

Farklı Sıcaklık Şoku Uygulamalarının Ginogenetik Gökkuşluğu Alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) Erken Hayat Evrelerine Etkisi*

Doğan ATAY¹ Süleyman BEKCAN¹ Murtaza ÖLMEZ¹ Hasan H. ATAR¹

Geliş Tarihi : 03.03.2000

Özet: Bu çalışmada, ginogenetik gökkuşluğu alabalığı (*O. mykiss*) bireyleri elde etmek amacıyla genetik olarak etkisiz hale getirilen inaktif spermalarla döllenmiş yumurtalara farklı sıcaklık şokları (26, 29 ve 31 °C) döllenmeden 300, 320, 330 dakika sonra 5 dakika süreyle uygulanmıştır.

Gözlü yumurta, keseli larva ve yem almaya başlamış yavru açısından en iyi değerler sırasıyla %62.83, %35.48 ve %29.73 olarak döllenmeden 300 dakika sonra 29 °C, en düşük ise sırasıyla %1.44, %0.31 ve %0.0 olarak yine döllenmeden 300 dakika sonra 31 °C sıcaklık uygulanan grupta bulunmuştur ($P<0.05$). Kontrol gruplarında ise aynı veriler sırasıyla %82.74-88.31, %73.32-75.71, %62.68-67.26 olarak bütün muamele gruplarından daha yüksek ve farklı olmuştur ($P<0.05$).

Anahtar Kelimeler: Gökkuşluğu alabalığı (*O. mykiss*), ginogenezis, sıcaklık şoku, inaktif sperma, kuluçka

The Effect of Different Heat Shock on the Early Life Stages of Gynogenetic Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum)

Abstract: In this research, different heat shocks (26, 29 and 31°C) applied 300, 320 and 330 min after insemination for 5 min duration to eggs fertilized by genetically inactivated sperm to produce gynogenetic rainbow trout (*O. mykiss*).

The best result regarding eyed eggs, yolk-sac larvae, feed started fry were obtained at 300 min after insemination and 29 °C heat as 62.83%, 35.48% and 29.73%, respectively. In contrast, the lowest result were obtained at 300 min after insemination and 31 °C heat as 1.44%, 0.31% and 0.0%, respectively ($P<0.05$). Same data in control groups were as 82.74-88.31%, 73.32-75.71%, 62.68-67.26% respectively and better than all other treatments and the differences were statistically important ($P<0.05$).

Key Words: Rainbow trout, (*O. mykiss*), gynogenesis, heat shocks, inactive sperm, hatching.

Giriş

Ginogenezis, kimyasal mutagenler ve ışık radyasyonu ile genetik olarak inaktif hale getirilmiş spermalarla dölenen yumurtalara basınç ve sıcaklık şoku uygulamasıyla zigotun diploidizasyonu sağlanarak, tamamen dişi ebeveyn özelliklerine sahip bireyler elde edilmesidir (Refstie, 1983; Palti et al., 1997). Ginogenetik zigotun diploidizasyonu polar cismin tutulması (mayotik) ve ilk mitoz bölünmenin engellenmesiyle (mitotik) sağlanmakta olup, bu amaçla inaktif spermalarla dölenen yumurtalara mayoz ya da mitoz bölünme aşamasında basınç ve sıcaklık şoku uygulanmaktadır. Erken dönemde yani polar cismin tutulmasına yönelik uygulamalarda daha az oranda haploid birey, daha yüksek oranda heterozigot dişi birey elde edilmesi sözkonusu iken, mitoz bölünmenin engellenmesine yönelik uygulamalarda yüksek oranda haploid düşük oranda tamamen anaya ait özellikleri taşıyan homozigot bireyler elde edilmesi mümkündür

(Chourrou, 1984; Hollebecq et al., 1986; Quillet and Gaignon, 1990; Quillet et al., 1991).

Bitkilerde olduğu gibi balıklarda da tamamen dişi özelliklerini taşıyan homozigot bireylerin elde edilmesi; yetiştiricilik yanında fizyolojik, patolojik veya genetik araştırmalar için uygun deneme materyalleri oluşturması, gen transferi çalışmalarında ek mutanları veya resesif mutasyonları belirlemeye yardımcı olması, kromozomların genetik haritalarının çıkarılabilmesine olanak sağlaması gibi birçok avantajlar sunmaktadır. Bu avantajlar ise; hayvan ıslahının önemli parametrelerinden kalıtım derecesinin daha sağlıklı tahmini, heterozise yönelik yetiştirme programlarının geliştirilmesi, tamamen dişi (monoseks) ve triploid stokların oluşturulması şeklinde pratiğe yansımaktadır.

