

Gökkuşuğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) Böbrek Doku Örnekleri ile Karyotip Oluşturulması

Tülay Örs

Celal Bayar Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Manisa, Türkiye

Abstract: *Forming karyotype with samples of kidney cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792).* In our karyotype studies, the result reached through the examination of kidney cells of the rainbow trout were much efficient when compared to the result reached through the examination of blood samples in similar studies. Studies on chromosomal levels will give us the chance of having knowledge about the amount, shape and possible abnormalities of the chromosomes. Much further examinations leading to researches on genetic level are possible with today's technology with the presumption that we have suitable laboratory conditions. These level of studies will give us the chance of fully controlling the species. Such controlling abilities will give us quite a number of economical advantages with respect to breeding food and nutrition sectors, bringing up the need of cooperative work will help us to eliminate the problematic situations that faces us in a short time period.

Key Words: Genetic, chromosome, karyotype, kidney, Rainbow trout.

Özet: Gökkuşuğu alabalığı böbrek dokusundan hazırlanan doku örnekleri ile yapılan çalışmada canlıların karyotipi oluşturulmuştur. Genetiksel karyotip çalışmaları için böbrek dokusu çok iyi sonuçlar vermektedir. Bunun nedeni olarak lenfositlerin yapım yeri olarak balıklarda böbreğin önemli bir organ olmasıdır. Doku örneğinin elde edilmesi, inkubasyon süresinin kısalığı çalışmanın kolaylıkla yürütülmesine yardımcı olmuştur. Karyotip belirlemesine yönelik böyle deneysel çalışmalar daha önce pek çok canlı türü için yapılmış ancak balıklarda örneklerine az rastlanmaktadır. Bu çalışmada diğer türlerde uygulanan yöntemlerden yararlanılarak araştırma gerçekleştirilmiş ve özgün sonuçlar alınmıştır. Kromozom düzeyinde yapılan çalışmalar sonucu kromozomların türe özel sayı ve biçimleri belirlenmiştir. Daha ileri tetkikler ile gen düzeyinde araştırmalar laboratuvar koşullarının uygun olması durumunda günümüz teknolojisinde mümkündür. Gen düzeyindeki çalışmalar ile özellikle yetiştiricilik, gıda-beslenme sanayisinde sınırsız ekonomik avantaj sağlaması dolayısıyla bu konuda çalışan üretici girişimcilerle entegre çalışılması gündeme getirilebilir. Bu entegrasyonun gerçekleşmesi sonucunda hem bilimsel, hem ticari anlamda elde edilecek kazanımlar karşılaşılan pek çok sorunu kısa zamanda ortadan kaldıracaktır.

Anahtar Kelimeler: Genetik, kromozom, karyotip, böbrek dokusu, gökkuşuğu alabalığı.

Giriş

Balık kromozomları ile ilgili genetik çalışmalar özellikle son elli yılda hızla gelişmiştir. Kromozom analizleri çalışmaları balıkların gelişim basamaklarını belirlemede, varyasyonların tespitinde ve genel olarak balık genetiğine ait pek çok soruyu aydınlatmada bize yardımcı olur. Kromozomların morfolojik

görünümleri ve sayıları varsa türler arasındaki evrimsel farklılıkları makro düzeyde görmemizi sağlar.

Bir türe ait kromozomların sayısal ve morfolojik tespit edilmesi türün alt türlerinden ve çeşitli ekolojik farklılıkların yarattığı varyasyonlarından farkını gösterir. Mitoz metafazındaki hücrelerle yapılan analizler, özel çalışmalar ile metafaz plağındaki kromozom şeklinde kalıtım

materyalini incelememiz mümkündür.

Balık kromozomları ile ilgili çalışmalar son yıllarda pek çok araştırmacı tarafından yapılmıştır. Gold ve diğ., (1980); Vasil'yev, (1980); Sola ve diğ., (1981) ile Yu ve diğ., (1984) pek çok tür için kromozom büyüklüklerini ve sayılarını açıkça ifade etmişlerdir.

Blaxhall, (1975); Denton, (1973) ve Ojima, (1982) ise kromozom preparasyonu hazırlama yöntemleri ile ilgili çalışmalarını önemli gelişmeleri bilim dünyasına sunmuşlardır. Ohno, (1974) ve Gold, (1979) balık kromozomları ile yaptıkları çalışmaların sonucunda evrim ve genetik bağlantısını açıkça göstermişlerdir.

Kromozom analizlerinde önemli olan basit yöntemlerin uygulanması sırasında karşılaşılan teknik zorluklardır. Preparasyon sonucunda elde ettiğimiz görüntüleri fotoğraflamak ve ardından karyotip oluşturmak aşamasında da bazen teknik sıkıntılar yaşanabilir.

