalmamaları, uçmalarını teşvik ederek dışkılamalarının sağlanması ve sperma vermek için hormonal olarak aktif olabilmeleri için erkek arılar geniş kutularda toplandı. Yeterli sayıda toplanan erkek arılar ivedi bir şekilde spermanın alınacağı laboratuvara getirildi.



Şekil 9.8. Erkek arı petek gözleri ve erkek arılar

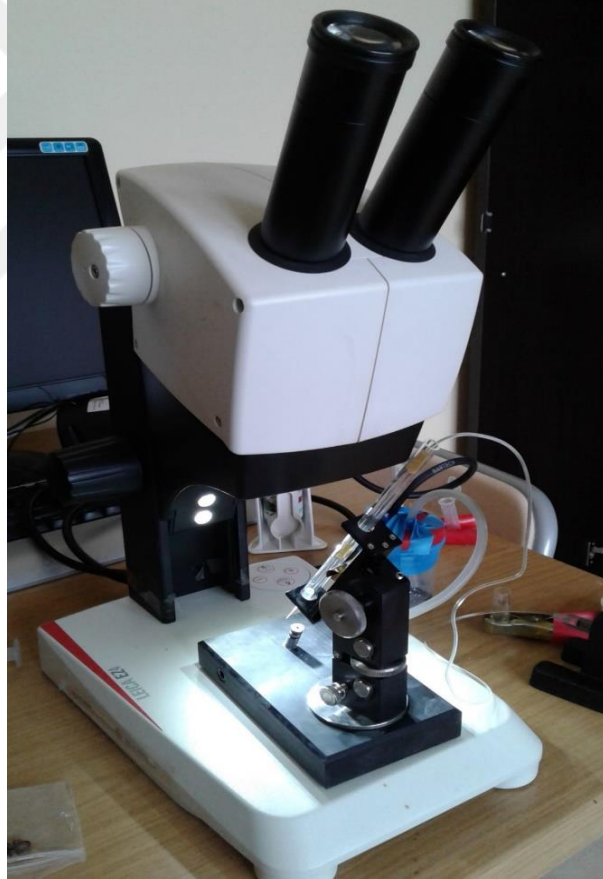


Şekil 9.9. Erkek arı kapanı

### 9.2.6. Toplanan Erkek Arılardan Sperma Alınması

Toplanan erkek arılar koloni dışında uzun süre yaşayamadıklarından sperma alınmasına zaman kaybedilmeden başlandı. Sperma almak amacıyla suni tohumlama

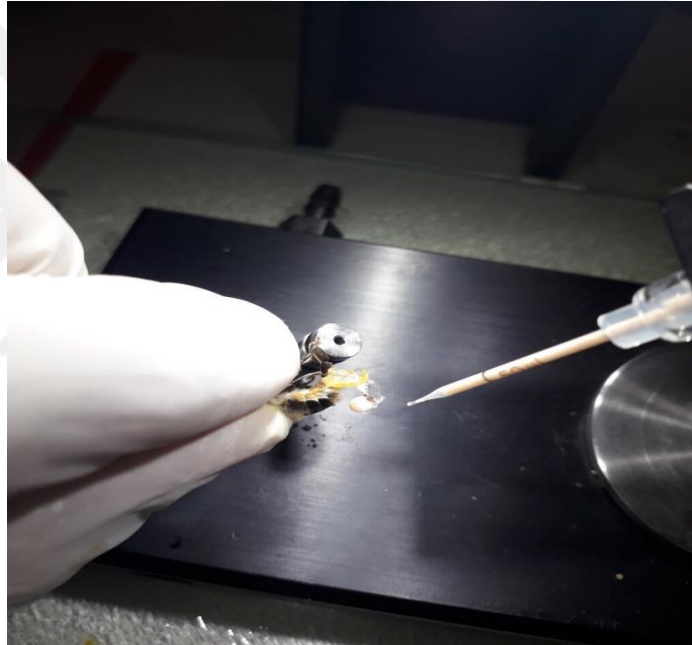
cihazı (Latshaw marka) ve stereo mikroskop (Leica - EZ4) kullanıldı (Şekil 9.10). Yeterli olgunluğa ulaşan erkek arının thorax ve abdomen'ine basınç uygulanarak endophallus açığa çıkarıldı. Erkek arıda sperma endophallus üzerinde mukus bezi salgısının üzerinde bulunur. İki sekresyon arasında bulbus bezi sekresyonu bulunur. Bu nedenle suni tohumlama cihazının cam kanülünün mukus sekresyonuyla temas etmemesine dikkat edildi. Sperma alınırken önceki spermadan bir miktar alınıp, sonraki alınacak olan sperma üzerine verilerek sperma çekme işlemine geçildi (Şekil 9.11). Küçük mukus parçaları cam kanülü tıkayabileceğinden sperma alma sırasında mümkün olduğunca hızlı davranıldı (Şekil 9.12). Toplanan erkek arılardan mümkün olduğunca faydalanabilmek adına enerjisi azalan erkek arılardan sperma almaya öncelik verildi. Natif spermada motilite değerlendirilerek ortaklama motil spermatozoa oranının %80 üzeri olduğu görüldü.



Şekil 9.10. Sperma alma düzeneği stereo mikroskop



Şekil 9.11. Sperma alma



Şekil 9.12. Cam kanül ile sperma alma

### 9.2.7. Spermanın Sulandırılması

Sperma ephendorf tüpüne aktarıldıktan sonra üzerine sperma sulandırıcısı modifiye Kiev Solüsyonu (100 ml için D<sup>+</sup>-glikoz 0,3 gr, potasyum klorid 0,41 gr, disodyumsitrat dihidrat 2,43 gr, % 10 DMSO (Moritz, 1984) ile 1/5 oranında sulandırıldı (Şekil 9.13).



Şekil 9.13. Sulandırılmış sperma

### 9.2.8. Sulandırılan Spermanın Payetlere Çekilmesi

Hazırlanan sperma payetlere çekilmeden önce doz ayarlaması yapmak amacıyla cam kanül üzerine işaretler kondu (Şekil 9.14). Sulandırılan sperma 0,25'lik payetlere çekilmeden önce bir miktar modifiye Kiev Solüsyonu çekildi. Daha sonra bir hava boşluğu bırakılarak sulandırılmış sperma çekildi. Son olarak hava boşluğunun ardından tekrar sulandırıcı çekilerek payetin açık ucu preslenerek kapatıldı (Şekil 9.15).



Şekil 9.14. Payete çekilmeye hazır sperma



Şekil 9.15. Payete çekilen bal arısı sperması

### 9.2.9. Payetlere Çekilen Spermanın Dondurulması

Payetlere uygun şekilde çekilen sperma ekilibrasyon amacıyla 2 saat 4 °C sıcaklıkta bekletildi (Şekil 9.16). Daha sonra sıvı azot düzeneğinde 5 cm yukarıda bulunan özel tel ızgara üzerine yerleştirilerek 10 dk sıvı azot buharında sperma donduruldu (Şekil 9.17). Dondurulan spermalar sıvı azot içerisinde saklandı (Şekil 9.18).



Şekil 9.16. Sperma ekilibrasyon



Şekil 9.17. Payetlerin azot buharında soğutulması



Şekil 9.18. Payetlerin azot tankına aktarılması

### **9.2.10. Spermmanın Değerlendirilmesi**

Dondurularak saklanan spermalar 37 °C’de 30 saniyede çözdürüldü.

#### **9.2.10.1. Motilitenin Değerlendirilmesi**

0,5 µl alınan çözdürülmüş sperma lam üzerine alınarak ısıtmalı tablalı faz kontrast mikroskop altında 400x büyütmede değerlendirilmesi yapıldı.

Değerlendirmede bal arısı spermasına özgü dairesel hareketin yoğunluğu baz alınarak motilite % 20, % 40, % 60, % 80 şeklinde belirlendi (Gontarz, vd., 2016; Taylor, 2009).

