

Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) Spermlerinin Kısa Süre Saklanması Üzerine Bir Araştırma*

Mehmet Ali Canyurt¹, Süleyman Akhan², Çiğdem Takma³

¹Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Bölümü, 35100, Bornova, İzmir, Türkiye.

²Karadeniz Teknik Üniversitesi, Rize Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Bölümü, 53100, Rize, Türkiye.

³Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Hayvan Üretim Bölümü, 35100, Bornova, İzmir, Türkiye.

Abstract: A study on short-term storage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) milt. Rainbow trout sperm was diluted with an artificial seminal plasma (ASP; 1.6 mM CaCl₂, 120 mM NaCl, 30 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM NaHCO₃, pH 8) and stored in a refrigerator at +4°C for 14 days in humid conditions. The stored semen was tested on the day 7 and the day 14 for the fertilization rates and the motility. The best results in fertilization rates (71.6±7.6%) and motility (73.8±6.99%) were obtained from the samples diluted with artificial seminal plasma (ASP) with the rate of 1:1 and stored for 7 days.

Key Words: Rainbow trout, sperm, storage, duration of activity, motility, fertilization ability.

Özet: Erkek gökkuşığı alabalıklarından sağım yoluyla alınan süt, suni seminal plazma (SSP; 1.6 mM CaCl₂, 120 mM NaCl, 30 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM NaHCO₃, pH 8) ile 1:1 ve 1:2 oranında sulandırılarak açılıp kapatılabilen nemli kaplar içerisinde, buzdolabında +4°C'de 14 gün süre ile muhafaza edilmiştir. Denemede kullanılan spermatozoidlerin aktivitesi ve dölleme oranları denemenin 7. ve 14. günlerinde incelenmiştir. En iyi sonuçlar 7. günde suni seminal plazma (SSP) ile 1:1 oranında seyreltilen örneklerden elde edilmiştir (Dölleme oranı %71.6±7.6 ve motilite %73.8±6.99).

Anahtar Kelimeler: Gökkuşığı alabalığı, sperma, muhafaza, hareket süresi, motilite, dölleme yeteneği.

Giriş

Yetiştiriciliği yapılan alabalıkların üreme dönemi çevresel şartlara bağlı olarak Kasım-Mart ayları arasında gerçekleşmektedir. Ancak birçok işletmede dişi ve erkek damızlıklar arasında, üreme döneminde görülen senkronizasyon bozukluğu nedeni ile bazen dişilerden yumurta alındığı halde erkek bireylerden süt alınamamakta veya bunun tersi olmaktadır. Bu durumda üretici, dişilerden yumurta sağımı yaptığında erkek anaçlar sperma vermediği için sağılan yumurtayı dölleyememekte ve yumurtalar ziyan olmakta veya erkekler olgunlaştığı halde dişilerden yumurta

alınmadığında ise sperma kaybı söz konusu olmaktadır. Bu da üreticilerin, ekonomik kayıplara uğramasına yol açmaktadır.

Balık spermasının başarılı bir şekilde muhafaza edilmesi su ürünleri yetiştiriciliğinde önemli avantajlar sağlamaktadır. Örneğin: maliyeti oldukça yüksek olan mevsim dışı yumurtlatma tekniğinde anaç sayısını dişi anaçlarla sınırlandırmaktadır (Bromage, 1995). Sperma muhafazası sayesinde gamet transferi daha rahatlıkla gerçekleştirilebilmektedir. Üstün verime sahip hatlara ait spermelerin başka işletmelere nakledilmesi veya yabancı formlara ait genlerin kuluçkahane

*Bu araştırma Ege Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 2001/SÜF/009 no'lu proje kapsamında desteklenmiştir.

stoklarına aktarımında muhafaza teknikleri kullanılmaktadır (Cloud ve diğ., 1990). Damızlık alabalıkta testislerde gelişen sperma ilerleyen zaman içerisinde kullanılmadığı takdirde yaşlanarak kalitesi düşmektedir. Muhafaza sayesinde spermanın yaşlanmasını önlemek ve kalitesini üst düzeyde tutmak mümkündür (Rana, 1995). Deneysel çalışmalarda, genetik ve ıslah çalışmalarında yıl boyu ihtiyaç duyulan sperma muhafaza teknikleri sayesinde sağlanabilmektedir (Suquet ve diğ., 2000).

