

Tatlısu Balık Kültüründe Uygulanan Bazı Biyoteknolojik Yöntemler

Osman Özden, Yusuf Güner, Volkan Kızak

Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, 35100, Bornova, İzmir, Türkiye

Abstract: *Applications of some biotechnological tools in fish culture.* Control of sex ratio by hormonal manipulations, chromosome set manipulation techniques to induce polyploidy such as triploidy and tetraploidy, and uniparental chromosome inheritance like gynogenesis and androgenesis, and gene transfers have been applied on many fish species generally in cultured freshwater fish. These techniques are important in the improvement of fish breeding as they provide a rapid approach for gonadal sterilization, sex control, clonation and chromosome fragment transfer.

Key Words: Biotechnology, finfish culture, sex control, chromosome manipulation, gene manipulation.

Özet: Hormonal uygulamalar yoluyla cinsiyet oranlarının kontrolü, triploidi ve tetraploidi gibi poliploidi uyarımı ve ginogenez ve androgenez gibi uniparental kromozom kalıtımı için kromozom takımı manipülasyonları ve gen transferi manipülasyonları, balıkları kültüründe çoğunlukla tatlı su balıkları üzerinde olmak üzere birçok balık türü üzerinde bütün dünyada uygulanmaktadır. Bu teknikler, cinsiyet kontrolü, gonadal sterilizasyon, klonlama ve kromozom parça transferi için hızlı bir yaklaşım sağlayan, ürün verimliliğini artırıcı önemli yöntemlerdir.

Anahtar Kelimeler: Biyoteknoloji, balık yetiştiriciliği, cinsiyet kontrolü, kromozom manipülasyonu, gen manipülasyonu.

Giriş

Dünya su ürünleri yetiştiriciliği, besin üretim sistemleri içinde en hızlı büyüyen sektör olup yıllık büyüme oranı %3.1 olan karasal hayvan üretimi ve %1.6 olan balıkçılık ile karşılaştırıldığında %10'a yaklaşan bir büyüme hızına sahiptir. Su ürünlerine olan talebin giderek artması ve balıkçılık üretiminin sınırlı seviyede olması, su ürünleri yetiştiriciliğinde hızlı bir gelişmeye neden olmaktadır. Bu yüzden su ürünleri sektörünün, gelecek yıllarda besin ihtiyacının karşılanmasında üretim sistemleri içinde en büyük potansiyele sahip olduğu ön görülmektedir (LyMBERy, 2000). Bu potansiyelin zaman içerisinde ortaya çıkmasında biyoteknolojik yöntemlerin

önemli bir yeri olacaktır. Son 20 yılda genetik alanında yaşanan hızlı ilerlemeler sayesinde, balık kültüründe uygulanan biyoteknolojik yöntemler gelişmiş ve bunlardan bir kısmı pratikte uygulanabilir olmasına karşın, bir kısmı da ancak laboratuvar koşullarında yapılabilecek düzeydedir (Turan, 2000).

Biyoteknolojik Yöntemler

Balık kültüründe uygulanan bazı biyoteknolojik yöntemler 3 ana başlık altında ele alınmaktadır;

- Cinsiyet kontrolü
- Kromozom manipülasyonu
- Gen manipülasyonu

Cinsiyet Kontrolü

Aynı türden balıkların farklı cinsiyetli bireylerinde ikincil eşeyssel özelliklerin bir sonucu olarak gelişme farklılıkları görülür ve farklılıklar bazı türlerde çok az iken bazılarında çok belirgindir. Ekonomik açıdan erkek ve dişi bireyler arasındaki bu fark, eşeyssel kontrolü daha anlamlı kılar. Cyprinidae üyelerinin çoğunda birçok türünde erkek bireyler dişilerden küçüktür. Erkek ebeveynin bakımının veya saldırganlığının üreme davranışı olduğu türlerde erkek bireyler daha büyüktür. *Tilapia* spp. (Cichlidae) buna örnek verilebilir. Kültürü yapılan türlerden gökkuşağı alabalığında, dişiler erkeklere göre daha hızlı büyür, daha iyi et kalitesine sahiptir ve hastalıklara karşı daha dayanıklıdır. Bu farklılıkların bir sonucu olarak balık büyüklüklerinin aynı olmaması gibi problemler oluşur ve dolayısıyla pazarlamada sıkıntı yaşanır. Bu sorunların giderilmesinde cinsiyet dönüşümü ve tek cinsiyetli stokların üretimi, çözüm olarak ortaya çıkmaktadır. Bunun yanında, porsiyon üstü balık üretiminin planladığı durumlarda tek cinsiyetli populasyonlar üretmek yeterli değildir. Bazı balık türlerinde üreme gelişimi esnasında büyümede, yem dönüşüm oranında, davranışta, hastalıklara karşı hassasiyette, vücut ve et renginde bazı olumsuz durumlar meydana gelir. Alabalık yetiştiriciliğinde erkek balıklar yaklaşık 1 sene sonunda cinsiyet olgunluğa erişirler ve büyümenin yanı sıra cinsel olgunluk için de enerji harcadıklarından verimleri düşük olur. *Tilapia* türlerinde ise dişi bireyler çok üretkendir ve aşırı çoğalmaya neden olup büyümede duraklamaya neden olurlar. Bu yüzden sofralık balık üretiminde baskın olarak olgunlaşmamış yada kısır stoklar tercih edilir. Tek cinsiyetli ve kısır populasyonlar oluşturmada birkaç metot vardır (Purdom, 1993; Sheperd ve Bromage, 1990).