Materyal ve Yöntem

Balık kromozomları mitoz metafaz plağında ışık mikroskobu ile net olarak incelenebilir. Kullandığımız basit yöntemlerle balık dışında diğer hayvanlarla Macgregor & Varley (1983)'de ve insanla Yunis (1974), Priest (1977)'de çalışılmış olması çalışmamıza örnek oluşturmuştur.

Kromozom preparasyonunda iyi bir sonuç almak için metafaz hücreleri kullanılır. Embriyonik dokular, solungaçlar, böbrekler, bağırsak ve pul epiteli sıkça kullanılan ve iyi sonuç alınan balık hücre örnekleridir.

Mitozdaki hücreyi metafaz safhasında durdurmak için bazı kimyasallar kullanılır. Kolsişin ve kolsemid iğ ipliklerini kırar. Hücreler bu kimyasallarda 20 dakika ve 6 saat arası tutulabilir. Sürenin uzaması kromozom yoğunluğunu artırıcı etki eder.

Kolsişin uygulamasından sonra hipotonik solüsyonlar kullanılması hücre

ve nukleusun sıvı alıp şişerek kromozomların daha net görünmelerine yardım eder. Hipotonik olarak %1 sodyum sitrat veya %5'lik potasyum klorür kullanılır. Kromozomların hipotonik işlemden geçmesi aynı zamanda üst-üste binme durumuna da engel olacağı için kromozomların ayrı-ayrı görünmelerini kolaylaştırır.

Daha sonra hücreler fiksasyondan geçirilir. Fiksatif olarak üç kısım etanol veya methanol ile bir kısım glasiyal asetik asit (Carnoy's Fiksatif) kullanılır. Fikse edilen hücreler artık mikroskopta çalışılabilir veya uzun süre fiksasyon sıvısında saklanabilir. Saklanan hücreler mikroskop çalışmasına alınmadan önce taze fiksatife aktarılmalıdır.

Böbrek dokusu ile kromozom preparasyonuna, Gökkuşuğu alabalığı canlı materyaline intraperitoneal veya intramusküler enjeksiyon ile kolsişin veya kolsemid verilerek çalışmaya başlanır. Kligerman&Bloom (1977) intraperitoneal enjeksiyon için 25 µg kolsişin/gr ölçüsünü vermişlerdir. Bizim çalışmamızda %0.5'lik kolsişin %0.8 NaCl solüsyonu 0.8 ml/100gr V.A kullanıldı. Rutin çalışmalar için önerilen yapay deniz suyu kullanılacaksa doz 1000 ml redistile suyla hazırlanacak veya hazır olan yapay deniz suyu ile %0.5'lik kolsişin solüsyonu 3ml/1000 gr V.A kullanılır.

Araştırmada kullanılan materyaller; 80x20x40 cm boyutlarında hazırlanmış cam akvaryum, Sterilizasyon için otoklav, Santrifüj cihazı ve tüpleri, Petri kapları, 10 ml'lik erlenmayerler, 15 ml'lik plastik tüpler, Değişik boyutlarda(1ml, 5 ml v.s.) steril enjektörler, Pastör pipeti, Lamlar, lameller,şaleler, %0.6'lık kolşisin solüsyonu, %0.25'lik MS-222 solüsyonu, %0.56 KCL hipotonik solüsyonu, 3:1 Metanol:Glasiyal Asetik Asit, 1000 ml redistile su ile hazırlanmış veya hazır alınmış steril, yapay deniz suyudur.

1000 ml redistile suyla hazırlanan steril yapay deniz suyu ile %0.5'lik

kolşisin solüsyonu hazırlanır, bu solüsyondan 3ml/1000gr vücut ağırlığında intraperitoneal enjekte edilen balıklar 3-5 saat süreyle 15°C'de deniz suyu bulunan iyi havalandırılmış 80x20x40 cm boyutlarında bir akvaryumda tutulur,

Inkübasyon süresi sonunda küçük balıklar omuriliği kesilerek, büyük balıklar ise boynu kesilerek veya solungaç kapaklarını aktivasyonu duruncaya kadar %0.25'lik MS-222 solüsyonunda bırakılır

Böbreğin ön kısmından yaklaşık 2-5 mm'lik bir doku örneği ortalama değer olarak böbreğin yaklaşık 1/4'lük kısmı alınarak önce içinde soğuk (buz üzerinde veya ortalama 4°C'de) %0.4 veya %0.56'lık 2 ml'lik KCl bulunan küçük bir petri kabına konulur. Burada hızlı bir şekilde küçük parçalara ayrılan örnek doku 5 ml'lik plastik tüplere alınır. Tüpler 4, 13, 18°C 2lik aynı oranlarda hipotonik solüsyon ile 4-5 ml'ye tamamlanır. Tüpler düzenli bir periyodla karıştırılır, hipotonik işleme 15°C'de 30 dk. devam edilir

100 g'de 7 dk. santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırılır ve pastör pipeti ile yeni hazırlanmış soğuk -5 veya -18°C 3:1 metanol:glasiyal asetik asit ilave edilerek fiksasyon 20 dk olarak denendi.