* Bu araştırma Ankara Üniv. Araştırma Fonu ile TÜBİTAK VHAG tarafından desteklenmiştir.

¹Ankara Üniv. Ziraat Fak. Su Ürünleri Bölümü-Ankara

Salmonlarda ginogenetik bireyler elde etmek amacıyla polar cismin tutulmasına yönelik soğuk şok (Chourrout, 1980; Lemoine and Smith, 1980; Refstie et al., 1982), sıcak şok (Chourrout, 1980; Thorgaard et al., 1981) ilk mitoz bölünmenin engellenmesine yönelik soğuk şok (Chourrout, 1980; Thorgaard et al., 1981) uygulamalarına ilişkin çok sayıda çalışma yapılmış ve dölleme sıcaklığı, uygulanan şok zamanı ve süresine bağlı olarak farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmada ise mitotik ginogenetik tekniklerin geliştirilmesine yönelik olarak dölleme sıcaklığı, döllemeden sonraki uygulama zamanı ve sıcaklık şokunun farklı kombinasyonları denenerek gözlekeli yumurta oranı, keseli larva oranı ve yem almaya başlamış yavruların yaşama oranı tespit edilmiştir.

Materyal ve Yöntem

Damızlık olarak T.C. Orman Bakanlığı Çerkeş Orman Fidanlık Müdürü'ğünden temin edilen 4 yaşında 6 erkek, 9 dişi gökkuşağı alabalığı (*O. mykiss*) kullanılmıştır.

Sıcaklık şoku için su sıcaklığı termostatlı ısıtıcılarla dengelenen (20x15x10) cm boyutlarında ve 10 cm su yüksekliği olan 3 adet cam akvaryum kullanılmıştır.

Yumurtaların kuluçkası; bir soğutma sistemi yardımıyla su sıcaklığı 13°C tutulan, 210 litrelik fiberglas tank üzerine yerleştirilen ve kapalı dolaşım ile ayrı ayrı su akışı verilen her biri 7 bölmeye ayrılmış 4 adet yuvarlak kuluçka tablası kullanılarak sağlanmıştır.

Sağım işlemi her seferinde 3 dişi, 2 erkek damızlık kullanılarak elle yapılmıştır.

Spermaların inaktif hale getirilmesi için (4 mM KCl, 135.5 mM NaCl, 4.2 mM NaH₂PO₄.H₂O, 1.25 mM MgSO₄.7H₂O, 1.25 mM CaCl₂.2H₂O) ve (%0.5 NaHCO₂ ile %0.5 glukoz) içeriğinde iki ayrı çözelti hazırlanarak 4 °C de muhafaza edilmiş, kullanımdan önce 1 ve 2. çözelti (99+1) oranında karıştırılmıştır. Erkek damızlıklardan sağılan eşey hücreleri % 5 oranında bu iki çözeltiden hazırlanan karışımla seyreltilmiş, 5 cm çapında bir petri kutusuna 3 ml koyulup, manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak 15 W'lık UV lambasıyla (254 nm) 45 cm yükseklikten 3 dakika süreyle ışınlanmıştır. Dişilerden sağılan ve kontrol grubu dışındaki muamele gruplarını oluşturan yumurtalar bu spermalarla 13,5 °C de döllemlenmiştir (Palti et al, 1997).

Araştırmada, (3x3x2) faktöriyel deneme planına uygun olarak 3 farklı sıcaklık şoku (26, 29 ve 31°C) döllemeden 300, 320, 330 dakika sonra 5 dakika süreyle uygulanmış ve yumurtalar kuluçka tablasına yerleştirilmiştir. Kuluçka süresince ortalama su sıcaklığı 13,8±0,48 °C olmuştur.

Kuluçka dönemindeki gözlekeli yumurta, keseli larva ve yem almaya başlamış yavru miktarı direk sayımla belirlenmiş ve her dönem için oransal (%) olarak ifade edilmiştir.

Oransal olarak hesaplanan verilere arcsin transformasyonu uygulandıktan sonra varyans analizi yapılmış, grup ortalamalarının karşılaştırılmasında Duncan testi kullanılmıştır (Komen et al., 1991). Bu amaçla Minitab for Windows 10.5 ve MSTAT-C paket programlarından yararlanılmıştır ($\alpha=0,05$).