Brofeldt'in 1914 yılında alabalık spermasının soğuk ortamda daha uzun yaşadığını keşfetmesinden sonra, sperm biyolojisinin daha iyi anlaşılmasıyla iki değişik muhafaza tekniği geliştirilmiştir (Büyükhatipoğlu ve Holtz, 1978). Bu tekniklerden birincisi spermanın 1 ila 9°C'de kısa süreli muhafazası (soğuk muhafaza), diğeri derin dondurucu veya sıvı azot içerisinde 0°C ile -196°C arasında uzun süreli muhafaza tekniğidir (Karyoprezervasyon). Değişik balık türlerinde yapılan çalışmalarda balık sperması, farklı suni plazmalar farklı seyreltme oranlarında kullanılarak veya herhangi bir seyreltici kullanılmadan, değişik gaz atmosferleri eşliğinde, kısa süreli saklama yöntemiyle 7-34 gün (Balık, 1978; Büyükhatipoğlu ve Holtz, 1978; Stoss ve Holtz, 1983; Stoss ve Refstie, 1983; Moore, 1987; Ohta ve Izawa, 1996; Ohta ve diğ., 2000; Bencic ve diğ., 2000) uzun süreli saklama yöntemiyle 365 güne kadar (Moczarski, 1976; Moczarski ve Koldars, 1976; Gupta ve Rath, 1991 ve 1993; Gupta ve diğ., 1995) canlılıklarını ve döleme kabiliyetlerini koruduğu bildirilmiştir.

Bu çalışmada üreme döneminde özel bir işletmedeki erkek damızlıklardan sağılan sperma, gökkuşağı alabalığı spermasının kısa süreli muhafazası konusunda yapılan çalışmalarda daha önce kullanılmayan, izotonik bir çözelti ile seyreltilip belirli sürelerle saklanarak sperm kalitesinin muhafazası incelenmiştir.

Materyal ve Yöntem

Araştırmada, Denizli ilinde bulunan Özpekler Su Ürünleri Ltd. Şti.'ne ait alabalık işletmesindeki 500–1200 g canlı ağırlığa sahip erkek damızlık alabalıklar kullanılmıştır. Olgunlaşmış ve sağlıklı erkek bireyler 2-fenoksietanol ile bayılarak sağım için genital bölge kuru ve temiz bir bezle iyice silinip temizlendikten sonra sperma, buzda soğutulmuş 100 ml'lik temiz beherlere sağılmıştır. Sağım sırasında spermanın temiz olması için muhtemel idrar, dışkı, kan ve doku parçalarının behere girmemesine dikkat edildi. Bunun için balığın anal bölgesi kuru ve temiz bir bezle silindi, genital kanaldan ilk çıkan dışkı az yoğun süt kullanılmadı. Cam beherlere sağılan spermalar buz üzerinde tutulmuş, asgari 2 saat içerisinde işleme tabi tutulmuştur. Alınan sperma örneklerinde hareket süresi, motilite testi ve 1 ml'deki spermatozoid sayısı belirlenerek en iyi kaliteye sahip 10 erkeğin sperması denemelerde kullanılmıştır. Muhafaza için 1 ml sperma 1:1 ve 1:2 oranlarında suni seminal plazma (SSP; 1.6 mM CaCl₂, 120 mM NaCl, 30 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM NaHCO₃, pH 8) ile seyreltilerek petri kaplarına yerleştirilmiştir. Daha sonra bu petri kapları tabanı su ile doldurulmuş, açılıp kapanabilen plastik torbalar içerisine konularak, içine saf oksijen verildikten sonra +4°C deki soğutucuya yerleştirilmiştir. Hazırlanan seyreltilmiş ve seyreltilmemiş örneklere 14 gün boyunca her gün taze O₂ verilmiştir. Deneyin başlangıcından sonraki 7. ve 14. günlerde tüm örneklerde hareket süresi motilite ve döleme yetenekleri ölçülmüştür. Birim hacimde bulunan spermatozoid sayısı Konuk (1975)'un hücre sayım tekniği kullanılarak belirlenmiştir. Bu yöntem gere, her örnekten 25 µl sperm 1225 µl SSP ile 1:50 oranında sulandırılarak x400 büyütmede mikroskop altında Thoma lamı kullanılarak spermatozoidler sayılmıştır.