Tüpler 100G2'de 7 dk. yeniden santrifüjlenir, süpernatant uzaklaştırılır fiksatif ile 5 ml'ye tamamlanır, santrifüj işlemi tekrarlanır ve süpernatant atılır. Bu aşamaya ulaşan örnekler gerekirse 24 saat bekletilebilir. Fiksasyon işlemi sırasında fiksatif en az üç kez değiştirildi.

Lamlar 20 dk toz deterjan içinde kaynatılıp, musluk suyu ile durulanır, %95'lik etanole iki kez batırılıp, silinir ve kurutulur, ardından deiyonize sudan geçirilerek buzlukta bekletilir ince bir tabaka halinde, ince bir film tabakası oluşturmuş soğutulmuş lamlar üzerine 30-50 cm yükseklikten 45°'lik açı ile 3-5 damla hücre süspansiyonu damlatılır.

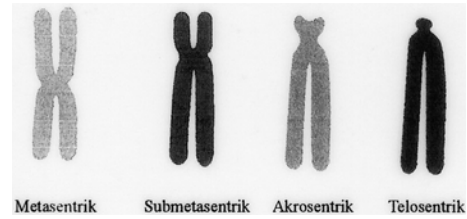
Lamlar oda sıcaklığında alkol lambası ile ısıtılarak kurutulur. Son olarak standart karyotip preparasyonu için lamlar boyama

kabı (şale) içinde 1/15 M pH 6,8 sorenson fosfat tampon solüsyonunda hazırlanmış %4-6'lık Giemsa ile 5-30 dk (biz 10 dk ile daha iyi sonuçlar aldık) boyanır. Fazla boya distile su ile yıkanarak lamlar havada kurumaya bırakılır. Kuruyan preparatlar ile 40x veya 60x objektif ile çalışılır.

Bulgular

Bir karyotipin tanımlanabilmesi için kromozomları ayrı ayrı görmek ve gösterebilmek gerekir. Karyotipte kromozomlar sentromer lokalizasyonuna göre ve büyükten küçüğe doğru sıralanarak gösterilir.

Levan ve diğ., kromozom sentromer konumuna göre kromozom şekillerini tanımlamışlardır. Buna göre metasentrik kromozomlarda sentromer kromozomun merkezinde bulunur. Submetasentrik kromozomlarda sentromer merkezin altında lokalizedir. Sentromer kromozomun ucundaysa telosentrik kromozomdan bahsedilir. Sentromer kromozom ucuna yakınsa subtelosentrik kromozom tanımlaması yapılır (Şekil 1).



Şekil 1. Sentromer konumuna göre kromozom şekilleri.

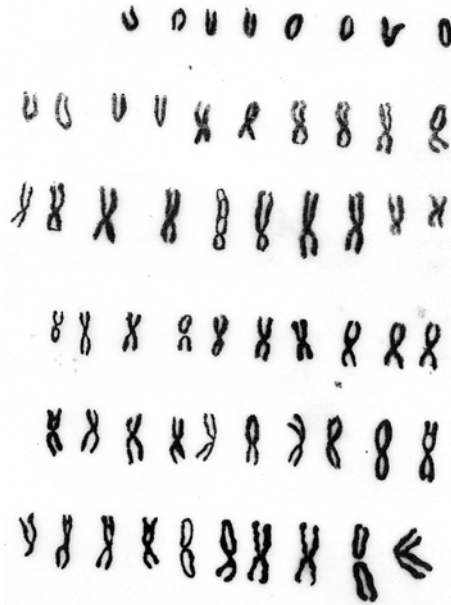
Kromozomların ayrı-ayrı en iyi görüldüğü preparatlardan ışık mikroskopunda büyük büyütmelerde fotoğrafları çekilir (Şekil 2).

Fotoğraf üzerinden her bir kromozom tek tek ayrılır. Eğer üst üste binme durumu varsa aynı fotoğraftan birkaç tane basılır ve her kromozom çifti fotoğraftan kesilerek çıkarılır. Kesilen parçalar büyükten küçüğe

doğru dizilir. Ardından büyüklükleri ve sentromer konumları dikkate alınarak homolog kromozom çiftleri karyotip olarak hazırlanır (Şekil 3).



Şekil 2. Gökkuşluğu alabalığı böbrek dokusu ile hazırlanmış kromozom preparasyonu. Ölçü: 10 µm.