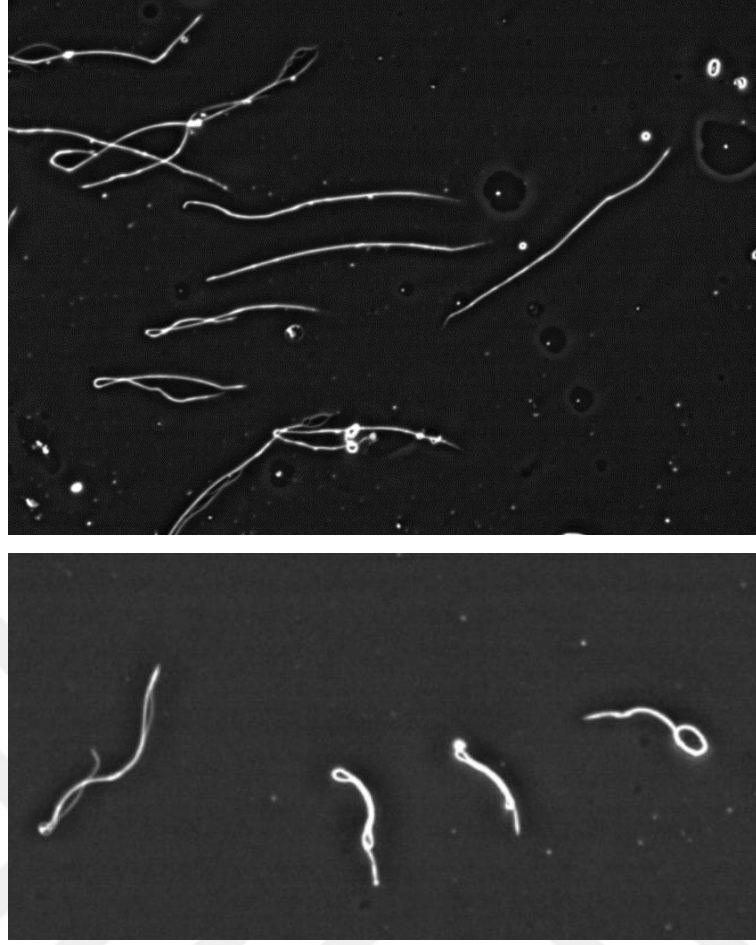
#### **9.2.10.2. Spermatozoa Yoğunluğu Değerlendirilmesi**

Spermatozoa yoğunluğunun değerlendirilmesi amacıyla 1 µl sperma 1 ml Kiev sulandırıcısı ile sulandırıldıktan sonra thoma lamına konulup mikroskop altında 400x büyütmede 5 orta kare sayılarak bulunan aşağıdaki formülasyona göre hesaplandı (Tekin, 1994; Cobey, 2013).

Yoğunluk = Sayılan Spermatozoa / Sayılan Büyük Kare (5) x Büyük Kare Hacmi (1/250) x Sulandırma oranı (1/1000)

#### **9.2.10.3. Plazma Membran Bütünlüğünün Değerlendirilmesi**

HOST pozitif oranının belirlenmesi amacıyla 10 µl sperma 100 µl 100 mOsm'lük HOST solüsyon içerisinde 37 °C'de 30 dakika bekletildi. 200 adet spermatozoa sayılarak sarmal ve kıvrık kuyruklu spermatozoonlar (Şekil 9.19) HOST pozitif olarak değerlendirildi (Alçay, vd., 2019).



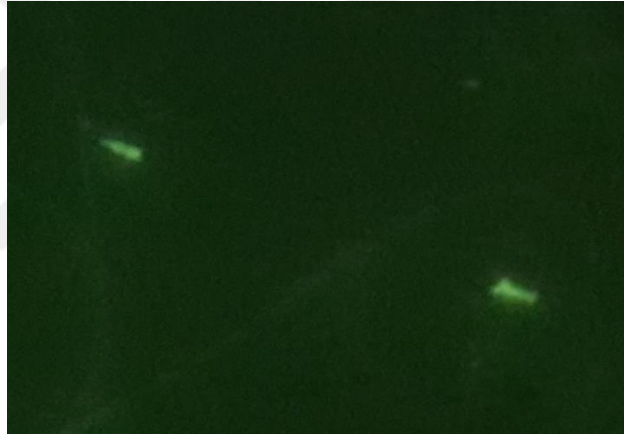
Şekil 9.19. HOST değerlendirmesi

#### 9.2.10.4. Akrozom Bütünlüğünün Değerlendirilmesi

Akrozom bütünlüğün değerlendirilmesi amacıyla 10 µl sperma 100 ml phosphate buffer saline (PBS) içersine katıldı. 5 dakika 100 RCF devirde santrifüj edildi. Üstteki süpernatant kısım alınarak atıldı. Altta kalan sperma üzerine tekrar 100 ml PBS ilave edilerek tekrar 5 dakika 100 RCF devirde santrifüj edildi. Üstteki süpernatant kısım alınarak atıldı. Alttaki spermadan froti çekilerek PSA-FİTC solüsyonuyla karanlık odada boyandı. 37 °C’de 1 saat karanlık ortamda bekletildikten sonra floresan ataçmanlı mikroskopta en az 200 spermatozoon dincelendi (Şekil. 9.20 ve 9.21) ve yüzde olarak belirlendi (Alçay, vd., 2019).



Şekil 9.20. PSA-FITC ile boyanmış spermatozoon



Şekil 9.21. PSA-FITC ile boyanmış spermatozoa

#### **9.2.10.5. Spermada Total Antioksidan ve Total Oksidan Seviyelerinin Değerlendirilmesi**

Total antioksidan ve total oksidan seviyeleri ölçümünde spektrofotometri cihazı (Thermo®) kullanıldı (Şekil 9.22).

**Total Oksidan Ölçümü:** TOS, Total Antioxidant Status kiti ile (REL Assay Diagnostics®), asidik ortamda çeşitli oksidatif türlerin varlığında demir iyonunun demir iyonuna oksidasyonuna dayanan prensiple ölçüldü. Ferrik iyon, ksilenol turuncu ile ölçülmüştür. Test kitinin prosedürü aşağıdaki gibidir: numune hacmi, 45 µl; R1 (Reaktif) hacmi, 300 µl; R2 hacmi, 15 µl; reaksiyon süresi, 10 dakika; sıcaklık, 37 °C;

dalga uzunluğu, 530 nm. Sonuçlar;  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  eşdeğer/l ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  equiv./l) olarak ifade edildi.

**Total Antioksidan lümü:** TAS, Total Antioxidant Status kiti (REL Assay Diagnostics<sup>®</sup>) kullanılarak ölçüldü. Renk değişimi analizör kullanılarak ölçüldü. Reaksiyon Trolox (E vitamininin suda çözünür bir analogu, 6-hidroksi-2.5.7.8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit) ile kalibre edildi. Test kitinin prosedürü aşağıdaki gibidir: numune hacmi, 18  $\mu\text{l}$ ; R1 hacmi, 300  $\mu\text{l}$ ; R2 hacmi, 45  $\mu\text{l}$ ; reaksiyon süresi, 10 dakika; sıcaklık, 37  $^\circ\text{C}$ ; dalga uzunluğu, 660 nm. Sonuçlar;  $\mu\text{mol Trolox eşdeğeri/l}$  ( $\mu\text{mol}$ ) olarak ifade edildi.



şekil 9.22. Total Antioksidan ve Oksidan Seviyeleri lümünde Kullanılan Spektrofotometri Cihazı

#### 9.2.10.6. İstatiksel Analiz

Çalışmada elde edilen veriler, aritmetik ortalamalar ve standart hatalar şeklinde özetlendi. Araştırmada kullanılan her bir grup için istatiksel önem derecesi ‘Tek Yönlü Varyans Analizi’ ile yapıldı. Grup ortalamalarının arasındaki farklılıkları araştırmak için Duncan'ın çoklu aralık testi uygulandı. Grupların etkileri  $P < 0,05$  düzeyinde değerlendirildi. Araştırmadan elde edilen verilerin varyans analizi için SPSS 20,0 paket programı kullanıldı.

## 10. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bal arısı kolonilerinde arı besinine farklı dozlarda shilajit ilavesinin (0, 5, 10, 15, 20 mg/l) motilite, spermatozoa yoğunluğu, HOST, akrozom bütünlüğü (Tablo 10.1), total antioksidan ve total oksidan (Tablo 10.2) değerleri belirlenmiştir.