Bulgular ve Tartışma

Genetik olarak inaktif hale getirilmiş spermalarla 13.5 °C de döllemlenmiş yumurtalara döllemeden 300, 320, 330 dakika sonra farklı sıcaklık (26, 29 ve 31°C) kombinasyonlarının 5 dakika süreyle uygulanmasının gözlekeli yumurta, keseli larva ve yem almaya başlamış yavru elde edilmesine ilişkin sonuçları Çizelge 1'de verilmiştir.

26°C sıcaklık uygulamasında yumurtaların gözlenme oranı en yüksek (%17.49) döllemeden 330 dakika sonra sıcaklık şoku uygulanan grupta olurken en düşük (%16.49) döllemeden 300 dakika sonra sıcaklık şoku uygulanan grupta olmuştur (Şekil 1). Keseli larva ve yeni yem almaya başlamış yavru oranı ise en yüksek döllemeden 320 dakika sonra uygulanan sıcaklık şoku ile %6.90 ve %6.15 olarak, en düşük döllemeden 300 dakika sonra sıcaklık şoku uygulanan grupta sırasıyla %5.04 ve %4.25 olarak tespit edilmiştir. Ancak her üç parametre açısından da deneme grupları arasında istatistiki olarak önemli bir farklılık bulunmamıştır ($P>0.05$).

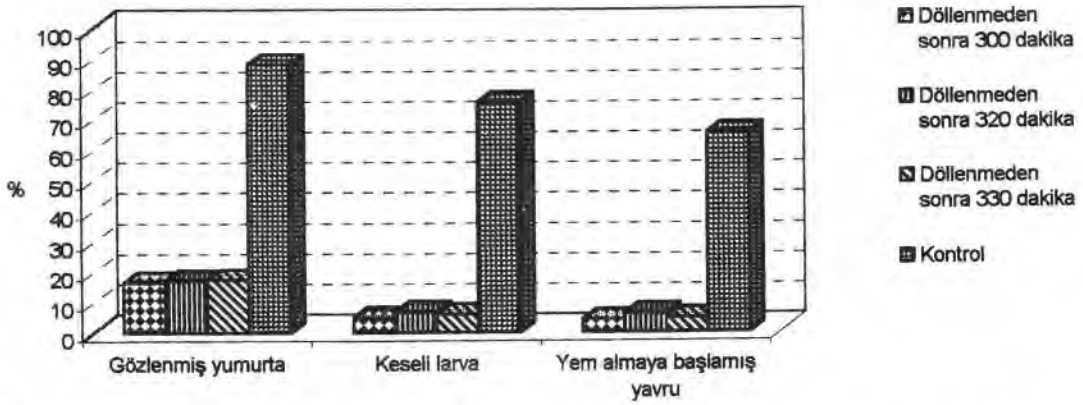
29°C sıcaklık uygulamasında her üç parametre açısından döllemeden 300 dakika sonraki muamele (4. grup) sırasıyla %62.83, %35.48, %29.73 olarak en yüksek sonuçları vermiştir. Gözlekeli yumurta açısından 320 dakika sonra muamele edilen 5. grup ikinci (%57.55), 330 dakika sonra muamele edilen 6. grup üçüncü (%55.24) sırada yer alırken; keseli larva ve yeni yem almaya başlamış yavru açısından 6. grup sırasıyla %33.92 ve %27.74 oranlarıyla 5. gruptan (%32.65 ve %26.45) daha yüksek olmuştur (Şekil 2). Sözkonusu parametreler açısından deneme grupları arasında istatistiki olarak önemli bir farklılık bulunmamıştır ($P>0.05$).

31°C sıcaklık uygulamasında yumurtaların gözlenme oranı, keseli larva ve yeni yem almaya başlamış yavru oranı açısından döllemeden 320 dakika sonra sıcaklık şoku uygulanan 8. grup sırasıyla %31.78, %20.21 ve %17.99 olarak en yüksek değerleri almış, bunu 330 (9.grup) ile 300 (7.grup) dakika sonra şok uygulanan gruplar %5.81, %1.79, %0.78 ve %1.44, %0.31, %0.00 şeklinde takip etmiştir (Şekil 3). Bütün dönemler itibariyle 8. grup her iki gruptan daha yüksek ve istatistiki olarak önemli düzeyde farklılık ($P<0.05$), gösterirken, 7 ve 9. gruplar gözlekeli yumurta döneminde benzer ($P>0.05$), keseli larva ve yeni yem almaya başlamış yavru döneminde istatistiki olarak farklı bulunmuştur ($P<0.05$).