Doğrudan Hormonal Uygulama

Çoğu balıkta cinsiyet gelişimi, genellikle kuluçkadan çıktıktan hemen sonra gerçekleşmektedir. Embriyonun genetik yapısına karşılık, bu noktada meydana gelecek modifikasyonlar, eşey hücrelerini ya ovaryum yada testis olacak şekilde programlar. Fenotipik cinsiyetin değiştirilebileceği bu dönem türlere göre farklılık gösterir. Eğer bir larva keseli dönemden sonra anabolik steroidleri absorbe ederse cinsiyet hücrelerinin gelişimi gerçekleşir. Bu dönemde yapılabilecek bir manipülasyon cinsiyet kontrolünü mümkün kılar. (Turan, 2000; Sheperd ve Bromage, 1990).

Cinsiyet, genetiksel olarak eşey kromozomları vasıtasıyla saptanır ve kontrol, yumurtadan çıkıştan sonra yemlemenin ilk günlerinde, genotipik cinsiyetin uygun cinsiyet hormonu uygulamasıyla değiştirilebileceği zamanlarda sağlanır. Bu yüzden potansiyel erkekler östrojenlerle dişileştirilir ve potansiyel dişiler androjenlerle erkekleştirilebilir. İlk yemi almaya başlayan larvalara androjen hormonları uygulandığında XX genotipli erkek bireyler elde edilir. Östrojenlerle yapılan uygulamalarda ise XY genotipli dişi bireyler elde edilir. Hormonal uygulamada hormonun yapısı, diyetteki konsantrasyonu, uygulamaya başlama zamanı, yemleme oranı ve süresi önemli faktörlerdir (Purdom, 1993). Cinsiyet dönüşümünde kullanılan hormonlar farklı yöntemlerle uygulanır (Özden ve Güllü, 1996);

- Hormon katkılı yem ile besleme
- Hormonlu-su çözeltisine daldırma
- İki yöntemin birlikte kullanıldığı Kombine uygulama

- Dişileştirme

Dişileştirme, yem almaya başlamış larvalara östrojen uygulanmasıyla gerçekleştirilir. Östrojenler arasında etki bakımından fazla bir fark yoktur ve yaygın olarak bulunabilen Östradiol-17β

ile Etinil-östradiol yüksek etkilere sahiptirler. Bunlardan başka östron hormonu da kullanılmaktadır (Purdom, 1993; Özden ve Güllü, 1996).

Östrojenlerin uygulanması androjenlerde olduğu gibidir, fakat dişileşmeye doğru dönüş erkekleşmeye doğru olana kıyasla daha az olduğundan daha yüksek doza ihtiyaç vardır. Östrojen kullanımında dikkate alınması gerekli nokta, tavsiye edilen dozların aşılmasıdır. Yüksek seviyelerdeki östrojen, Salmonidae türlerinde karaciğer hasarına ve mortalitelere neden olur (Sheperd ve Bromage, 1990). Somon yetiştiriciliğinde, olgunlaştıktan sonra ölen erkekleri elimine etmek için tümü dişi olan populasyonlar üretilmektedir. Bunun için somon postlarvaları ilk beslenmeye başlandığı zaman 40-60 güne kadar kg yeme 20mg Östradiol-17β katılarak beslenmektedir (Turan, 2000).

- Erkekleştirme

Balıkların erkekleştirilmesinde genellikle, doğal testosteron hormonunun bir türevi olan 17α-metiltestosteron uygulanır. Androjenlerden 19-nor-etinilestestosteron en etkilisidir, fakat metiltestosteron yapay analogu ucuz ve kolay bulunanıdır, bu yüzden pratik erkekleştirme işlemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Purdom, 1993). Diğer kullanılan hormonlar ise, Etinil testosteron, 11-ketotestosteron ve Metil dihidrotosteron'dur (Sheperd ve Bromage, 1990; Özden ve Güllü, 1996). Salmonidae türlerinde 3mg.kg⁻¹ doz erkekleştirme için yeterlidir. Çoğu tilapya türünde 30-60mg.kg⁻¹ gerekmektedir (Sheperd ve Bromage, 1990).

Hormon uygulamasının balıklarda hiçbir sağlık problemi oluşturmamasına rağmen bu yaklaşım pazarlamada sorunlar çıkarmaktadır. Genel olarak hormonlar, larvaların ilk yem alımından itibaren 40-60 günlük dönemde, nadiren 100 günde uygulanır ve bundan dolayı hormonal kalıntılar, balığın pazarlanmasından çok önce dokulardan yok olur (Sheperd ve

Bromage, 1990). Gökkuşuğu alabalığında 24 saat içerisinde alınan 17α-metiltestosteron'un %67'sinin dışkı ile dışarı atıldığı, 21 gün sonra diyetten uzaklaştırılan *Tilapia aurea* juvenillerinde kalan 17α-metiltestosteron miktarının %9 olduğu bildirilmiş ve cinsiyet dönüşümde en yaygın kullanılan östradiol-17β ve 17α-metiltestosteron hormon seviyelerinin, yemden alınmalarından sadece 5 gün sonra ölçülemeyecek miktarlara düştüğü kaydedilmiştir (Turan, 2000). Tüketici tepkisi nedeniyle hormonların kullanımında doğrudan yöntem yerine dolaylı yöntem tercih edilebilir.

Dolaylı Hormonal Uygulama

Doğrudan hormonal uygulamada %100 tek cinsiyetli populasyon oluşturma garantisi yoktur. Fakat dolaylı yöntemde tümüyle dişi ve erkek populasyonlar üretilir.

- XX Genotipli Erkek Damızlık Üretimi

Bu yöntemdeki amaç tümüyle dişi bireylerden oluşan populasyonlar üretebilecek damızlık bireyleri sağlayabilmektir. Postlarvalarda henüz cinsiyetinin belirsiz olduğu safhada yapılması gereken balığın androjenlerle erkekleştirilmesidir. Sonuçta elde edilen erkekler, yaklaşık olarak XX ve XY bireylerinde eşit sayıda yer alacaktır ve bu döller normal dişilerle çaprazlanarak test edilir. Oluşan döllerinde erkek birey olanlar XY genotipli erkek birey olarak tanımlanır ve bunlar elimine edilir. Döllerinde %100 oranında dişi birey bulunanlar ise XX genotipli erkek birey olarak saptanır ve damızlık olarak ayrılır (Purdom, 1993).