Tablo 10.1. Çalışma gruplarında çözüm sonrası spermatolojik parametreler

Gruplar	Motilite (%)	Spermatozoa Yoğunluğu ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )	HOST (%)	Akrozom Bütünlüğü (%)
SH-0	20,00 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	425,00 $\pm$ 48,70	46,20 $\pm$ 2,15 <sup>c</sup>	86,60 $\pm$ 0,24 <sup>d</sup>
SH-1	56,00 $\pm$ 4,00 <sup>a</sup>	400,00 $\pm$ 32,55	67,20 $\pm$ 2,05 <sup>b</sup>	87,80 $\pm$ 0,20 <sup>c</sup>
SH-2	52,00 $\pm$ 4,89 <sup>a</sup>	515,00 $\pm$ 76,85	72,20 $\pm$ 0,66 <sup>ab</sup>	88,20 $\pm$ 0,20 <sup>bc</sup>
SH-3	60,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	590,00 $\pm$ 38,40	74,20 $\pm$ 1,71 <sup>ab</sup>	88,80 $\pm$ 0,20 <sup>ab</sup>
SH-4	64,00 $\pm$ 7,48 <sup>a</sup>	485,00 $\pm$ 16,95	79,00 $\pm$ 5,83 <sup>a</sup>	89,20 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>
P	0,000	0,051	0,000	0,000

SH-0: Kontrol; SH-1: % 5 shilajit; SH-2: % 10 shilajit; SH-3: % 15 shilajit; SH-4: % 20 shilajit  
a,b: Aynı sütundaki farklı harfler taşıyan ortalamalar arası farklılıklar önemlidir

Bal arısı besinine farklı düzeylerdeki shilajit ilavesinin arı spermasının dondurularak saklanması üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmamızda grupların (SH-0, SH-1, SH-2, SH-3, SH-4) sırasıyla % motilite ortalama değerleri % 20, % 56, % 52, % 60 ve % 64 olarak belirlendi (Tablo 10.1). Motilite değerleri (%) yönünden gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edildi. Bal arısı besinine farklı dozlarda shilajit ilavesinin motilite yüzdesini çok önemli düzeyde arttırdığı tespit edildi ( $P < 0,001$ ).

Bal arısı spermasında yapılan bir çalışmada yumurta sarısı ve soya lesitin'in sperma sulandırıcısına katılmasına bağlı olarak motilite ve canlılık oranı incelenmiştir. Çalışmada % 10 DMSO ve % 11 gliserol bulunan tampon sulandırıcıya farklı oranlarda soya lesitin ve %20 yumurta sarısı katılmıştır (Dadkhan, vd., 2016). Yumurta sarısı memeli hayvanlarda sperma dondurulma çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak hayvansal ürün olması uygun olmayan şartlarda çabuk bozulması gibi dezavantajlarında bulunmaktadır. Bu amaçla yumurta sarısı yerine soya lesitin gibi bitkisel kaynaklı katkı maddeleri kullanımıyla ilgili çalışmalar mevcuttur. Çalışmada yumurta sarısı ve soya lesitin'in bal arısı spermasının dondurulması üzerine etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada çalışılan maddeler arı besinine katılmadığından çalışmamızla örtüşmemekle beraber dondurma çözündürme sonrası diğer çalışma

gruplarına göre başarılı bulunan yumurta sarısı sulandırıcısı motilitesinin 0-5 şeklinde değerlendirmede 3,6 olarak tespit edilen oran %60-80 arası değerlere karşılık gelmesi ile SH-3 ve SH-4 gruplarının çalışma sonuçlarıyla örtüşmektedir.

Taylor, vd., (2009) spermanın dondurularak saklanması farklı sulandırıcıların karşılaştırılmasına ilişkin yaptıkları çalışmada motiliteye ilişkin değerler 0, 20, 40, 60,80 ve 95 üstü olarak tanımlanmış ancak 0 ile 5 arası değerlendirme ile ifade edilmiştir. Diğer sulandırıcılara göre başarılı bulunan sulandırıcı 4 motilite değerleri 3'ün üzerinde değerlerde olduğu görülmüştür. Çalışmada Kiev solüsyonu ve %10'luk kriyoprotektan katılan sulandırıcı kullanılması çalışmamızla örtüşmektedir. Ayrıca çalışmada DMSO'nun diğer kriyoprotektan ajanlara göre belirgin şekilde etkili olduğu görülmüştür. Mevcut çalışmamızda da DMSO kullanılmış olması saklama koşulları açısından benzerlik göstermektedir. Çalışmada motilite yüzdesi diğer gruplara göre başarılı bulunan deneme grubu 4 sonucu mevcut çalışmamızdaki SH-3 ve SH-4 grubuna ait ortalama bulgularla (%60, %64) örtüşmektedir. Bu durumun sulandırıcı 4 te bulunan antioksidan olan katalazdan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Wegenner, vd., (2012) bal arısı spermasına kriyoprezervasyon işlemlerinin etkilerini belirlemek amacıyla bal arısı spermasını dondurarak uzun süreli (4 -5) ay kadar saklamış ve motilite yönünden incelemişlerdir. Toplanan bal arısı sperması 1/1 oranında sulandırılmıştır. Sulandırıcıda % 15 oranında yumurta sarısı bulunmaktadır. %0-10,5 arasında farklı oranlarda DMSO katılan sulandırıcılar içerisinde %10,5 DMSO bulunan sulandırıcının etkili olduğu vurgulanmıştır. Mevcut çalışmamızdaki %10 DMSO yakın olmasına karşın sulandırıcılar birbiriyle örtüşmemektedir. Ayrıca çalışmada dondurulan bal arısı sperması motilite değerinin (%8,8±0,8) önemi vurgulanmıştır. Mevcut çalışmamızda dondurma çözme sonucu karşılaştırılan motilite değerleri arasında belirgin fark bulunmaktadır. Bu durumun sebebinin kullanılan sulandırıcının içeriği ve sulandırma oranındaki farklılıktan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Alçay, vd., (2019) yaptıkları çalışmada BSA eklenmiş TL-hepes içeren sulandırıcıdan farklı oranında hazırladıkları sulandırıcının bal arısı sperması üzerine etkilerini değerlendirmişlerdir. Dondurulup çözödüren bal arısı sperması motilite bulguları incelendiğinde motilite değerlerinin kademeli olarak artması mevcut çalışmayla örtüşmektedir. Çalışmada BSA sulandırıcıya katılarak etki gösterirken shilajitin arı besinine katılarak etki göstermesi önemlidir.

Bal arısı spermasının dondurulmasında shilajitin etkisi ile ilgili yapılan bir

çalışmaya rastlanmamıştır. Memeli spermalarında shilajitin etkisi ile yapılmış çalışmalar bulunmaktadır.

Sultan, vd., (2021) mandalar üzerine yaptıkları çalışmada shilajitin sperma sulandırıcısına farklı oranlarda (%0, %0,25, %1,5, %2,25, %3) katılarak dondurulan sperma üzerine etkileri incelenmiştir. %3 oranında katılan shilajit grubunda motilite değeri diğer gruplara göre yüksek çıkmış ve önemli bulunmuştur.

Biwas, vd., (2009) shilajitin motilite üzerine etkisini inceledikleri çalışmada 3 ay oral shilajit sağaltımı gören oligospermi görülen hastaların motilite değerlerinin önemli derecede arttığını vurgulamışlardır. Çalışmada sağaltımdan önceki motilite değerleriyle sağaltımdan sonra alınan spermanın 0,5, 1 ve 2 saat sonraki sonuçlarıyla karşılaştırılmış shilajitin motilite üzerine etkisinin önemi vurgulanmıştır. İlk yarım saatte ortalama %12,4 motilite artışı gözlenirken 1 saatte %13,2 ve 2 saat sonra %17,4 lik artış gözlenmiş ve shilajitin motiliteyi önemli derecede etkilediği belirtilmiştir.