Spermin motilitesini belirlemek için Tvedt ve diğ., (2001) tarafından geliştirilen yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemde göre 10 µl sperma 1 ml SSP ile sulandırılmış ve sonra bu seyreltilmiş örnekten, bir damla Bovin Serum Albumin (BSA) kaplanmış mikroskop lamı üzerine yerleştirilmiştir. Daha sonra 25 µl işletme suyu ile aktive edilen spermada x400 büyütmede, tesadüfi mikroskopik alandaki ileriye doğru hareket eden spermatozoid sayısı aktif (Motil) kabul edilmiş ve sayılarak % olarak kaydedilmiştir. Her örnek için iki paralel yapılarak ortalaması alınmıştır.

Spermanın dölleme kabiliyetini belirlemek için kontrol grubu 1 ml taze sperm ile döllendi. Deneme gruplarında ise seyreltilmiş sütün tamamı kullanılarak, dört farklı balıktan sağılarak karıştırılan yumurtalardan 500 adeti, kuru dölleme yöntemine göre döllendi. Döllenen yumurtalar 8 eşit bölmeye ayrılan tavalara yerleştirildikten sonra dikey kuluçka dolaplarında yumurtalar gözleninceye kadar tutulmuştur. Yumurtalar 19. günde gözlendikten sonra ölü yumurtalar sayılarak gözlenmiş yumurta sayısı belirlenmiş ve döllenmiş yumurta sayısının toplam yumurta sayısına oranı, dölleme oranı olarak kabul edilmiştir. Her döllemeden önce buz üzerinde tutulan sperma örneklerinin hareket süreleri, motiliteleri ve 1 ml'deki spermatozoa sayısı belirlendi. Tüm dölleme çalışmalarında, spermatozoa/yumurta sayısı oranı 2.06×10^4 ile 1.68×10^4 arasında değişim gösterecek şekilde ayarlanmıştır.

Araştırmadan elde edilen bulgular için varyans analizi, SAS (1985) istatistik paket programı kullanılarak, en küçük kareler (E.K.K.) metoduna göre yapılmıştır. Ortalamaların karşılaştırılmasında ise Duncan çoklu karşılaştırma testi (1955) kullanılmıştır.

Bulgular

Bu çalışmada elde edilen verilerden

yapılan varyans analizine göre, farklı gün ve dilüsyon seviyelerinin spermelerde hareket, motilite ve dölleme üzerine tek başına etkili ($P < 0.01$), interaksiyonunun ise yalnızca motilite üzerine etkili olduğu belirlenmiştir ($P < 0.05$).

Çalışmanın başlangıcında deney için ayrılan spermelerde ortalama hareket süresi 50.5 ± 8.4 saniye olarak kaydedilmiştir. Bir hafta sonra (7. gün) hareket süresi 1:1 oranında seyreltilen örneklerde 41 ± 4.79 saniye, 1:2 oranında seyreltilen örneklerde 32 ± 4.79 saniye olarak belirlenmiştir (Tablo 1). İki hafta buzdolabında muhafaza edilen spermelerde hareket süreleri oldukça düşük bulunmuştur. SSP ile 1:1 ve 1:2 oranında seyreltilen spermelerin hareket süresi, sırasıyla 19.2 ± 4.8 saniye ve 23 ± 4.8 saniye olarak bulunmuştur. Kontrol için sağılan taze spermde ise hareket süresi 48.33 ± 6.19 saniye olarak tespit edilmiştir.