Normal erkeklerden erkekleştirilmiş dişileri ayırmada geri çaprazlama tekniği kullanılabilirdiği gibi, gökkuşuğu alabalıklarında buna gerek yoktur. Çünkü; □ Dönüştürülmüş gökkuşuğu alabalığı erkeklerinin renkleri diğer bireylere kıyasla daha koyudur.

- Dönüştürülmüş gökkuşuğu alabalığı erkeklerinin sperm kanalları yoktur ve sağıldıklarında sperm vermezler.
- Dönüştürülmüş gökkuşuğu alabalığı erkeklerinin testisleri genelde tektir ve lobludur.

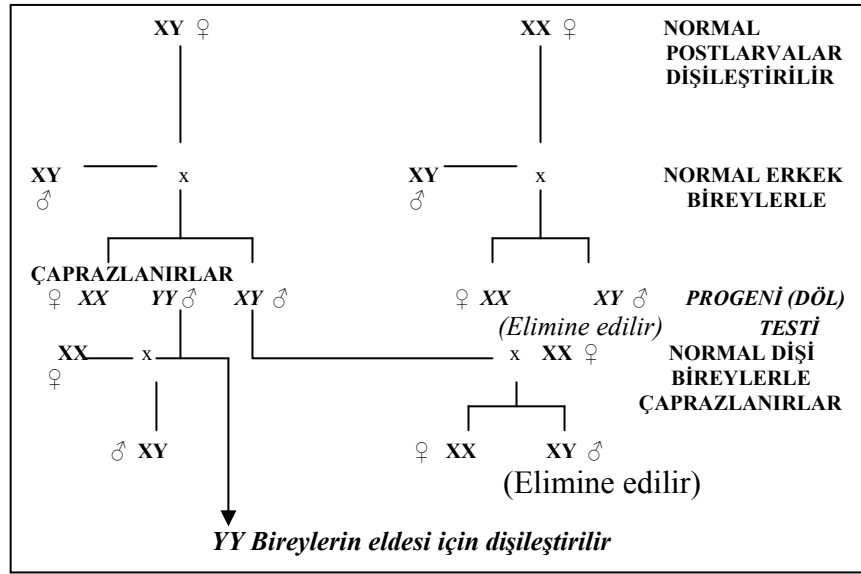
Normal erkeklerin ayrılmasıyla geride kalan XX genotipli erkek bireyler tamamı dişi bireylerin elde edilmesinde kullanılırlar (Ingram, 1988; Güner ve Kızak, 2001).

XX genotipli erkek bireylerin sağıldıklarında sperm vermemeleri dolayısıyla sperm alımı için öldürülmesi gerektiğinden, daha düşük hormon konsantrasyonları ile XX genotipli fonksiyonel erkek bireyler elde etmek mümkündür. Gökkuşuğu alabalığı 0.5

mg.kg⁻¹ metilttestosteron ilave edilmiş yem ile ilk yemlemeden itibaren 60 gün boyunca beslenerek %80'in üzerinde XX genotipli tümüyle fonksiyonel erkek bireyler elde edilebilmektedir (Purdom, 1993).

- YY Genotipli Süper Erkek Damızlık Üretimi

YY genotipli süper erkek üretimindeki amaç, %100 erkek bireylerden oluşan populasyon üretmektir. Normal bireyler arasında yapılan çaprazlamadan dişi ve erkek bireyler oluşurken, YY genotipli bir süper erkek ile yapılan çaprazlamadan sadece erkek bireyler oluşur. Süper erkek üretiminde uygulanan işlem Şekil 1'de verilmiştir;



Şekil 1. YY genotipli süper erkek üretimi (Purdom, 1993).

YY genotipli bireyler aynı zaman da androjeniz yoluyla yada cinsiyet dönüşümü ve ginogenez kombinasyonu yoluyla üretilmektedir (Purdom, 1993). Süper erkek üretimi *Oryzias latipes*, *Ictalurus spp.*, *T. mossambica*, *T. nilotica*, *O. mykiss* ve *C. auratus* üzerinde başarıyla uygulanmıştır (Turan, 2000).

Kısırlaştırma

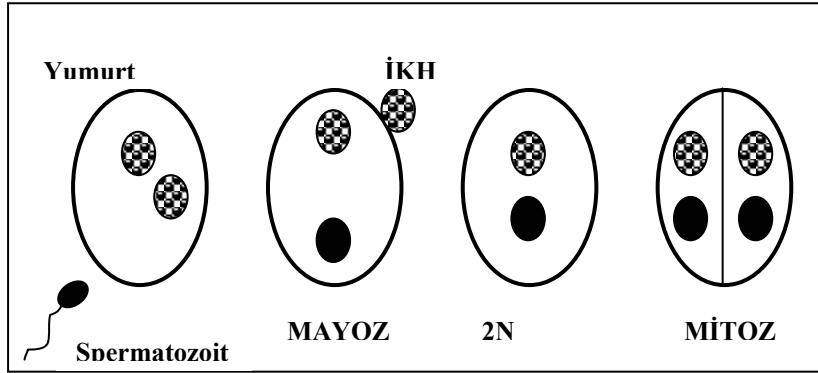
Cinsi olgunlaşma ile ilgili birçok önemli sorunun tek cinsiyetli stokların üretilmesiyle giderilmesine karşın, tümüyle dişi veya tümüyle erkek stokların olgunlaşmasından önce pazara sunulmaz ise üretimde olgunlaşma ile ilgili kayıplar devam edecektir. Bu sorunların giderilmesinde

çare kısırlaştırıcıdır. Kimyasal, Hormonal, Triploidizasyon ve Radyasyon uygulamaları içinde en geçerli kısırlaştırma metodu Triploidizasyon işlemidir (Jungalwalla, 1991, Sheperd ve Bromage, 1990).