Shilajitin yapısında yer alan selenyum ve çeşitli mineral maddeler, dibenzo-alfa pironların yanı sıra humus içeren humins, humik asit ve fulvik asitin düzenleyici ve antioksidan etkisi olduğu bildirilmiştir (Carrasco-Gallardo, vd., 2012). Shilajitin afrodisyak etkisi olduğu ifade edilmiştir (Ghosal, 1990). Ayrıca fulvik asitin belirli oranda anaormal spermatozoon oranında ve malondialdehit seviyesinde azalmaya neden olduğu dolayısıyla shilajit kullanımının motilitede artışa sebep olduğu vurgulanmıştır (Xiao, vd., 2018). Shilajitin testosteron seviyesini ve epididimiste spermatozoon sayısını artırmak suretiyle spermatozoon hareketlerini artırdığı vurgulanmıştır (Park, vd., 2006). Kreuter, vd., (2002) fluvik asitin spermatozoonlara enerji sağlamada önemli rol üstlendiğini, dolayısıyla motiliteyi artıran bir unsur olduğunu ifade etmiştir. Shilajitle ilgili motilite üzerine yapılan çalışmalar shilajitin motilite değerleri üzerine pozitif etkisi olduğunu göstermekle birlikte çalışmamızla örtüştüğü görülmektedir

0, 5, 10, 15, 20 mg/1 düzeylerindeki shilajitin bal arısı sperması ortalama spermatozoa yoğunluğu değerlerine ait bulgular Tablo 10.1'de verilmiştir.

Rousseau ve Giovenezzo (2016) bahar mevsiminde bal arılarında yapılan ilave beslemenin üreme kabiliyeti üzerine etkilerini inceledikleri çalışmada yoğunluk değerlendirmesinde gruplar arasında belirgin fark görememişlerdir. Ortalama yoğunluk değeri ml'de  $2,77 \times 10^9$  olarak belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan Kiev solüsyon 100 ml için (0.3 g D + glukoz, 0.41 g potassium chloride, 0.21 g sodium bikarbonat, 2.43 g (sodyum sitratdehidrat) mevcut çalışmamızda kullanılan modifiye

Kiev solüsyon ile örtüşmektedir. İlave olarak çalışmada bal arılarının beslenmesine bağlı olarak sperma üzerine etkileri gözlenmiştir. Ancak spermada kriyoprezervasyon işlemi uygulanmamıştır. Çalışma verilerimiz mevcut literatür verilerinden daha yüksek elde edilmiştir. Bu etkinin shilajit kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

Paillard, vd., (2017) bal arısı spermasının kısa ve uzun süreli saklanmasına ilişkin yaptıkları çalışmada uzun süreli dondurularak saklanan bal arısı sperması ile döllen kraliçe arıda spermatikada bulunan spermatozoon sayısı değerlendirilmiştir. Çalışmada 18 adet kraliçe arıya ait  $\mu\text{L}$  deki spermatozoon sayısı genel olarak  $5.10^3$  ve  $15.10^4$  arası değerler olarak ifade edilmiştir. Çalışma bulgularının spermatikaya özgü olması ve kraliçe arıların suni tohumlanmasından evvel spermanın santrifüj işlemine tabi tutulmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Memelilerde yapılan çalışmalarda shilajitin sperma yoğunluğunu artırdığı görülmüştür. Ratlarda shilajitin epididimal spermatozoon sayısını kontrol grubuna kıyasla artırdığını dolayısıyla spermatogenezis sürecine önemli katkı sağladığının önemini vurgulamıştır (Park, vd., 2006).

Spermatozoon plazma membranında çoklu doymamış yağ asitlerinin artışı sonucu serbest radikallerin artması ve reaktif oksijen türleri için uygun ortam oluşturması spermatozoonun yapısının bozulmasına sebep olarak spermatozoon sayısında düşüşe sebep olmaktadır (Alvarez ve Storey, 1995). Shilajitin spermada MDA seviyesini önemli derece düşürerek sperma kalitesini artırdığı vurgulanmıştır (Biwas, vd.,2009). Ayrıca shilajitin spermatozoa üretimi için gerekli olan testesteron düzeyini artırdığı bilinmektedir (Park, vd., 2006).

Çalışmalarda bal arısı spermasına ait yoğunluk değerleri arasında istatistiksel olarak önemli fark saptanamamasının sebebinin bal arısı spermasının kendine özgü yapısı, bal arısı spermasının bireysel olarak sağlanamaması, sperma havuzu oluşturulduktan sonra değerlendirilebilmesi olduğu düşünülmektedir.

Plazma membran bütünlük testi olarak bilinen HOST (Hipo Ozmotik-Swelling Test) spermatozoonların membran yapısının işlevsel bütünlüğünün değerlendirilmesi için önemli bir testtir. Testin pozitif oranının artması spermatozoonların sağlam membran yapısında olduğunun bir göstergesidir. Çalışmamızda dondurularak saklanan bal arısı spermasında grupların (SH-0, SH-1, SH-2, SH-3, SH-4) ortalama pozitif yüzdeleri sırasıyla % 46,20, % 67,20, % 72,20, % 79,20, % 79,00 olarak belirlendi (Tablo.7.1). Shilajit ilavesinin HOST pozitif yüzdesini çok önemli düzeyde arttırdığı görülmektedir ( $P<0,001$ ). İstatistiksel ortalama değerler incelendiğinde genel olarak

kullanılan shilajit miktarının artmasıyla orantısal olarak membran geçirgenlik yüzdesinde artış göstermesi önemli bulunmuştur.

Wegenner, vd., (2012) bal arısı sperma parametreleri üzerine yaptıkları çalışmada osmotik stres değerlendirmesi yaparken geçirgen olmayan hücre yüzdesi olarak dondurulmamış spermada  $65,3\pm 12$  ve dondurularak saklanan sperma için  $30\pm 2,1$  ortalama değerinin önemsiz olduğunu vurgulamışlardır. Mevcut çalışmamızda HOST pozitif oranının kontrol grubundan başlayarak kademeli olarak artması önemli olup çalışma değerleriyle örtüşmemektedir. Bu durumun sebebinin shilajitin etkinliğinin yanı sıra sperma sulandırma oranı ve HOST belirleme yönteminin farkından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Oksidatif stresle ilgili bal arılarında yapılan başka bir çalışmada Alçay, vd., (2019) BSA eklenmiş TL-hepes içeren sulandırıcının farklı miktarlarının bal arısı spermasında osmotik stres üzeriene etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada HOST değerleri birbirine yakın olmakla birlikte rakamsal olarak HOST pozitif oranının yüzde değerleri kontrol grundan ( $59,20 \pm 3,58$ ) başlayarak artış göstermiş en fazla olduğu grup olan BSA5 ( $67,73\pm 4,07$ ) olarak belirlenmiştir. Mevcut çalışmamızda da arı besinine katılan shilajitin artan sevyeleriyle birlikte (5mg, 10mg, 15mg, 20mg) HOST pozitiflik yüzdesini önemli derecede artırdığı ( $67,20$ ,  $72,20$ ,  $79,20$ ,  $79,00$ ) görülmüştür. Çalışmada shilajit katılan grupların kontrol grubuna ( $46,20$ ) göre belirgin şekilde arttığı görülmektedir. Ayrıca mevcut çalışmada shilajitin bal arısı besinine katılması önemlidir. Yapılan çalışmalarla mevcut çalışma karşılaştırıldığında istatistiksel ortalama değerlerin örtüştüğü görülmektedir. Shilajitle ilgili bal arılarında çalışma bulunmamakla beraber memeliler üzerinde yapılan çalışma sonuçlarının çalışmamızla örtüştüğü görülmektedir. Kumar, vd., 2009 mandalar üzerinde yaptıkları çalışmada shilajit sağaltımı uygulanan mandaların HOST pozitif oranında sağaltım sonrasında ( $57,6\pm 0,9$ ) sağaltım öncesine ( $39,8\pm 0,57$ ) göre önemli artış olduğunu vurgulamışlardır. Shilajitin bileşiminde yer alan humik bileşikler ve humik olmayan metabolitler olarak adlandırılan hücrede bulunan metabolik ara ürün ve ürünlerdir (Ghosal, 2002). Fulvik asitin hücrede özellikle mitokondri ve çekirdeğin zarar görmesini engellediği hücre foksiyonlarını iyileştirici etkisinin olduğunu bu etkisini serbest radikallerin etkisini baskılayarak yaptığına değinilmiştir (Adam, vd., 2018). Shilajit yapısında bulunan quinon-semiquinon-hidroquinon kompleks, katalaz, süperoksid dismutaz, glutasyon peroksidaz gibi bileşenler sayesinde spermayı dondurma çözme sırasında meydana gelebilecek lipid peroksidasyonuna engel