SSP ile 1:1 oranında seyreltilen spermada bir hafta sonra kaydedilen motilite oranları kontrol grubu ve başlangıçta kaydedilen motilite oranı ile farkı istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (Tablo 2). Bir hafta süre ile buzdolabında muhafaza edilen spermelerde hareketli spermatozoa oranları 1:1'de 73.8 ± 6.99 , 1:2'de 55 ± 6.98 ve kontrol grubunda 82.67 ± 9.02 olarak bulunmuştur. İki hafta sonunda sperm motilitesi SSP ile 1:1 oranında seyreltilen spermada 23.4 ± 6.98 , 1:2 oranında seyreltilen spermada 30.4 ± 6.99 olarak kaydedilmiştir.

SSP ile 1:1 ve 1:2 oranında seyreltilerek buzdolabında 7 gün tutulan spermelerin taze sağılmış yumurtaları dölleme oranları 71.6 ± 7.6 ve 49.8 ± 7.6 olarak tahmin edilmiştir. 14 gün sonunda ise, 1:1 oranında seyreltilen örneklerde 30.4 ± 7.6 , 1:2'de 31.8 ± 7.6 ve kontrol grubunda 86.67 ± 9.82 bulunmuştur (Tablo 3). Sadece 14 gün muhafaza edilen spermelerde SSP ile seyreltme oranlarına göre farklılık önemli bulunmamıştır.

Tablo 1. Yeni sağılmış ve belirli süre muhafaza edilen spermelerde 7. ve 14. günlerde kaydedilen hareket süreleri (Ortalama ve standart hata).

Saklama süresi	Seyreltme oranı	N	Hareket süresi (sn)
7 gün	1:1	5	41.00±4.79 ^{ab}
	1:2	5	32.00±4.79 ^{bc}
	Kontrol (Taze)	3	50.00±6.19 ^a
14 gün	1:1	5	19.20±4.80 ^c
	1:2	5	23.00±4.80 ^c
	Kontrol (Taze)	3	48.33±6.19 ^a

a,b,c,d: Aynı sütündeki farklı harfler ortalamalar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir ($P<0.05$).

Tablo 2. Taze sağılan ve muhafaza edilen spermelerde kaydedilen motilite oranları (%) (Ortalama ve standart hata).

Saklama Süresi	Seyreltme oranı	N	Motilite (%)
7 gün	1:1	5	73.80 ± 6.99 ^a
	1:2	5	55.00 ± 6.98 ^c
	Kontrol (Taze)	3	80.02 ± 9.02 ^a
14 gün	1:1	5	23.40 ± 6.98 ^b
	1:2	5	30.40 ± 6.99 ^b
	Kontrol (Taze)	3	82.67 ± 9.02 ^a

a,b,c: Aynı sütündeki farklı harfler ortalamalar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir ($P<0.05$).

Tablo 3. Muhafaza edilen ve taze sağılan spermelerde 7. ve 14. günlerde kaydedilen dölleme oranları (%) (Ortalama ve standart hata).

Saklama süresi	Seyreltme oranı	N	Dölleme oranı (%)
7 gün	1:1	5	71.60 ± 7.60 ^a
	1:2	5	49.80 ± 7.60 ^b
	Kontrol (Taze)	3	84.67 ± 9.82 ^a
14 gün	1:1	5	30.40 ± 7.60 ^b
	1:2	5	31.80 ± 7.60 ^b
	Kontrol (Taze)	3	86.67 ± 9.82 ^a

a,b: Aynı sütündeki farklı harfler ortalamalar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir ($P<0.05$).

Tartışma ve Sonuç

Çalışmada alabalık sperması izotonik SSP (1.6 mM CaCl₂, 120 mM NaCl, 30 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM NaHCO₃, pH 8) ile 1:1 ve 1:2 oranlarında seyreltilerek buz dolabında +4°C'de 14 gün muhafaza edilmiştir. Bu sürenin sonunda spermde kalite kriterlerini oluşturan aktivite süresi, motilite ve dölleme yeteneği incelenerek kontrol olarak kullanılan taze sperm ile karşılaştırılmıştır.