Şekil 3. Kromozom preparasyonu sonucu elde edilen karyotip (2n=58). Ölçü: 10 µm.

Hazırlanan karyotip üzerinden cinsiyet kromozomunu belirlemek için, cinsiyet kromozomunun ayırt edici farklı

morfolojik ölçüsünün olması gerekir. Bu farklı morfolojik ölçüler Gold (1979) tarafından gösterilmiştir. Ayrıca özel olarak cinsiyet kromozomuna ait bant özellikleri olduğu unutulmamalıdır. Bu özellik sayesinde boyama çalışması sonunda eşey kromozomu kolayca belirlenir. Haaf&Schmid, (1984) bant özelliklerini açıklamışlardır. Eğer erkek birey heterogametik cinsiyet özelliğinde ise eşey kromozom çiftinin X-Y olması erkek birey, X-X ise dişi birey ifade eder (Thorgaard, 1977). Eğer dişi birey heterogametik cinsiyet özelliğinde ise eşey kromozom çiftinin Z-W görünümü dişi birey, Z-Z erkek birey anlamındadır.

Tartışma ve Sonuç

Canlının evrimi, tür oluşumu hakkında kesin bilgilerle donanmanın yolu canlıya ait genomun belirlenmesiyle başlar. Genom canlının haploid kromozom setindeki DNA miktarı olarak tanımlanır. Genomik DNA kromozomlarda yer aldığına göre canlının kromozom sayısı ve büyüklüğü genomun ölçüsüdür. Buradan yola çıkarak; genetik bilgiye ulaşmanın birinci adımı canlıya ait kromozom sayısını ve morfolojik özelliklerini tam olarak görebileceğimiz bir karyotip seti hazırlamaktır.

Gökkuşluğu alabalığı ile yapılan çalışmada türe özel genetik çalışmanın ilk adımı olan karyotip oluşturulmuş ve kromozom sayısı $2n=58$ olarak sayılmıştır.

Türe ait kromozomların morfolojik özellikleri karyotipte açıkça görülmektedir.

Bantlama çalışması ve idiogram çizimleri çalışmayı takip eden ikinci adım olarak sayılabilir. Özellikle idiogram çizimleri için karyotipe tamamen egemen olacak bilgilenmeyi edinmemizin gereği ihmal edilmemelidir.

Kaynakça

Blaxhall, P.C., (1975). Fish chromosome

- techniques-a review of selected literature. *Journal of Fish Biology* 7: 315-320.
- Denton, T.E., (1973). Fish chromosome methodology. Thomas, Springfield, Illinois.
- Gold, J.R., (1979). Cytogenetics. Pages 353-405 in W.S. Hoar. D.J. Randall. J.R. Brett, editors. *Fish physiology*, volume 8. Academic Press, New York.
- Gold, J.R., W.J., Karel&M.R. Strand. (1980). Chromosome formulae of North American fishes. *Progressive Fish-Culturist* 42: 10-23.
- Haaf, T., M. Schmid. (1984). An early stage of ZW/ZZ sex chromosome differentiation in *Poecilia sphenops* var. *Melanistica* (Poeciliidae, Cyprinodontiformes). *Chromosoma* 89:37-41.
- Kligerman, A.D.&S.E. Bloom, (1977b) Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 34:266-269.
- Levan, A., K.,Fredga&A.A. Sandbeg. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201-220.
- Macgregor, H.&J. Varley, (1983). Working with animal chromosomes. Wiley, New York.
- Ohno, S., (1974). *Animal cytogenetics*, volume 4: Chordata 1. Protochordata, Cyclostomata and Pisces. Gebrüder-Borntraeger, Berlin.
- Ojima, Y., (1982). *Methods in fish cytogenetics*. Nucleus (Calcutta) 25:1-7
- Priest, J.H., (1977). *Medical cytogenetics and cell culture*, 2nd edition. Lea and Febiger, Philadelphia.
- Sola, L., S. Cataudella&E. Capanna, (1981). New developments in vertebrate cytotaxonomy. III. Karyology of bony fishes: a review. *Genetica* 54:285-328.
- Thorgaard, G.H., (1977). Heteromorphic sex chromosomes in male rainbow trout. *Science (Washington, D.C.)* 196:900-902
- Vasil'yev, V.P., (1980). Chromosome numbers in fish-like vertebrates and fish. *Journal of Ichthyology* 20(3):1-38.
- Yu, X., T. Zhou, K. Li&M. Zhou, (1987). On the karyosystematics of cyprinid fishes and a summary of fish chromosome studies in China. *Genetica* 72:225-236.
- Yunis, J. Y., (1974). *Human chromosome methodology*. Academic Press, New York.