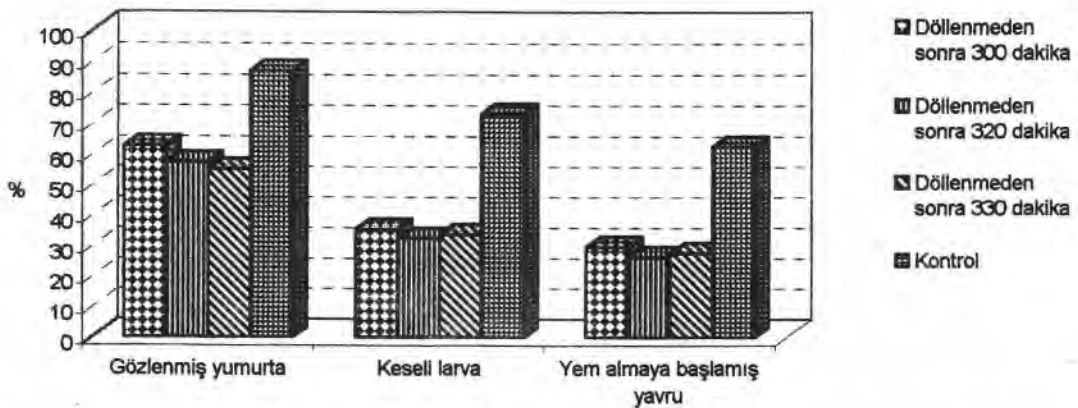
Çizelge 1. Farklı sıcaklık ve sürelerde uygulanan mitotik ginogenez sonuçları

Muamele grupları	Sıcaklık (°C)	Döllenmeden sonra şoklama zamanı (dk)	Şok süresi (dk)	Toplam yumurta (adet)	Göz lekeli yumurta		Keseli larva		Yem almaya başlamış yavru	
					(adet)	(%)	(adet)	(%)	(adet)	(%)
Kontrol I				667±43,98	589±6,50	88,31 a*	505±44,00	75,71 a	438±61,00	65,67 a
1	26	300	5	1389±11,53	229±28,00	16,49 d	70±9,00	5,04 d	59±7,00	4,25 d
2	26	320	5	1464±195,52	253±54,00	17,28 d	101±22,00	6,90 d	90±19,00	6,15 d
3	26	330	5	1281±16,97	224±13,00	17,49 d	77±4,00	6,01 d	62±4,00	4,84 d
Kontrol II				686±62,50	598±15,50	87,17 a	503±42,00	73,32 a	430±52,50	62,68 a
4	29	300	5	713±14,99	448±15,00	62,83 b	253±8,00	35,48 b	212±7,00	29,73 b
5	29	320	5	775±41,01	446±16,00	57,55 b	253±9,00	32,65 b	205±7,00	26,45 b
6	29	330	5	858±92,98	474±26,00	55,24 b	291±16,00	33,92 b	238±13,0	27,74 b
Kontrol III				730±18,53	604±9,00	82,74 a	547±2,00	74,93 a	491±8,50	67,26 a
7	31	300	5	973±49,00	14±9,00	1,44 e	3±0	0,31 c	0	0,0 f
8	31	320	5	856±102,53	272±26,00	31,78 c	173±17,00	20,21 f	154±15,00	17,99 c
9	31	330	5	895±102,53	52±27,00	5,81 e	16±2,00	1,79 e	7±1,00	0,78 e

* Farklı harfler gruplar arası farklılığın önemli olduğunu göstermektedir (P<0,05)



Şekil 1. 26°C sıcaklık uygulanan ginogenetik gökkuşağı alabalığı yumurtalarında gözlenme, keseli larva ve yem almaya başlamış yavru oranı