Kromozom Manipulasyonu

Balıkların çoğunda dış dölleme meydana geldiğinden kromozom setlerinin manipulasyonu kromozom sayısını kısmen değiştirmek kolaydır. Bu teknikler doğrultusunda ginogenetik, androgenetik, triploid ve tetraploid balıklar üretmek olasıdır. Balık hücrelerinin çoğu

ebeveynlerinden gelen 2 kromozom setine sahiptir. Gametlerde bu sayı yarıya düşer, ebeveynlerden gelen setlerden sadece biri döllere geçer. Bu indirgeme işlemi, kromozom manipulasyonlarının anlaşılmasında temel noktadır (Johnstone, 1992). Normal fertilizasyonda haploid sperm yumurtayı döllerken maternal setlerden birisi (İkinci Kutup Hücre: İKH) 2. mayotik bölünmenin tamamlanmasıyla kaybolur ve böylece başlangıçtaki embriyonik hücre 1 maternal ve 1 paternal olmak üzere 2 kromozom seti içerir (Şekil 2).



Şekil 2. Dölleme işleminden kısa bir süre sonra ikinci kutup hücresinin kaybolmasıyla 2N kromozom setli embriyonik hücre meydana gelir (Johnstone, 1992).

Kromozom düzeyinde mayotik ve mitotik olaylara farklı amaçlar doğrultusunda yapılan çeşitli manipulasyon işlemleri vardır (Purdom, 1993; Galbusera ve diğ., 2000; Rothbard ve diğ., 1999; Colombo ve diğ., 1995; Chourrout, 1980). Bu manipulasyon işlemleri; Ginogenez (Mayoginogenez ve Mitoginogenez), Androgenez, Triploidizasyon ve Tetraploidizasyon teknikleridir.

Kromozom sayılarını değiştirmek için kullanılan çeşitli çevresel şoklar vardır (Diter ve diğ., 1993; Manickman, 1991; Purdom, 1993; Teskeredzic ve diğ., 1993; Malison ve diğ., 1993; Jungalwalla, 1991). Bunlar;

➤ Isı şoku

- Sıcaklık
- Soğukluk
- Hidrostatik basınç
- Kimyasallar
 - Kolşisin (Colchicine)
 - Sitokalsin B (Cytochalasin B)
 - N₂O (Diazot Monoksit)

Bu teknikler içerisinde en verimli yöntem basınç şoku olmasına karşın ekipmanları ağır ve pahalıdır (Malison ve diğ., 1993; Purdom, 1993).

Ginogenez

Ginogenez, balıkların kromozomlarını sadece anadan almasının sağlanmasıdır ve yumurtalarda embriyonik gelişimin sperm tarafından tetiklenip hiçbir şekilde sperm kalıtım materyalinin katkısı olmadan devam etmesidir. Ginogenez

uyarımındaki ana amaç, akraba hatların ve tek cinsiyetli populasyonların üretimidir. Yüksek derecede akraba olan balıkların üretiminde kullanılabilirdiğinden, teleost balıklarda akrabalı yetiştirme amaçları bakımından benzersiz bir araçtır (Galbusera ve diğ., 2000; Turan, 2000). Ginogenez'de yumurtaların döllenmesinde genetik materyali yok edilmiş spermatozoitler kullanılır. Spermatozoitlerin genetik materyalinin nötralize edilmesinde,

- γ -ışınları
- X-ışınları
- Ultraviyole (UV) kullanılır. Bunlardan en çok, ucuz ve kullanışlı olması nedeniyle ultraviyole kullanılır (Goryczko ve diğ., 1991; Refstie, 1983; George ve diğ., 1994; Cherfas ve diğ., 1990; Malison ve diğ., 1993; Rothbard, 1994).

Spermilerin kalıtım materyali yok edildiğinden farklı balık türlerinden alınan spermeler yumurtaların döllenmesinde kullanılabilir (Purdom, 1993). Yumurtaların aktive edilmesi için UV radyasyonlu sperm kullanımıyla yapay bir üreme gereklidir ve ardından embriyonun diploidlik durumunu tekrar sağlamak için fiziksel veya kimyasal şok uygulamaları gerekmektedir. Bu şoklar, mikrotübülleri tahrip ederek çekirdeksel bölünmeyi engeller (Galbusera ve diğ., 2000). Çevresel şokun uygulanmadığı durumlarda haploit embriyolar deforme özellikte olur (Purdom, 1993).

Ginogen balıkların üretiminde mayoginogenez ve mitoginogenez olmak üzere iki farklı yöntem uygulanmaktadır.

- **Mayoginogenez**

Mayoginogenez, ikinci kutup hücresinin çıkışının önlenmesiyle gerçekleşir. Normal bir yumurta, kromozom materyali elimine edilmiş inaktif bir spermatozoa tarafından döllenikten kısa bir süre sonra ikinci kutup hücresinin çıkışının önlenmesi amacıyla şoka tabi tutulur ve böylece iki kromozom setli mayotik

ginogenot embriyolar elde edilmiş olur (Rothbard, 1994; Galbusera ve diğ., 2000).

Üretilen mayotik ginogenler yüksek derecede akrabadırlar, fakat bunlar mayoz sırasında gerçekleşen krosing-over nedeniyle kısmen heterozigottur (Turan, 2000). Bu yüzden mayoginogenez, etkili bir Akrabalı Yetiştirme aracı olarak düşünülmemekle beraber, kromozom haritalanmasında ve cinsiyet belirleyici sistemin saptanmasında kullanılabilir (Purdom, 1993).

- **Mitoginogenez**

Mitoginogenez tamamıyla homozigot döller üretir, çünkü genomun dublikasyonundan sonra ilk mitotik bölünmenin engellenmesiyle gerçekleştirilir. Bu üreme metodu kullanılarak 2 nesil sonrasında genetik olarak benzer balıkların homozigot akrabalı (inbred) hatları sağlanabilmektedir.

