



Araştırma Makalesi/Research Article

Gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Yemlerinde Balık Unu Yerine Kullanılan Acı Bakla Ununun (*Lupinus albus*) Bazı İmmünolojik Parametreler ve Gen Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkisi

Ümit Acar^{1*} Ali Karabayır² Osman Sabri Kesbiç³ Sevdan Yılmaz⁴ Fahriye Zemheri⁵

¹ÇOMÜ, Bayramiç Meslek Yüksekokulu, Ormancılık Bölümü, Bayramiç/Çanakkale

²ÇOMÜ, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Çanakkale

³Kastamonu Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü, Kastamonu

⁴ÇOMÜ, Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü, Çanakkale

⁵Bartın Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Bartın

*Sorumlu yazar: umitacar@comu.edu.tr

Geliş Tarihi: 22.03.2018

Kabul Tarihi: 31.05.2018

Öz

Bu çalışmada, gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yavru yemlerinde balık unu yerine farklı oranlarda acı bakla (*Lupinus albus*) unu ikamesinin (% 0(ABU₀), 15(ABU₁₅), 30(ABU₃₀), 45(ABU₄₅) ve 60(ABU₆₀)) gökkuşuğu alabalığı TNF- α , IL-1 β ve IL-8 genlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişim ile bazı immünolojik parametreler üzerine etkileri belirlenmiştir. Besleme denemesinde kullanılan yemler temel protein kaynağı balık unu ve acı bakla unu olmak üzere ortalama %41,5 ham protein ve %18,1 yağ içerecek şekilde hazırlanmıştır. Besleme denemesinde kullanılan yemlerin esansiyel amino asit içeriklerinin tamamı alabalık gereksiniminden yüksek olduğu gözlenmiştir. 60 gün süren deneme sonunda her grupta 15 balıktan kan ve karaciğer doku örnekleri alınmıştır. Alınan kan örneklerinden lizozim (LİZ), myeloperoksidaz (MPO) ve respiratöri burst (RBT) aktivitesi analizleri karaciğer doku örneklerinden gökkuşuğu alabalığına özgü β -aktin, TNF- α , IL-1 β ve IL-8 genleri üzerinden moleküler tetkikler yapılmıştır. Elde edilen bulgulara göre gökkuşuğu alabalığı yavru yemlerinde acı bakla unu kullanımına bağlı olarak TNF- α , IL-1 β ve IL-8 genleri ekspresyon seviyelerinin ve LİZ ve RBT aktivitelerinin artış gösterdiği ($p<0,05$), MPO aktivitesi üzerine etkisi olmadığı gözlenmiştir. Sonuç olarak acı bakla ununun gökkuşuğu alabalığı yemlerinde %60 oranında balık unu yerine ikame edilmesinin gökkuşuğu alabalıklarında bağışıklık sistemini olumlu yönde etkilediği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Oncorhynchus mykiss*, *Lupinus albus*, gen ekspresyonu, bağışıklık sistemi

Effects on Some Immunological Parameters and Gene Expression Levels of Lupin Meal (*Lupinus albus*) Replaced with Fish Meal in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Diets

Abstract

In this study, the effects of different replacement levels of fish meal by lupin (*Lupinus albus*) meal (0%, ABU₀; 15, ABU₁₅; 30, ABU₃₀; 45, ABU₄₅ and 60 ABU₆₀) were investigated in diet for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in terms of TNF- α , IL-1 β and IL-8 genes expression levels and some immunological parameters. Test diets were formulated and prepared to contain 41.5% crude protein and 18.1% fat with fish meal and lupin meal as main protein sources. It was observed that the essential amino acid contents of the experimental feeds was higher than the requirement levels for trout. Blood and liver tissue samples from 15 fish from each group were taken at the end of the 60 days feeding experiment. Analysis of lysosome (LIZ), myeloperoxidase (MPO) and respiratory burst (RBT) activities were performed from the blood samples and β -actin, TNF- α , IL-1 β and IL-8 genes, specific for rainbow trout expression levels, were measured from liver tissue samples. According to the results, expression levels of TNF- α , IL-1 β and IL-8 genes and LIZ and RBT activities were significantly increased ($p<0.05$), while MPO activities did not present any differences by dietary incorporation of lupin meal in rainbow trout feeds. As a result, it has been concluded that the use of lupin meal as a fish meal replacer in rainbow trout feeds might positively affect the immune system in rainbow trout fingerlings.

Keywords: *Oncorhynchus mykiss*, *Lupinus albus*, gene expression, immune system

Giriş

Su ürünleri yetiştiriciliğinin dünya gıda üretimine katkısı son yıllarda artmıştır (FAO, 2010). Üretim sistemleri ve yöntemlerindeki yenilikçi gelişmeler ve yeni türlerin üretime alınmasıyla birlikte su ürünleri üretim endüstrisinin büyümesi hız kazanmıştır. Yetiştiriciliği yapılan balıkların özellikle karnivor türlerin yemlerinde kullanılan temel protein kaynağı balık unudur (Peron vd. 2010; Welch vd.