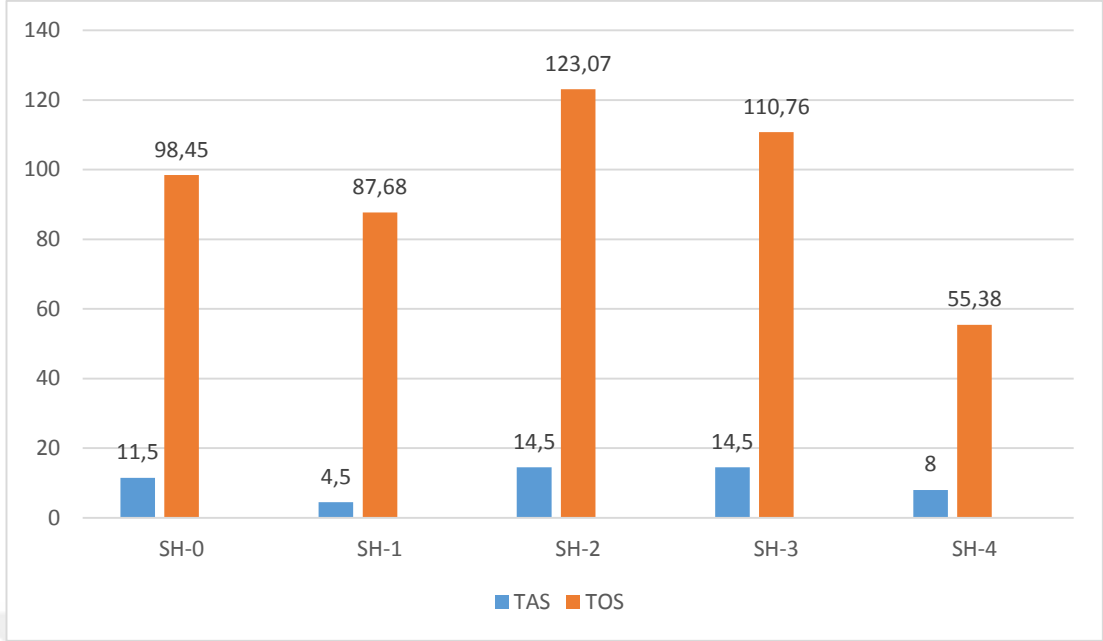
olabileceği vurgulanmıştır (Agarwal, vd., 2007). Shilajitin spermatozoonun membran yapısının bozulmasına sebep olduğu bilinen lipid peroksidasyonu oluşumunu engellediği bildirilmiştir (Tripathi, vd., 1996). Shilajitle ilgili çalışmamızda HOST değerlerindeki pozitif durumun shilajitin yapısında bulunan lipid peroksidasyonu oluşumunu önleyici bileşenler ve yüksek antioksidan içeriğinden kaynaklandığı öngörülmektedir.

Akrozom bütünlüğü pozitif değerleri bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmiştir ( $P<0,001$ ). SH-0 (% 96,60), SH-1 (% 97,80), SH-2 (% 98,20), SH-3 (% 98,80) ve SH-4 (% 99,20) ortalama değerlerden anlaşılacağı üzere şuruba katılan shilajit miktarı artıkça akrozom bütünlüğü pozitif oranının da kademeli olarak arttığı gözlenmektedir (Tablo.7.1). Shilajit ilavesinin akrozom bütünlüğü yüzdesini çok önemli düzeyde arttırdığı görülmektedir ( $p<0,001$ ).

Bal arısı spermasıyla ilgili fazla yayın bulunamamakla beraber Alçay, vd., (2019) dondurulmuş spermada akrozom defekt üzerine yaptıkları çalışmada BSA eklenmiş TL-hepes bazlı sulandırıcının koruyucu etkileri incelenmiştir. Çalışmada en başarılı grup (%  $54,33\pm 3,71$ ) değerlerde olduğu görülmüştür. Çalışmamızda shilajitin akrozom bütünlüğünün korunmasında önemli derecede etkili olduğu görülmüştür. Kumar, vd., (2018) shilajitin manda sperması üzerine etkilerini değerlendirdikleri çalışmada mandalara oral olarak 2 ay shilajit sağaltımı uygulamış ve dondurulup çözdürülen spermada akrozom bütünlüğü sağaltım öncesi (%  $40,9\pm 0,72$ ), sağaltım zamanı çözdürülen spermada (%  $49,6\pm 1,51$ ) ve sağaltım sonrası çözdürülen spermada (%  $48,9\pm 0,60$ ) önemli bulunmuştur. Akrozom bütünlüğü ile ilgili yapılan çalışmalar shilajitin etkinliği konusunda çalışmamızla örtüşmektedir.

Bal arısı besinine farklı düzeylerde katılan shilajitin sperma TAS değeri üzerine etkileri Şekil 10.1 de verilmiştir. Veriler incelendiğinde grupların (SH-0, SH-1, SH-2, SH-3, SH-4) ortalama TAS değerleri sırasıyla 11,50, 4,50, 14,50, 14,50, 8,00 olarak tespit edildi. Sperma TAS değerleri SH-2 ve SH-3 gruplarının diğer çalışma gruplarına göre rakamsal olarak yüksek olması dikkat çekici bulunmuştur.

Shilajitin farklı düzeylerinin (0 mg, 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg) bal arısı besinine katılmasıyla ilgili çalışmada (SH-0, SH-1, SH-2, SH-3, SH-4) için TOS ölçüm değerleri sırasıyla 98,45, 87,69, 123,07, 110,76, 55,38 olup ölçüme ait bilgiler de Şekil.10.1'de verilmiştir. Rakamsal olarak SH-2 ve SH-3 değerlerinin diğer gruplara göre yüksek değerlerde olması dikkat çekici bulunmuştur.



Şekil 10.1. Çalışma gruplarında çözüm sonrası spermada TAS ve TOS parametreleri

Bal arısı spermasında TAS ve TOS ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. Antioksidanların sperma üzerine olumlu etkilerinin olduğu bilinmektedir. Taylor, vd., (2009) bal arısı sperması için farklı sulandırıcıların etkilerini değerlendirmişlerdir. Dondurularak saklanan ve çeşitli kriyoprotektan ajanların da etkisinin incelendiği çalışmada başarılı bulunan sulandırıcı 4 kontrol grubunda kullanılan Kiev solüsyonundan farklı olarak katalaz enzimi içermektedir. Ayrıca sulandırıcı 4 Kiev solüsyonunda bulunan glikozdan da yoksundur. Bu durumda olmasına rağmen diğer çalışma gruplarına oranla genel olarak başarılı bulunmasının sebebi oksidatif strese karşı güçlü bir antioksidan olan katalazın bulunması olarak ifade edilmiştir. Weirich, vd., (2002) yaptıkları çalışmada bal arılarında oksidatif strese karşı önemli savunma enzimleri olan süper oksit dismutaz, katalaz, glutyon S transferaz enzimlerinin kan ve çeşitli doku ve bölümlerindeki oranları karşılaştırılmış ve bal arısı spermasının yanı sıra spermatozoonda da katalaz etkileşim oranının olumlu olduğu vurgulanmıştır. Çalışmada kraliçe arıda spermatheka'daki glutyon S transferaz enziminin yanı sıra katalaz enzim seviyesinin çiftleşmemiş kraliçe arılar göre çiftleşmiş kraliçe arılarda daha yüksek oranlarda olduğunun görülmüştür. Süperoksid dismutaz enziminin daha çok seminal plazmada bulunduğu tespit edilmiştir. Abdelkader, vd., (2019) pestisitlerin erkek arılarda cinsel gelişim ve aktivitelerin olumsuz etkileri üzerine antioksidan reaksiyonunu belirlemek için yaptıkları çalışmada, seminal sıvıda süperoksid dismutaz ( $314 \pm 56,7 \text{ mUA} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ), katalaz spermatozoada ( $226,69 \pm 91 \text{ mU} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$ ), glutatyon peroksidaz spermatozoada ( $2,11 \pm 1,2 \text{ mU} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$ ) için

elde edilen değerler önemli bulunmuştur. Çalışma boyunca arılara verilen pestisit arı besini yoluyla verilmesi mevcut çalışmamızla örtüşmekte olup seminal sıvıda ve spermatozoada görülen antioksidan direncin anlaşılması açısından önemlidir. Ribou ve Reinhardt, (2012) yaptıkları insektlerde dişi böceklerde depo edilen spermanın ROS etkilerine karşı daha dirençli olduğu görülmüştür. Çalışmada spermanın uzun süre kraliçe arının spermathekasında kalabilmesinin önemi vurgulanmıştır.