Ginogenez işlemleri, Zebra balığı (*Danio rerio*), Medaka (*Oryzias latipes*), Adi sazan (*C. carpio*), Ayu balığı (*Plecoglossus altivelis*), gökkuşuğu alabalığı (*O. mykiss*), *Oreochromis niloticus*, Afrika yayın balığı (*Clarias gariepinus*), Çipura (*S. aurata*), *Myliopharyngodon piceus*, *Salmo salar* ve Levrek (*D. labrax*) gibi türlerde uygulanmıştır (Galbusera ve diğ., 2000; Gorshkov ve diğ., 1998; Rothbard ve Shelton, 1993; Cherfas ve diğ., 1990; Refstie, 1983; Colombo ve diğ., 1995; Rothbard, 1994).

- **Androgenez**

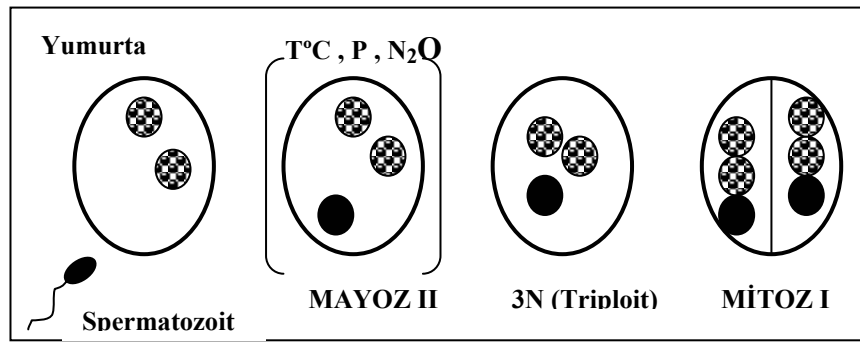
Androgenez, yumurtanın genetik materyalinin elimine edilmesinin ardından, bunun döllenip embriyo gelişiminin spermatozoanın kromozom setinden devam etmesidir (Purdom, 1993). Androjenetik zigot ilk bölünmeyi geçireceği zaman şok uygulanır ve hücre bölünmesi engellenir. Böylece oluşan bireyler babadan gelen kromozom setlerine sahip olmuş olur. Androjenetik

uygulamalar gökkuşuğu alabalığı, ot sazanı, adi sazan, *Salvelinus fontinalis* ve beyaz mersin türlerinde başarıyla uygulanmıştır (Turan, 2000; Rothbard ve diğ., 1999). Kendi kendini eşleyen kromozomlar tek bir kromozom takımından geldiğinden yüksek derecede akrabadır ve %100 homozigottur. Böyle balıklarda ölüm oranı yüksektir, çünkü herhangi bir mutant çekinik allel mevcut

ise açığa çıkmaktadır (Turan, 2000).

Triploidizasyon

Triploidizasyon tekniği ginogenez işlemine benzemekle beraber, bu yöntemde radyasyona tabi tutulmamış normal spermatozoalar kullanılır ve ana hedef steril balığı üretmektir. Döllenen hemen sonra çevresel şok ile triploid üretilerek kısırılık sağlanabilir (Şekil 3).



Şekil 3. Mayoz II safhasında ısı (T°C), basınç (P) veya kimyasal (N₂O) şoklardan herhangi birinin uygulanmasıyla ikinci kutup hücrenin çıkışı önlenerek 3N kromozom setli triploid embriyonik hücrelerin oluşması sağlanır (Johnstone, 1992).

Şoklamada, ısı şoku (sıcaklık veya soğukluk), hidrostatik basınç ve kolşisin, sitokalasin B, N₂O gibi kimyasallar kullanılır. Triploidler ayrıca tetraploid ve diploid çiftleşmesinden de üretilebilir (Malison ve diğ., 1993).

Çoğu balık türünde triploidler diploidlere kıyasla bazen önemli derecede daha iyi yaşama oranı, büyüme oranı ve yem dönüşüm oranı sergiler. Fakat bu özellikler cinsi olgunlaşmanın başlangıcına dek kendini göstermemektedir (Kerby ve Harell, 1990).

Triploidizasyon uygulamaları daha çok steril salmonid üretimi için kullanılmaktadır ve akuakültür endüstrisi açısından birçok pratik avantajlar sunmaktadır. Bu tür manipulasyonların en önemli yararı, metabolik enerjinin gamet üretimi yerine somatik büyüme için kullanılmasıdır. Aynı zamanda kısır

balıklar parlak gümüşü renklerini korurlar ve tüketici tarafından daha yüksek bir kalite olarak kabul görür. Triploidizasyon ayrıca, olgunlaşan alabalıkların özelliği olan maturasyona bağlı mortaliteyi ve düşük et kalitesini giderir. Bunun yanında, triploidizasyon yoluyla üretilen steril salmonlar, ergin boya geldiklerinde morfolojik olarak diploid balıklarla aynıdır ve entansif kültür şartları altında fonksiyonları normaldir (Teskeredzic ve diğ., 1993). Yapılan araştırmalar göstermiştir ki, erkek triploid balıklar olgunlaşmakta ve gamet üretmektedir, ancak bu spermler anöplid kromozom komplementleri taşıdığından yaşayabilir döl verme yeteneğinden uzaktır. Triploid dişile ise kısır olup çoğunlukla bağ dokudan ibaret olan küçük ovaryumlarında genelde birkaç olgunlaşmamış yumurta hücresi bulunur (McAndrew ve diğ., 1993).

Triploid balık üretimi, verimliliği artırma çalışmalarının yanında, belli bazı yönetim amaçlarını gerçekleştirmeye yönelik biyoteknolojik bir araç olarak kullanılabilir. Örneğin, triploid ot sazını 3 kromozom takımıyla fonksiyonel olarak steril olmaları nedeniyle rutin olarak akuatik vejetasyonun biyolojik kontrolünde kullanılmaktadırlar (Kerby ve Harell, 1990).