Günümüze kadar balık spermalarının muhafaza edilmesi konusunda değişik balık türleri üzerinde birçok araştırma yapılmıştır. Bu araştırma sonuçlarından balık spermalarının muhafazası konusunda önemli başarılar kaydedildiği anlaşılmaktadır. Brodfeld tarafından 1914 yılında alabalık spermasının serin ortamda tutulduğunda daha uzun süre canlılığını koruduğu keşfedilmiştir (Büyükhatipoğlu ve Holtz, 1978). Bu keşiften sonra, sperm biyolojisinin ve seminal plazma içeriğinin

de öğrenilmesiyle spermanın muhafazası için yapay seminal plazmalar geliştirilmiştir. Bu seyrelticiler NaCl, üre ilave edilmiş NaCl solusyonu ve seminal plazma kompozisyonunu taklit eden solüsyonlardır (Scott ve Baynes, 1980; Stoss, 1983; Van Heerden ve diğ., 1993; Ohta ve Izawa, 1996; Ohta ve diğ., 2000). Bu solüsyonların en önemli özelliği, spermleri stimüle etmemeleri ve onların enerjisini koruyarak daha uzun yaşamalarını sağlamalarıdır. Spermler testiste hareketsiz olarak bekler. Testislerden çıktıktan sonra ozmotik basınç farkından dolayı harekete geçerler (Stoss, 1983).

Balık spermasının kısa süreli saklanması konusunda çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Bu araştırmalarda, seçilmiş erkek damızlıklardan sperma alınarak açılır-kapanır nemli kaplar içerisinde, üzerine saf oksijen veya hava ilave edilerek 0-9°C'de muhafaza edilmiştir. Balık (1978) yaptığı araştırmada, gökkuşağı alabalığı spermasının 1°C'de 10 gün, 6°C'de 13 gün ve 10°C'de 10 gün yaşabildiğini bildirmiştir. Büyükhatipoğlu ve Holtz (1978) gökkuşağı alabalığı spermasını özel olarak hazırlanan izotonik plazma ile 1:1, 1:16 oranlarında sulandırarak 4°C'de 15 gün muhafaza etmiştir. Araştırma sonuçları 4°C'de tutulan semenin 15 gün sonunda %80.6 dölleme yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir. Yine aynı araştırmada hava, oksijen ve azotun saklama süresine etkisi de incelenmiş ve en iyi sonucun oksijenle alındığı bildirilmiştir. Stoss ve Refstie (1983), Atlantik som balığı (*Salmo salar*)'ndan aldıkları spermayı 0°C'de 28 gün tutarak muhafaza etmeyi denemişlerdir. Bu araştırma sonuçları som balığı spermasının 10 gün süre ile kalitesini kaybetmeden muhafaza edilebileceğini göstermektedir. Diğer bir çalışmada ise sudak (*Stizostedion vitreum vitreum*) sperması antibiyotik ilaveli sulandırıcılarla 14 gün süreyle buzdolabında muhafaza edilmiş ve 14.

günde dölleme oranını %95.2 olarak bildirmiştir (Moore, 1987).

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar yukarıda belirtilen sonuçlarla kıyaslandığında, dölleme oranlarının oldukça düşük olduğu görülmektedir. Dölleme oranı ve motilite oranlarında kaydedilen sonuçların diğer araştırmacıların sonuçlarına göre düşük bulunması, araştırmalarda kullanılan SSP içeriklerinin farklılığından veya kullanılan damızlıkların kalitesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Araştırmada dölleme oranları açısından en iyi sonuç SSP ile 1:1 oranında seyreltilmiş örneklerde 7. günde %71 olarak elde edilmiştir. Diğer seyreltme oranlarında zamana bağlı olarak sperm kalitesinin düştüğü gözlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar, muhafaza edilen gökkuşağı alabalığı spermasında, hareket süresi, motilite ve dölleme yeteneği gibi sperm kalite kriterlerinin zamana bağlı olarak düştüğünü ortaya koymuştur.