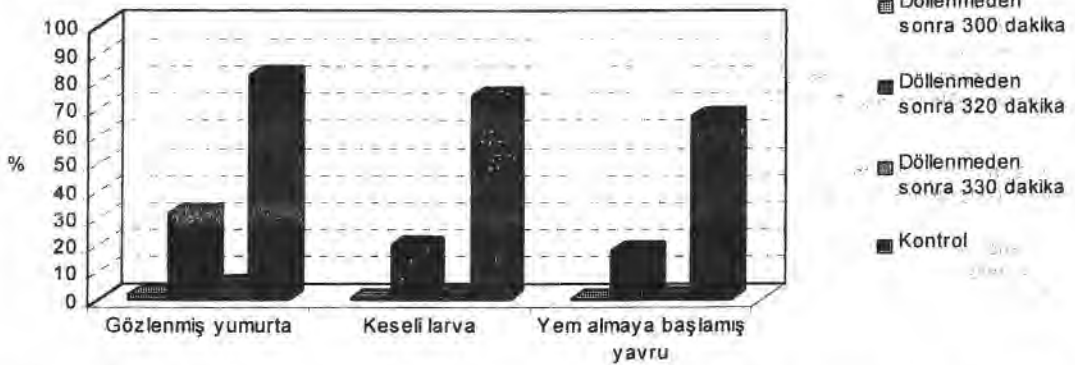
Şekil 2. 29°C sıcaklık uygulanan ginogenetik gökkuşağı alabalığı yumurtalarında gözlenme, keseli larva ve yem almaya başlamış yavru oranı

Yumurtaların döllenmesinden sonraki zaman ve sıcaklık şoku (Şekil 4) dikkate alınarak genel bir değerlendirme yapıldığında; gözlekeli yumurta, keseli larva ve yeni yem almaya başlamış yavru itibarıyla en iyi sonuçlar %62.83, %35.48 ve %29.73 olarak döllenmeden 300 dakika sonra 29 °C sıcaklık uygulanan grupta, en kötü sonuçlar ise %1.44, %0.31 ve %0.00 olarak yine döllenmeden 300 dakika sonra 31 °C sıcaklık uygulanan grupta tespit edilmiştir.

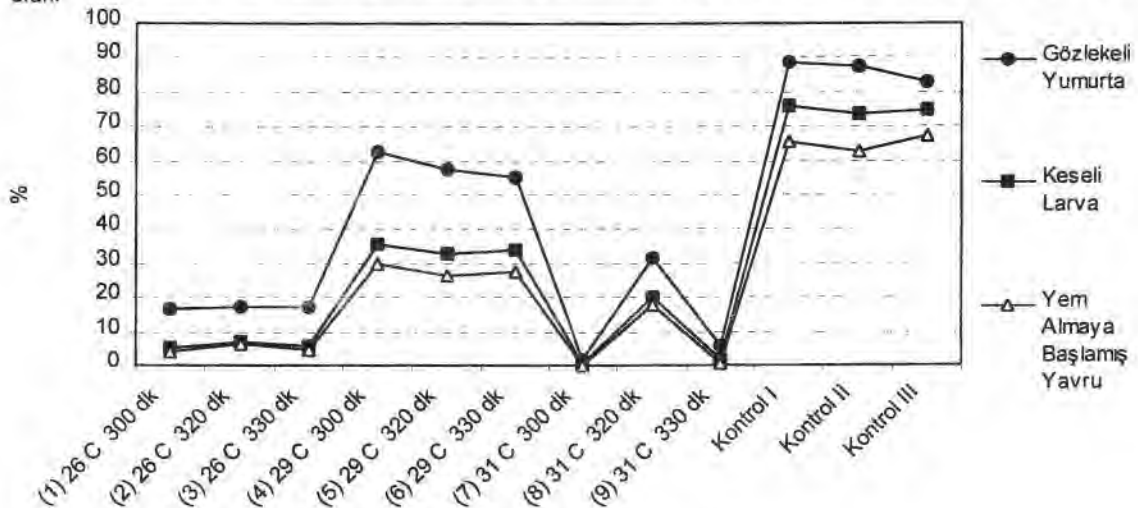
Sonuç

Denemede sonuç itibarıyla kuluçka randımanına yönelik en iyi sonuçlar döllenmeden 300, 320 ve 330 dakika sonra 29 °C sıcaklık şoku uygulanan gruplardan (%26.45-29.73) elde edilmiş, 26 °C deki uygulama maksimum %6.15 olurken, 31 °C de 300 ve 330 dakikalardaki sıcaklık şoku uygulaması tamamen başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Refstie (1983) gökkuşağı alabalığında döllenmeden 10 dakika sonra 24 °C sıcaklık şokunun 20 dakika süreyle uygulanmasında %20.8