Triploidlerin tanımlanmasında birkaç metot vardır (Purdom, 1993; Lincoln ve Bye, 1989):

- Triploidlerin tanımlanmasında en doğrudan yöntem kromozom sayısının belirlenmesidir.
- Hücrelerin ve nükleuslarının boyutları. En yaygın kullanılan kırmızı kan hücresi yani eritrositlerin büyüklüğüdür.
- Eritrosit çekirdek hacminin incelenmesi ve hücre yoğunluğunun analizi için Coulter sayıcı kullanılması.
- Eritrosit çekirdeğindeki DNA içeriğinin flow sitometri yoluyla belirlenmesi.
- Elektroforez kullanılması.
- Gonad dokusunun histolojik olarak analiz edilmesi.

Triploidizasyon işlemi, *S. salar*, *O. mykiss*, Asya yayın balığı (*Clarias batrachus*), *O. kisutch*, *Perca flavescens*, *Salvelinus fontinalis*, *Salmo trutta morpha trutta* X *Salvelinus fontinalis*, *D. labrax*, *C. carpio*, *Puntius gonionotus* ve *S. aurata* gibi balık türlerinde uygulanmıştır (Johnstone, 1992; Chourrout, 1980; Manickman, 1991; Teskeredzic ve diğ., 1993; Malison ve diğ., 1993; Dube ve diğ., 1991; Doboys ve Goryczko, 1988; Colombo ve diğ., 1995; Cherfas ve diğ., 1990; Koedprang ve Na-Nakorn, 2000; Gorshkov ve diğ., 1998).

Tetraploidizasyon

Tetraploidizasyon, 4 kromozom setli balık üretim işlemidir. Tetraploid balık üretimindeki amaç, bunların diploid balıklarla çaprazlandığına triploid bireylerin elde edilebilmesidir. Normal bir

yumurtanın aktif bir spermatozoa tarafından döllenmekten sonra ilk mitotik bölünme esnasında şok uygulanması ile 4N kromozomlu bireyler elde edilir. Diploid dişilerin tetraploid erkekler tarafından döllenme oranı normal erkeklere kıyasla daha düşüktür. Bu, spermatozoit başının çapıyla ilgili bir durumdur. Dolayısıyla tetraploid dişilerin diploid erkekler tarafından döllenmesi daha mantıklıdır. Bununla birlikte, tetraploid üretimi kolay değildir, fakat gökkuşağı alabalıklarında tetraploid üretimi gerçekleştirilebilmiştir (Johnstone, 1991).

Gen Manipulasyonu

Gen manipulasyonu, bir veya birkaç genin bir hayvandan diğerine transfer edilmesiyle yapılan moleküler bir tekniktir. Bir organizmadan diğer birine gen transferi yoluyla transgenik organizma oluşturma, kavramda oldukça basittir- DNA, nükleus içine enjekte edilir, böylece kromozomal replikasyonda yerini alır ve o hücrenin kalıtım materyalinin bir parçası haline dönüşür. Basit bir fikir olarak gözükmesine karşın, gereken teknoloji oldukça karmaşık ve ayrıntılıdır (Purdom, 1993).

Balıklar, transgenik hayvanların çalışılmasında çok uygun canlı materyallerdir. Birincisi, tek bir dişi balık türlerine göre binlerce farksız yumurta üretir, bunlar dış döllenme geçirir, makroskobik elle müdahaleye toleranslıdır, mikroenjeksiyonda standart mikromanipulatörler kullanılır ve inkübe edilmesi kolay olduğundan enjekte edilen embriyolar, memelilerde gerektiği gibi kompleks manipulasyonlar gerektirmez. Ayrıca, DNA sitoplazma içine enjekte edilmesine karşın transgenik balıklarda DNA entegrasyon oranı(%10-70) oldukça yüksektir (Jiang, 1993).

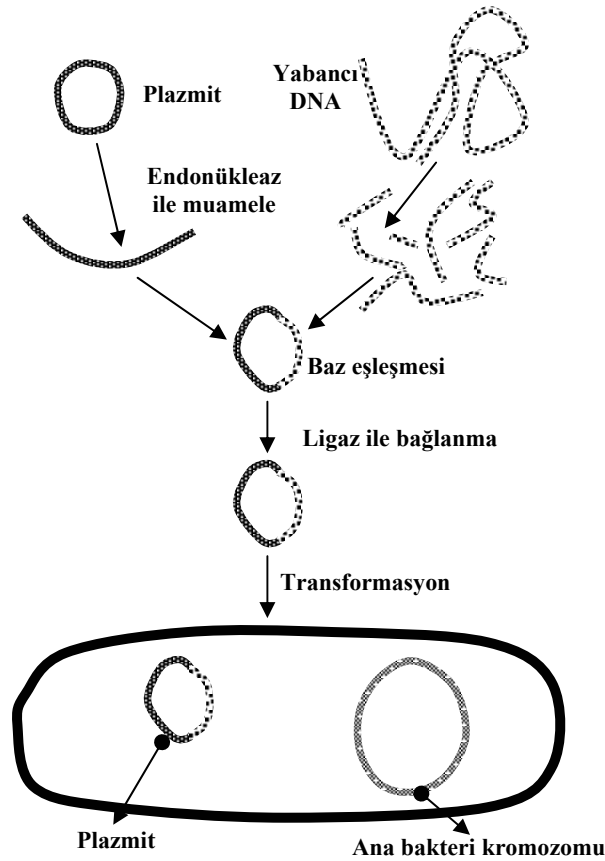
Transgenik İşlemin Temel Adımları (Purdom, 1993)

- Uygun gene karar verilmesi ve yaklaşık

- olarak saf formun elde edilmesi
- ❑ Materyalin bir hücre nükleusuna enjekte edilmesi
- ❑ Materyalin birleşimi, yabancı DNA'nın konak tarafından replike edilmesi
- ❑ Organizmada genin tüm ifadesinin ortaya çıkması