Kaynakça

- Balık, S. 1978. A study on preservation of sperm of Rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) (in Turkish). E.Ü. Fen Fakültesi Dergisi, Seri B,C. II, S.2: 131-142.
- Bencic, C.B., M. Krisfalusi, J.G. Cloud and R.L. Ingermann. 2000. Short-term storage of salmonid sperm in air versus oxygen. North American Journal of Aquaculture, 62: 19-25.
- Bromage, N. 1990. Broodstock management and seed quality- general considerations. In: N.R. Bromage and R.J. Roberts (Eds.) Broodstock Management and Egg and Larval Quality, pp 1-25. Cambridge University Press, Cambridge.
- Büyükhatipoğlu, Ş. and W. Holtz,. 1978. Preservation of trout sperm in liquid or frozen state. Aquaculture, 14: 45-49.
- Cloud, J.G., W.H. Miller and M.J. Levanduski. 1990. Cryopreservation of sperm as a means to store Salmonid germ plasm and to transfer genes from wild fish to hatchery populations. The progressive Fish-Culturist, 52:51-53.

- Duncan, D. B. 1955. Multiple Range and Multiple F test. *Biometric*, 11:1-42.
- Gupta, S.D. and S.C. Rath. 1991. A preliminary study on quantitative assessment of milt of *Labeo rohita* (Ham.). *Proc. Nat. Symp. Freshwat. Aqua.*, 43-45.
- Gupta, S.D. and S.C. Rath. 1993. Cryogenic preservation of carp milt and its utilization in seed production. *The Third Indian Fisheries Forum Proceedings*, 11-14 October, Pantnagar, pp.77-79.
- Gupta, S.D., S.C. Rath and S. Dasgupta. 1996. Fertilization efficiency of cryopreserved carp spermatozoa over four years at different time intervals after thawing. *Geobios*, 22:208-211.
- Konuk, T. 1975. *Practical Physiology (in Turkish)*. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları:314, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara.
- Moczarski, M. 1976. Deep freezing of carp (*Cyprinus carpio* L.) Sperm. *Bulletin De L'Academia Polonaise des Sciences*, 15(3):187-190.
- Moczarski, M. and M. Koldras. 1976. Properties of tench (*Tinca tinca* L.) sperm and experiments with freezin it at -196°C. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 11(2): 40-49.
- Moore, A.A. 1987. Short-term storage and cryopreservation of walleye semen. *The Progressive Fish Culturist*, 49:40-43.
- Ohta, H. and T. Izawa. 1996. Diluent for cool storage of Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. *Aquaculture*, 142: 107-118.
- Ohta, H., T. Unuma and H. Nagoya. 2000. Diluents for cool storage of milt and for artificial fertilization in the Amago salmon *Oncorhynchus masou ishikawae*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 66(1): 88-89.
- Rana, K. 1995. preservation gamets. *In: N.R. Bromage and R.J. Roberts (Eds.) Broodstock Management and Egg and Larval Quality*, pp 53-76. Cambridge University Press, Cambridge.
- SAS, 1985. *SAS User's Guide St. 1985 Eds.* SAS Ins. Inc., Carry, N.C.
- Scott, A.P. and S. M. Baynes. 1980. A rewiev of biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *J.of Fish Biology*, 17:707-739.
- Stoss, J. 1983. Fish gamet preservation and spermatozoa physiology. *In: W.S. Hoar, D.J. Randall and E.M. Donaldson (eds.) Fish Physiology*, Vol. 9, Part B. Academic Press, New York.
- Stoss, J. and W. Holtz. 1983. Succesful storage of chilled rainbow trout (*Salmo gairdneri*) spermatozoa for up to 34 days. *Aquaculture*, 31:229-236.
- Stoss, J. and T. Refstie. 1983. Short-therm storage and cryopreservation of milt from atlantic salmon and sea trout. *Aquaculture*, 30:229-236.
- Suquet, M., C. Dreanmo, C. Fauvel, J. Cosson and R., Billard. 2000. Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research*, 31: 231-243.
- Tvedt, H.B., T.J. Benfey, D.J. Martin-Robichaud, and J. Power. 2001. The relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. *Aquaculture*, 194:191-200.
- Van Heerden E.J., H.J. van Vuren and G.J. Steyn. 1993. Development and evaluation of sperm diluents for the artificial insemination of rainbow trout (*O. mykiss*). *Aquatic Living Resources*, 6: 57-62.