Shilajit içerisinde selenyum ve çeşitli mineral maddeler, dibenzo-alfa pironların yanı sıra humus içeren humins, humik asit ve fulvik asit içerir. Shilajitin yapısında bulunan fulvik asit antioksidan ve antiinflatuar (yangı giderici) maddeler içerir (Carrasco-Gallardo, vd., 2012). Fulvik asitin spermatozoon membran yapısı ve akrozom bütünlüğünü koruduğu, motilite de artışa sebep olduğu görülmüştür. Ayrıca anaormal spermatozoon oranında ve malondialdehit seviyesinde azalmaya sebep olduğu vurgulanmıştır (Xiao, vd., 2018). Bhattacharya, vd., (1995) yaptığı çalışmada shilajitin nitrik oksit ve hidroksil radikallerinden kaynaklanan olumsuzluklara karşı pozitif etki gösterdiği görülmüştür. Biswas, vd., (2010) spermatozoa yoğunluğu düşük insan hastalar üzerinde yaptıkları çalışmada shilajitin hastaların önemli bir kısmında shilajitin önemli olumlu etkilerini görmüşlerdir. FSH ve LH ve testesteron miktarında önemli artışın yanı sıra, sperma hacmi, motilitesi ve yoğunluğunda da önemli oranda yükselme tespit etmişlerdir. Ayrıca oksidatif stres bakımından önemli olan MDA (malondialdehit) miktarındaki kayda değer azalma shilajitin oksidatif strese karşı bir başka pozitif etkisi olarak değerlendirilmiştir.

Mevcut çalışmada gruplar arasında özellikle motilite, HOST, akrozom bütünlüğü değerlerinin çok olumlu olmasına rağmen total antioksidan ve total oksidan seviyeleri bakımından önemli fark görülmemesinin sebebinin bal arısı spermasının kendine özgü yapısından kaynaklanan sağlıklı ölçüm sonucu vermemesi olduğu düşünülmektedir. Bal arısı spermasıyla ilgili total antioksidan ve total oksidan değerlerinin ölçümüyle ilgili çalışma bulunamaması da bu görüşü destekler niteliktedir.

## 11. SONUÇ

Bal arısı spermasının kısa ve uzun süreli saklanması konusunda birçok çalışma yapılmıştır. Bu amaçla farklı sulandırıcı oranları ve farklı kriyoprotektan ajanlar kullanılmaktadır. Bu çalışmaların ışığında bal arısı spermasının saklanmasında saklama sıcaklığın önemli olduğu belirlenmiştir. Bal arısı spermasının kısa ve uzun süre saklanmasıyla ilgili yapılan çalışmalarda memeli hayvanlarda elde edilen sonuçlar kadar başarılı sonuçlar elde edilememiştir. Ancak son zamanlarda bal arısı spermasının dondurulması üzerine ilerlemeler kayıt edilmiştir. Bu gelişmeler, ülkemiz ve dünya arıcılığının gelişmesi için umut olmaktadır. Bal arısı spermasının dondurulup uzun süre saklanabilmesi sayesinde yakın gelecekte tıpkı bazı memeli hayvanlarda olduğu gibi bölgesel tohumlama istasyonları kurulabilecektir. Bu sayede verim özelliklerini bildiğimiz kolonilerden alınan spermalar farklı bölgelerdeki bal arısı yetiştiricilerine gönderilebilecektir. Yapılan çalışmalar incelendiğinde bal arısı spermasının dondurularak uzun süreli saklanmasında uygun pH'nın alkali bir değer olması, spermanın yaşam süresini uzatacak nitelikte gerekli iyonların, minerallerin ve enzimleri içermesi gerektiği belirlenmiştir. Çalışmamızda, bal arısı spermasının uzun süreli saklanması üzerine pozitif etkisi olacağı düşünülen, antioksidan ve antienflamatuar özelliği bilinen shilajit maddesi kullanılmıştır. Çalışma sonucunda, shilajit maddesinin bal arısı besinine katılmasının, bal arısı spermasının uzun süreli saklanabilmesini sağladığı ve spermatolojik parametrelere (motilite, plazma membran bütünlüğü, akrozom bütünlüğü) olumlu etki ettiği gözlemlenmiştir. Çalışma sonuçları shilajit ile yapılan beslemenin bal arısı spermasında daha uzun süre saklama koşulları sağlayacağını ortaya koymaktadır. Bal arısı sperması üzerine, bu tür yapılacak çalışmalar ile daha uzun süreli saklanma koşullarının da iyileştirilebileceği hedeflenmektedir. Sonuç olarak shilajitin bal arısı spermasının uzun süreli saklanmasında gözle görünür avantajlarının olduğu özellikle motilite, HOST ve akrozom bütünlüğünün korunmasında önemli katkıda bulunduğu anlaşılmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Abdelkader, F. B., Kairo, G., Bonnet, M., Barbouche, N., Belzunces, L. P., Brunet, J. L. (2019). Effects of clothianidin on antioxidant enzyme activities and malondialdehyde level in honey bee drone semen. *Journal of Apicultural Research*. 58 (5). 740-745.
- Adam, G. A., Needham, S. A. (2018). *U.S. Patent No. 9,932,319*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Alçay., S, Üstüner., B, Çakmak., İ, Çakmak, S., Nur, Z. (2015). Effects of various cryoprotective agents on post-thaw drone semen quality. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 21 (1). 31-35.
- Alçay, S., Cakmak, S., Cakmak, I., Mülkpınar, E., Toker, M. B., Üstüner, B., Şen, H Nur, Z. (2019). Drone Semen Cryopreservation with Protein Supplemented TL-Hepes Based Extender. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 25 (4). 553-557.
- Ahmad, S., Duval, D. L., Weinhold, L. C., Pardini, R. S. (1991). Cabbage looper antioxidant enzymes: tissue specificity. *Insect Biochemistry*. 21(5). 563-572.
- Agarwal, S. P., Khanna, R., Karmarkar, R., Anwer, M. K., Khar, R. K. (2007). Shilajit: a review. *Phytotherapy Research*. 21(5). 401-405.
- Aitken, R. J., Baker, M. A. (2006). Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 250 (1-2). 66-69.
- Almeida, R., Espencer, E. S. A. (2002). Usage of green coconut water and different tissue culture media for in vitro honey bee semen storage (apis mellifera; hymenoptera: apoidea). *Interciencia*. 27(6). 317-321.
- Alvarez, J. G., & Storey, B. T. (1995). Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Molecular reproduction and development*, 42(3), 334-346.
- Andraszek K, Smalec E. (2011). The use of silver nitrate for the identification of spermatozoon structure in selected mammals. *Canadian Journal of Animal Science*. 91 (2), 239-246.
- Bahçivan, C., Sögüt, İ., Hürdağ, C., Çikler-Dülger, E. (2018). Kronik sudan kaçınma stresi ile testis dokusunda oluşturulan hasarı üzerine fulvik asidin tedavi edici etkisinin araştırılması. *Bozok Tıp Dergisi*. 8(4). 60-68.
- Bhattacharya, S. K., Sen, A. P., Ghosal, S. (1995). Effects of shilajit on biogenic free radicals. *Phytotherapy Research*. 9 (1). 56-59.
- Biswas, T. K., Pandit, S., Mondal, S., Biswas, S. K., Jana, U., Ghosh, T., Tripathi, P.C; Debnath, P.K; Auddy, R.G; Auddy, B. (2010). Clinical evaluation of spermatogenic activity of processed Shilajit in oligospermia. *Andrologia*, 42(1), 48-56.
- Carrasco-Gallardo, C., Guzmán, L., Maccioni, R. B. (2012). Shilajit: a natural phytocomplex with potential procognitive activity. *International Journal of Alzheimer's disease*.
- Cobey, Susan W. (2007). Comparison studies of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee queens and factors affecting their performance. *Apidologie*. 38 (4). 390-410.
- Cobey, S. W., Tarpy, D. R., Woyke, J. (2013). Standard methods for instrumental insemination of Apis mellifera queens. *Journal of Apicultural Research*. 52 (4). 1-18.
- Collins, A. M. (2000a). Relationship between semen quality and performance of instrumentally inseminated honey bee queens. *Apidologie*. 31 (3), 421-429.