Transgenik çalışmada ilk adım, istenen genin klonlanmasıdır (Şekil 4). Bunu yapmak için seçilen türün kromozomundan seçici enzimler ile hedeflenen gen çıkarılır. Sonra gen bakteri plazmidine içerisine yerleştirilir. Bunun için önce bakteri yerleştirilecek genin yapısında belirli yerden seçici enzimler ile kesilir, gen yerleştirilir ve

bağlayıcı enzimler ile plazmid kapanır. Oluşturulan bu plazma – gen karışımı ozmotik şok yoluyla bakteriyeye aktarılır ve daha sonra bakteri kültüre alınır. Bakteri bölünüp gelişirken plazmidleri de eşler ve bu işlem milyonlarca plazmayı ve plazmaya bağlı olan geni üretir. Hedeflenen miktarda gen oluşuncaya kadar bakterinin üremesine izin verilir ve yeterli miktarda gen kopyası oluşunca bakteriler öldürülür ve böylece gen kopyaları serbest hale geçer. Plazmalar bakterilerden temizlenir ve gen kopyaları plazmadan seçici enzimler kullanılarak çıkartılır (Turan, 2000).



Şekil 4. Hedeflenen genin klonlanması (Keeton ve diğ., 1993).

Yeni bir genin, genetik transferinin etkili kılınabilmesi için uygun bir zamanda, hücre nükleusu içine bu genin kopyalarının enjekte edilmesi gerekmektedir. Eğer bu işlem, döllenmiş yumurtanın ilk mitotik bölünmesinden evvel gerçekleştirilebilirse, o zaman birleşen materyal gelecekteki bütün hücrelere aktarılacaktır. Eğer birleşme öncesi bir veya daha çok mitotik bölünme gerçekleşirse bazı hücreler bu geni içerirken bazılarında olmayacaktır. DNA, yumurtanın animal kutbuna enjekte edilir. Her bir yumurta içine klonlanmış DNA molekülünün yüz binlerce kopyası enjekte edilmelidir, çünkü bunların büyük bir çoğunluğu hücre enzimleriyle tahrip olur ve herhangi bir tanesinin birleşme olasılığı çok düşüktür (Purdom, 1993). Gen aktarımında diğer bir metot ise elektroporasyondur. Bu yöntemde kısa elektrik dalgalarının kullanılmasıyla hücre zarının geçirgenliği sağlanır, bu suretle DNA dahil makromoleküllerin geçişi mümkün olur (Lutz, 2000).

İnsan büyüme hormonu geni nakledilmiş ilk transgenik balığın üretiminden bu yana buna benzer birçok başarılı çalışma gerçekleştirilmiştir (Jiang, 1993). Son yıllarda birçok araştırmacı hızlı gelişme, viral enfeksiyonlara karşı direnç ve donma sıcaklığına karşı direnç gibi amaçlar doğrultusunda ticari balıklar üzerinde gen transferiyle ilgilenmişler ve genelde başarıya ulaşmışlardır.

Sonuç olarak, dünya çapında birçok araştırmacı, hayalleri gerçekleştirme yolunda çabalamaktadır ve bu noktada biyoteknolojik yöntemler, özellikle transgenik çalışmalar, ürün verimliliğini artırma yönünde çok önemli fırsatlar sunmaktadır. Bunun yanında, Türkiye için yabancı türler olan tilapia, ot sazı gibi türlerin ticari ölçekte üretimi planlandığı takdirde çevreye olası zararlarını gidermek amacıyla, öncelikli olarak tam kontrollü üretim stratejileri geliştirilmelidir. Bu yönde biyoteknolojik

yöntemlerin kullanımıyla kontrolsüz üreme engellendiği gibi, daha fazla verim elde edebilmek amacıyla tek cinsiyetli veya kısır populasyonlar oluşturulmalıdır. Bu sayede doğaya kaçmaları durumunda doğal ortamda üreme imkanları yok edildiği gibi, tek cinsiyetli veya kısır populasyon ile yapılan üretimde daha fazla verim elde edilebilecektir.

Kaynakça

- Cherfas, N.B., Kozinsky, O., Rothbard, S. and Hulata, G., 1990. Induced Diploid Gynogenesis and Triploidy in Ornamental (KOI) Carp, *Cyprinus carpio* L.. The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgheh 42(1), 1990, 3-9.
- Chourrout, D., 1980. Thermal induction of diploid gynogenesis and triploidy in the eggs of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). Reprod. Nutr. Develop. 1980, 20(3 A), 727-733.
- Colombo, L., Barbaro, A., Libertini, A., Benedetti, P., Francescon, A. and Lombardo, I., 1995. Artificial fertilization and induction of triploidy and meiogynogenesis in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L.. J. Appl. Ichthyol. 11 (1995), 118-125.
- Diter, A., Quillet, E. and Chourrout, D., 1993. Suppression of first egg mitosis induced by heat shocks in the rainbow trout. Journal of Fish Biology, 42, 777-786.
- Dobozs, S. and Goryczko, K., 1988. Effect of Ployploidization on Survival of Sea, Brook, and Rainbow Trout Hybrids During Incubation and Early Feeding Period. Acta Ichthyologica Et Piscatoria, Vol.XVIII Fasc. 2.
- Dube, P., Blanc, J.M., Chouinard, M. and Noüe, J., 1991. Triploidy induced by heat shock in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Aquaculture, 92 (1991) 305-311.
- Galbusera, P., Volckaert, F.A.M. and Ollevier, F., 2000. Gynogenesis in the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) III. Induction of endomitosis and the presence of residual genetic variation. Aquaculture 185 (2000) 25-42.
- George, T., Pandian, T.J. and Kavumpurath,