gözlekeli, %6.3 keseli larva, döllenmeden yine 10 dakika sonra 26 °C sıcaklık şokunun 10 dakika uygulanmasından %35.3 göz lekeli, %17.4 keseli larva oranı; Purdom et al. (1985) mitoz bölünmenin engellenmesine yönelik sıcaklık şoku uygulamasında %7 kuluçka randımanı elde etmişlerdir. Quillet et al. (1991) 10 °C kuluçka sıcaklığında döllenmeden 210 dakika sonra 31.5 °C sıcaklık şokunun 5 dakika süreyle uygulanmasından %48 gözlekeli, %16 keseli larva ve %13 yem almaya başlamış yavru oranını mitotik ginogenezisden elde edilen yüksek başarı oranlarından biri olarak nitelendirmişlerdir. Palti et al. (1997) gökkuşağı alabalığında kuluçka sıcaklığı, şok sıcaklığı, şok zamanı ve süresine ilişkin farklı uygulamalarda mayotik ginogeneziste %1.59 ile %74.97, mitotik ginogeneziste %0.92 ile %26.91 arasında değişen kuluçka randımanı tespit etmişlerdir. Çalışmamızda 29 °C de elde edilen kuluçka randımanı (%26.45-%29.73) yukarıda belirtilen mitotik ginogenezis sonuçlarının tamamından yüksek olup, sözkonusu sıcaklığın daha dar zaman dilimleri içinde uygulanması, mitoz bölünmede en uygun zamanın yakalanmasına ve maksimum başarı oranının elde edilmesine olanak sağlayacaktır.



Şekil 3. 31 °C sıcaklık uygulanan ginogenetik gökkuşağı alabalığı yumurtalarında gözlenme, keseli larva ve yem almaya başlamış yavru oranı



Şekil 4. Farklı sıcaklık ve sürelerde uygulanan mitotik ginogenez sonuçları (%)

Kaynaklar

- Chourrout, D. 1980. Thermal Induction of Diploid Gynogenesis and Triploidy in the Eggs of the Rainbow Trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Reprod. Nutr. Dev.*, 20: 727-733.
- Chourrout, D. 1984. Pressure - Induced Retention of Second Polar Body and Suppression of First Cleavage in Rainbow Trout Production of All-Triploids and Heterozygous and Homozygous Diploid Gynogenetics. *Aquaculture*, 36, 111-126.
- Hollebecq, M. G., D. Chourrout, G. Wohlfarth and R. Billard, 1986. Diploid Gynogenesis Induced by Heat Shocks After Activation With UV-Irradiated Sperm in Common Carp. *Aquaculture*, 54, 69-76.
- Komen, J., A. B. J. Bongers, C. J. J. Richter, W. B. Muiswinkel and E. A. Huisman 1991. Gynogenesis in Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) II. The Production of Homozygous Gynogenetic Clones and F1 Hybrids. *Aquaculture*, 92 : 127-142.
- Lemoine, H. L. and L. T. Smith. 1980. Polyploidy Induced in Brook Trout By Cold Shock. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 109:626-631.
- Quillet, E., and J. L. Gagnon. 1990. Thermal Induction of Gynogenesis and Triploidy in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) and Their Potential Interest for Aquaculture. *Aquaculture*, 89 (1990) 351-364.
- Quillet, E., G. Pascale, and R. Guyomard, 1991. Analysis of All Homozygous Lines of Rainbow Trout by Gynogenesis. *Journal of Experimental Zoology* 61:2411-2416.
- Palti, Y., Li J. J. and G. H. Thorgaard, 1997. Improved Efficiency of Heat and Pressure Shocks for Producing Gynogenetic Rainbow Trout. *The Progressive Fish-Culturist*, 59:1-13.
- Purdom, C. E., D. Thompson and Y. D. Lou, 1985. Genetic engineering in rainbow trout, *Salmo gairdneri* R., by suppression of meiotic and mitotic metaphase. *J. Fish Biol.*, 27:73-79.
- Refstie, T., J. Stoss and E. M. Donaldson, 1982. Production of All Female Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*) by Diploid Gynogenesis Using Irradiated Sperm and Cold Shock. *Aquaculture* 29:67-82.
- Refstie, T. 1983. Induction of Diploid Gynogenesis in Atlantic Salmon and Rainbow Trout Using Irradiated Sperm and Heat Shock. *Canadian Journal of Zoology* 61:2411-2416.
- Thorgaard, G., M. E. Jazwin and A. R. Stier, 1981. Polyploidy Induced by Heat Shock in the Rainbow Trout. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 110 : 546-550.