- Collins, A. M. (2000b). Survival of honey bee (Hymenoptera: Apidae) spermatozoa stored at above-freezing temperatures. *Journal of Economic Entomology*. 93 (3). 568-571.
- Collins A. M. (2003). A scientific note on the effect of centrifugation on pooled honey bee semen. *Apidologie*. 34 (5). 469-470.
- Collins, A. M., Caperna, T. J., Williams, V., Garrett, W. M., Evans, J. D. (2006). Proteomic analyses of male contributions to honey bee sperm storage and mating. *Insect Molecular Biology*. 15. 541-549.
- Colonello-Frattini, N. A., Hartfelder, K. (2009). Differential gene expression profiling in mucus glands of honey bee (*Apis mellifera*) drones during sexual maturation. *Apidologie*. 40 (4). 481-495.
- Colonello N. A, Hartfelder, K. (2003). Protein content and pattern during mucus gland maturation and its ecdysteroid control in honey bee drones. *Apidologie*. 34. 257-267.
- Dadkhah, F., Nehzati-Paghaleh, G., Zhandi, M., Emamverdi, M., Hopkins, B. K. (2016). Preservation of honey bee spermatozoa using egg yolk and soybean lecithin-based semen extenders and a modified cryopreservation protocol. *Journal of Apicultural Research*. 55 (4). 279-283.
- Danka, R. G., Rinderer, T. E., Hellmich, R. L., Collins, A. M. (1986). Foraging population sizes of africanized and european honey bee (*Apis mellifera* L.) Colonies. *Apidologie*. 17(3), 193-202.
- Den Boer S. P, Boomsma J. J, Baer, B. (2009). Honey bee males and queens use glandular secretions to enhance sperm viability before and after storage. *Journal of Insect Physiology*. 55 (6). 538-543.
- Genç, F., Dodoloğlu, A. (2002). Arıcılığın Temel Esasları. Atatürk Üniv. Zir.Fak Yay. No: 166, Atatürk Üniv. Basımevi, Erzurum.
- Ghosal, S. (1990). Chemistry of shilajit, an immunomodulatory Ayurvedic rasayan. *Pure and Applied Chemistry*. 62 (7). 1285-1288.
- Ghosal, S. (2002). *U.S. Patent No. 6,440,436*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Giray, T., Robinson, G. E. (1996). Common endocrine and genetic mechanisms of behavioral development in male and worker honey bees and the evolution of division of labor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93 (21). 11718-11722.
- Gontarz, A., Banaszewska, D., Gryzinska, M., Andraszek, K. (2016). Differences in drone sperm morphometry and activity at the beginning and end of the season. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 40 (5). 598-602.
- Gorshkov, V., Blenau, W., Koeniger, G., Römpf, A., Vilcinskas, A., Spengler, B. (2015). Protein and peptide composition of male accessory glands of *Apis mellifera* drones investigated by mass spectrometry. *PloS one*. 10 (5). e0125068.
- Griveau, J. F., Dumont, E., Renard, P., Callegari, J. P., Le Lannou, D. (1995). Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *Reproduction*, 103 (1). 17-26.
- Harbo, J. R. (1979). Storage of honey bee spermatozoa at -196°C. *Journal of Apicultural Research*. 18 (1). 57-63.
- Harbo, J. R. (1981) Viability of honey bee eggs from progeny of frozen spermatozoa, *J. Apic. Res.*, 74. 482-486.
- Harbo, J. R. (1985). Instrumental insemination of queen bees. *The American bee journal (USA)*. 282-287.

- Harbo, J. R. (1986). Sterility in honey bees caused by dimethyl sulfoxide. *J. Hered.* 77. 129–130.
- Harbo, J. R., Williams, J. L. (1987). Effect of above-freezing temperatures on temporary storage of honey bee spermatozoa. *J. Apic. Res.* 26. 53-55.
- Hopkins, B. K., Herr, C. (2010). Factors affecting the successful cryopreservation of honey bee (*Apis mellifera*) spermatozoa. *Apidologie.* 41.548 –56
- Hopkins, B. K., Herr, C., Sheppard, W. S. (2012). Sequential generations of honey bee (*Apis mellifera*) queens produced using cryopreserved semen. *Reproduction, Fertility and Development.* 24 (8). 1079-1083.
- Idrees, M., Ahmad, M., Gul, S. T., Ahmad, I., Sallam, M. A., Zubair, M. (2016). Effects of asphaltum (shilajit) combined with vitamin E and selenium on the reproductive parameters of female rabbits. *Pakistan Veterinary Journal.* 36 (1). 31-34.
- King, M., Eubel, H., Millar, A. H., Baer, B. (2011). Proteins within the seminal fluid are crucial to keep sperm viable in the honey bee *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology.* 57 (3). 409-414.
- Koeniger, G. (1986). Mating sign and multiple mating. *Bee World.* 67. 141-150.
- Koeniger, G., Wissel, M., Herth, W. (1990). Cornual secretion on the endophallus of the honey bee drone (*Apis mellifera* L.). *Apidologie.* 21 (3). 185-191.
- Koeniger, N., Koeniger, G. (2000). Reproductive isolation among species of the genus. *Apis Apidologie.* 31. 313-339.
- Kondracki, S., Wysokińska, A., Iwanina, M., Banaszewska, D., Sitarz, D. (2011). Effect of sperm concentration in an ejaculate on morphometric traits of spermatozoa in Duroc boars. *Polish journal of veterinary Sciences.* 14 (1). 35-40.
- Kreuter, J., Shamenkov, D., Petrov, V., Range, P., Cychutek, K., Koch-Brandt, C., Alyautdin, R. (2002). Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier. *Journal of drug targeting.* 10 (4). 317-325.
- Laidlaw, H. H. (1979). Contemporary queen rearing, Dadant and Sons Inc., Journal Printing Co., Carthage, Illinois, USA.
- Liu, Z., Liu, F., Li, G., Chi, X., Wang, Y., Wang, H., Ma, L., Han, K., Zhao, G., Guo, X., Xu, B. (2020). Metabolite Support of Long-Term Storage of Sperm in the Spermatheca of Honeybee (*Apis mellifera*) Queens. *Frontiers in Physiology.* 11. 1303.
- Mackensen, O., Tucker, K. W. (1970). Instrumental insemination of queen bees (No. 390). US Agricultural Research Service.
- Mishra, R. K., Jain, A., Singh, S. K. (2018). Profertility effects of Shilajit on cadmium-induced infertility in male mice. *Andrologia.* 50 (8). e13064.
- Moors, L., Spaas, O., Koeniger, G. (2005). Morphological and ultra structural changes in the mucus glands of *Apis mellifera* drones during pupal development and sexual maturation. *Apidologie,* 36. 245-254.
- Moritz, R. F. A. (1984). The effect of different diluents on insemination success in the honeybee using mixed semen. *J. Apic. Res.* 23 (3). 164–167.
- Moritz, R. F. A. (1989). The Instrumental Insemination of the Queen Bee, *Apimondia,* Romania.
- Nur, Z., Cakmak, S., Ustuner, B., Cakmak, I., Erturk, M., Abramson, C., Sagirkaya, H., Soylu, M. K. (2012). The use of hypo-osmotic swelling test, water test, and supravital staining in the evaluation of drone sperm. *Apidologie.* 43. 31-38.