- S., 1994. Inviability of YY Zygots of the Fighting Fish, *Betta splendens*. The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgheh 42(1), 1990, 3-9.
- Gorshkov, S., Gorshkova, G., Hadani, A., Gordin, H. and Knibb, W., 1998. Chromosome Set Manipulations and Hybridization Experiments in Gilthead Seabream (*Sparus aurata*). The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgheh 50(3), 1998, 99-110.
- Goryczko, K., Dobożs, S., Mäkinen, T. and Tomasik, L., 1991. UV-irradiation of rainbow trout sperm as a practical method for induced gynogenesis. J. Appl. Ichthyol. 7 (1991), 136-146.
- Güner, Y., Kızak, V., 2001. Commercial methods for control of sexual maturation in rainbow trout (*O.mykiss* W., 1792) culture, (in turkish). XI. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu Bildirileri, Ed.: İ.Akyurt ve N.Başusta, Cilt 2, Hatay.
- Ingram, M., 1988. Farming Rainbow trout in Fresh Water Tanks and Ponds. In: Lindsay Laird and Ted Needham [eds.], Salmon and Trout Farming. E.H.L., England; 155-189p.
- Jiang, Y., 1993. Transgenic fish - gene transfer to increase disease and cold resistance. Aquaculture, 111 (1993) 31-40.
- Johnstone, R., 1991. Production and Performance of Triploid Atlantic Salmon in Scotland. In: V.A. Pepper [ed.], Proceedings of the Atlantic Canada Workshop on Methods for the Production of Non-maturing Salmonids: February 19-21, 1991. Dartmouth, Nova Scotia.
- Johnstone, R., 1992. Production and Performance of Triploid Atlantic Salmon in Scotland. Scottish Aquaculture Research Report, Number 2, ISSN 0964 9484.
- Jungalwalla, P.J., 1991. Production of non-maturing Atlantic Salmon in Tasmania. In: V.A. Pepper [ed.], Proceedings of the Atlantic Canada Workshop on Methods for the Production of Non-maturing Salmonids: February 19-21, 1991. Dartmouth, Nova Scotia.
- Keeton, W.T., Gould, J.L. and Gould, C.G., 1993. Biological Science, fifth edition. W.W. Norton&company, New York, London.
- Kerby, J.H. and Harell, R.M., 1990. Hybridization, Genetic Manipulation, and Gene Pool Conservation of Striped Bass, p.159-190. In R.M. Harell, J.H. Kerby and R.V. Minton [Eds.], Culture and Propagation of Striped Bass and Its Hybrids. Striped Bass Committee Southern Division American Fisheries Society, Bethesda, Maryland.
- Koedprang, W. and Na-Nakorn, U., 2000. Preliminary study on performance of triploid Thai silver barb, *Puntius gonionotus*. Aquaculture 190 (2000) 211-221.
- Lincoln, B. and Bye, V.J., 1989. Genetic techniques for the commercial control of sexual maturation in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). Aquaculture – A Biotechnology in Progress. 1989. De Pauw, N., Jaspers, E., Ackefors, H., Wilkins, N., (Eds), European Aquaculture Society, Bredene, Belgium.
- Lutz, C.G., 2000. Transgenic Fish: Recent Reports. Aquaculture Magazine, Vol.26, number1.
- Lymbery, A.J., 2000. Genetic Improvement in the Australian Aquaculture Industry. Aquaculture Research, 2000, 31, 145-149p.
- Malison, J.A., Kayes, T.B., Held, J.A., Barry, T.B. and Amundson, C.H., 1993. Manipulation of ploidy in yellow perch (*Perca flavescens*) by heat shock, hydrostatic pressure shock, and spermatozoa inactivation. Aquaculture, 110 (1993) 229-242.
- Manickam, P., 1991. Triploidy induced by cold shock in the Asian catfish, *Clarias batrachus* (L.). Aquaculture, 94 (1991) 377-379.
- McAndrew, B.J., Rana, K.J. and Penman, D.J., 1993. Conservation and Preservation of Genetic Variation in Aquatic Organisms, p.295-336. In: J.F. Muir and R.J. Roberts [Eds.], Recent Advances in Aquaculture IV. Institute of Aquaculture, Blackwell Scientific Publications.
- Özden, O., Güllü, K., 1996. Experiments on sexual revision using hormones in cultured fish, (in turkish). E.Ü.Su Ürünleri Dergisi, Cilt 13, No.1-2, sf:199-210, 1996.
- Purdom, C.E., 1993. Genetics and Fish Breeding. Chapman & Hall, Fish and

- Fisheries Series 8.
- Refstie, T., 1983. Induction of diploid gynogenesis in Atlantic salmon and rainbow trout using irradiated sperm and heat shock. Canadian Journal of Zoology, Vol. 61, Number 11, pages 2411-2416.
- Rothbard, S. and Shelton, W.L., 1993. Gynogenesis in the Black Carp, *Myliopharyngodon piceus*. The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgheh 45(2), 1993, 82-88.
- Rothbard, S., 1994. Cloning of *Nishiki-Goi*, Japanese Ornamental (KOI) Carp. The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgheh 46(4), 1994, 171-181.
- Rothbard, S., Rubinstein, I. and David, L., 1999. Ploidy Manipulations Aimed to Produce Androgenetic Japanese Ornamental (KOI) Carp, *Cyprinus carpio* L.. The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgheh 51(1), 1999, 26-39.
- Sheperd, J. and Bromage, N., 1990. Intensive Fish Farming. Oxford, BSP Professional Books.
- Teskeredzic, E., Donaldson, E.M., Teskeredzic, Z., Solar, I.I. and McLean, E., 1993. Comparison of hydrostatic pressure and thermal shocks to induce triploidy in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Aquaculture, 117 (1993) 47-55.
- Turan, C., 2000. Applications of Biotechnology in Aquaculture, (in turkish). IV.Su Ürünleri Sempozyumu, 28-30 Haziran 2000, Erzurum.