- Paillard, M., Rousseau, A., Giovenazzo, P., Bailey, J. L. (2017). Preservation of domesticated honey bee (Hymenoptera: Apidae) drone semen. *Journal of economic entomology*. 110 (4). 1412-1418.
- Pandit, S., Biswas, S., Jana, U., De, R. K., Mukhopadhyay, S. C., Biswas, T. K. (2016). Clinical evaluation of purified Shilajit on testosterone levels in healthy volunteers. *Andrologia*. 48 (5). 570-575.
- Park, J. S., Kim, G. Y., Han, K. (2006). The spermatogenic and ovogenic effects of chronically administered Shilajit to rats. *Journal of ethnopharmacology*. 107 (3). 349-353.
- Peng, Y. S., Locke, S. J., Nasr, M. E., Liu, T. P., Montague, M. A. (1990). Differential staining for live and dead sperm of honey bees. *Physiological Entomology*. 15(2). 211-217.
- Petruska, P., Capcarova, M., Sutovsky, P. (2014). Antioxidant supplementation and purification of semen for improved artificial insemination in livestock species. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 38 (6). 643-652.
- Phiancharoen, M., Wongsiri, S., Koeniger, N., Koeniger, G. (2004) Instrumental insemination of *Apis mellifera* queens with hetero- and conspecific spermatozoa: results in different sperm survival. *Apidologie*. 35. 503–511.
- Rajamohan, A., Danka, R. G., Hopkins, B. K., Rinehart, J. P. (2020). A non-activating diluent to prolong in vitro viability of *Apis mellifera* spermatozoa: Effects on cryopreservation and on egg fertilization. *Cryobiology*. 92, 124-129.
- Rhodes J. (2002) Drone honey bees: rearing and maintenance. *Agnote DAI* 112.
- Ribou, A. C., Reinhardt, K. (2012). Reduced metabolic rate and oxygen radicals production in stored insect sperm. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1736), 2196-2203.
- Rousseau, A., Giovenazzo, P. (2016). Optimizing drone fertility with spring nutritional supplements to honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies. *Journal of economic Entomology*. 109 (3). 1009-1014.
- Stohs, S. J. (2014). Safety and efficacy of shilajit (mumie, moomiyo). *Phytotherapy Research*. 28 (4). 475-479.
- Sultan, J., Awan, M. A., Rakha, B. A., Waqar, S. A., Ansari, M. S., Naz, S., Lqubal, S., Akhter, S. (2021). Asphaltum Improves the Post-thaw Quality and Antioxidant Status of Nili Ravi Buffalo Bull Sperm. *Biopreservation and Biobanking*.
- Suwannapong, G., Benbow, M. E., Nieh, J. C. (2012). Natural history and threats. In *Bees: Biology, Threats and Colonies*; Nova Science: Hauppauge, NY, USA, 2012.
- Taylor MA, Guzmán-Nova E, Morfin N, Buhr M. M. Improving viability of cryopreserved honey bee (*Apis mellifera* L.) sperm with selected diluents, cryoprotectants, and semen dilution ratios. *Theriogenology*, 2009; 72: 149e59.
- Tekin N. Spermanın muayenesi ve değerlendirilmesi. *Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Sun'ı Tohumlama, Doğum ve İnfertilite* (Alaçam A, ed.). Dizgievi, Konya, Turkey. 67-79. 1994.
- Tozetto, S.O., Rachinsky, A. Engels, W. (1997). Juvenile hormone promotes flight activity in drones (*Apis mellifera carnica*). *Apidologie*. 28. 77-84.
- Tremellen, K. (2008). Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. *Human reproduction update*. 14 (3). 243-258.
- Tripathi, Y. B., Shukla, S., Chaurasia, S., Chaturvedi, S. (1996). Antilipid peroxidative property of Shilajit. *Phytotherapy Research*, 10 (3), 269-270.

- Uygur, Ş. Ö. (2004). Bal Arılarında (*Apis mellifera* L.) Yapay Tohumlama. *Hayvansal Üretim*. 45 (2).
- Van Praagh, J. P., Ribí, W., Wehrhahnd, C., Wittmann, D. (1980). Drones fixate the queen with the dorsal frontal part of their compound eyes. *J. Comp. Physiol.* 136. 263-266.
- Vallet, A. M., Coles, J. A. (1993). The perception of small objects by the drone honeybee. *J. Comp. Physiol. A*. 172. 183-188.
- Vatansever, H. (2004). Arı Yetiştiriciliği ve Hastalıkları, Yeni Zamanlar Dağıtım, Ankara.
- Wegener, J., Bienefeld, K. (2012). Toxicity of cryoprotectants to honey bee semen and queens. *Theriogenology*. 77 (3). 600-607.
- Wegener, J., May, T., Knollmann, U., Kamp, G., Müller, K., Bienefeld, K. (2012). In vivo validation of in vitro quality tests for cryopreserved honey bee semen. *Cryobiology*. 65 (2). 126-131.
- Wegener, J., May, T., Kamp, G., & Bienefeld, K. (2014). New methods and media for the centrifugation of honey bee (Hymenoptera: Apidae) drone semen. *Journal of economic Entomology*. 107 (1). 47-53.
- Weirich, G. F., Collins, A. M., Williams, V. P. (2002). Antioxidant enzymes in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*. 33 (1). 3-14.
- Weiss, K., Vergara, C. H. (2002). The little book of bees. Springer Science & Business Media.
- Woyke, J. (1955). Multiple mating of the honeybee queen (*Apis mellifera* L.) in one nuptial flight. *Bull. Acad. Pol. Sei.* 3 (5). 175-180.
- Woyke, J., Ruttner, F. (1958). An anatomical study of the mating process in the honeybee. *Bee World*. 39. 3-18.
- Woyke, J. (2008). Why the eversion of the endophallus of honey bee drone stops at the partly everted stage and significance of this. *Apidologie*. 39 (6). 627-636.
- Woyke, J. (2011). The mating sign of queen bees originates from two drones and the process of multiple mating in honey bees. *J. Apic. Res.* 50. 272-283.
- Xiao, Y., Wu, Z., Wang, M. (2018). Effects of fulvic acids on goat sperm. *Zygote*. 26 (3). 220-223.
- Yániz, J., Palacín, I., Santolaria, P. (2019). Effect of chamber characteristics, incubation, and diluent on motility of honey bee (*Apis mellifera*) drone sperm. *Apidologie*. 50 (4). 472-481.
- Yu, X., Wu, Z., Wang, M. (2018). Effects of fulvic acids on goat sperm. *Zygote*, 26 (3). 220-223.

## ÖZ GEÇMİŞ

Arda Onur ÖZKÖK, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 2003 yılında mezun oldu. 2004-2014 yılları arasında özel Veteriner Kliniği işleten Özkök, 2014 yılında Amasya Üniversitesinde akademik kariyerine başladı. 2016 yılında OMÜ LEE Doktora programına girdi. Mezuniyetinden bu yana Veteriner Hekimliğin çeşitli alanlarında görev yapan Arda Onur ÖZKÖK, orta derecede İngilizce bilmektedir. Temel ilgi alanları reproduksiyon, biyoteknoloji, androloji, bal arısı yetiştiriciliği ve bal arılarında suni tohumlamadır.

### **Sertifikalar:**

- 1. Büyükbaş Hayvanlarda Suni Tohumlama(Ankara Üniversitesi),**
- 2. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Ana Arı Yetiştiriciliği (Düzce Üniversitesi),**
- 3. Bal Arısı Yapay Tohumlama Kursu (ODTÜ),**
- 4. Kanatlı Kesimhanelerinde HACCP Belgesi(Ankara Veteriner Hekimler Odası),**
- 5. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası (ANKÜSEM)**
- 6. Ayak ve Tırnak Hastalıklarına Güncel Yaklaşımlar (VETA-D)**
- 7. Röntgen Çekim Prensipleri ve Röntgen Filmi Yorumlama (VETA-D)**