2010). Balık unu, yüksek protein içeriğine sahip olması, amino asit ve yağ asidi profilinin dengeli olması ve sindirilme oranının da yüksek olması sayesinde balık beslemede önemli rol oynamaktadır (Naylor vd. 2009; Hardy, 2010). Balık unu üretimi, başlıca doğal stoklardan avcılık yoluyla temin edilen balıklara bağlı olması nedeniyle, av miktarındaki değişkenlik balık unu fiyatlarında da dalgalanmalara neden olmaktadır Balık unu üretimi 2004 yılında 6084 milyon ton olur iken, 2013 yılında 4672 milyon tona gerilemiştir. Dünyada, 2012 yılında balık ununun sektörel olarak kullanımları incelendiğinde %68’lik kısmının su ürünleri yetiştiriciliğinde, %23’ünün domuz beslenmesinde, %7’sinin ise tavukçuluk sektöründe kullanıldığı görülmektedir (IFFO, 2015). Su ürünleri yetiştiricilik sektörünün bu denli bağımlı olduğu balık ununun üretim rakamlarının giderek düştüğü ve yetiştiricilik sektörünün de sürekli büyüme halinde olduğu düşünüldüğünde, balık ununun balık yemlerinde temel protein kaynağı olarak kullanılmaya devam edilmesi halinde su ürünleri yetiştiricilik sektörünün uzun vadede sürdürülebilir olması mümkün görülmemektedir. Bu nedenle, balık ununa alternatif olabilecek protein kaynaklarının kullanılabilirliği ve ikame potansiyeli yoğun bir şekilde çalışılmaktadır ve son yıllarda yemlerde balık unu kullanım miktarlarında önemli bir azalma sağlanabilmiştir. Gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), çipura (*Sparus aurata*) ve levrek (*Dicentrarchus labrax*) gibi karnivor balıklarda yemdeki balık unu oranının %50’den %30’lara kadar indirgenme sağlanabilmiştir (Tacon ve Metian, 2008).

Acı bakla unu, dengeli besleme özelliği, lezzet, yüksek oranda sindirilebilir olması ve fiyat gibi özellikleri bakımından balık yemlerinde kullanıma potansiyeli olan bir yem hammaddesidir. Glencross ve ark. (2004) gökkuşuğu alabalığı yemlerinde sarı acı bakla (*Lupinus luteus*) ununun balık ununa %25’i oranında ikame edilebileceği ve bu durumda gökkuşuğu alabalığında herhangi bir büyüme kaybı yaşanmayacağı belirtilmiştir. Atlantik salmon (*Salmo salar*) balıklarında 74 gün süreyle yapılan deneme sonunda iki farklı acı bakla türünün (*L. albus* ve *L. Angustifolius*) yemlerde 250 g/kg oranında kullanılması halinde balıklarda herhangi bir olumsuzluğun görülmeyeceği kaydedilmiştir (Salini ve Adams, 2014).

Yem içeriklerindeki herhangi bir dengesizlik veya ihtiyaç duyulan besin maddelerde bir azalma sözkonusu olduğunda balık sağlığında bazı olumsuzluklara bağlı hastalıklar görülebilmektedir. Yemdeki besin değerlerinin optimum düzeyde tutulması, yemleme yönetiminin uygun olması, ve yetiştiricilik ortamının da hijyen kurallarına uygun olması sayesinde hastalık risklerinin azaltılması mümkündür. Son 30 yılda balık besleme üzerine yapılan çalışmalarda, yem içeriğinin balıkların bağışıklık sistemini önemli derecede etkilediği belirlenmiştir. Ancak, yemlerde kullanılan bitkisel kaynaklı hammaddelerin balık sağlığına olan etkileri konusunda yapılmış çalışmalar oldukça sınırlı sayıdadır (Sicuro ve ark., 2010). Son yıllarda immünolojik genlerin özellikle sitokin genler ve immünolojik parametrelerin balık sağlığı ve refahı üzerine yoğun çalışmalar yapılmaktadır (Secombes ve ark., 2001; Mohanty ve Saho, 2010; Hernandez ve ark., 2013).

Bu çalışmada, yemdeki balık unu yerine ikame edilen acı bakla ununun, gökkuşuğu alabalığında bazı immünolojik parametrelere ve immün genlerin ekspresyon seviyelerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Fakültesi, Canlı Kaynaklar Laboratuvarı’nda gerçekleştirilmiştir. Deneme 100 L kapasiteli kapalı devre plastik tanklarda yürütülmüştür. Denemede günlük olarak %10-15 oranlarında su değişimi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca otomatik zamanlayıcılar yardımıyla 12 saat aydınlık; 12 saat karanlık fotoperiyodu uygulanmıştır. Çanakkale ilinde faaliyet gösteren ticari bir işletmeden getirilen alabalıklar, fiberglas tanklarda stoklanmış ve denemeye başlamadan önce 20 gün süreyle deneme ortamına adaptasyonları sağlanmıştır. Adaptasyon döneminde balıklar günde iki kez olacak şekilde ticari alabalık yemiyle (Agromey) beslenmişlerdir. Her deneme tankında 30 adet balık olacak şekilde 450 adet (5 grup × 3 tekerrür × 30 balık/tekerrür) ortalama 13,92±0,32 g’lık gökkuşuğu alabalıkları bireysel tartımları yapılarak stoklanmıştır. Balıklar günde 2 defa olacak şekilde beslenmişlerdir. 60 günlük besleme denemesi sonunda balıkların bazı immünolojik parametreleri ve bazı immün genlerin ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir.

Balık yemi üreten ticari bir yem firmasından temin edilen balık unu, soya unu, buğday unu, mısır nişastası, balık yağı ve vitamin-mineral karışımı; nem, protein, yağ ve kül gibi besin madde analizleri (AOAC, 1998) yapıldıktan sonra %41 ham protein ve %18 ham yağ içeriğine sahip olarak



bu hammaddelerden formüle edilmiştir (Çizelge 1). Deneme yemleri % 0 (kontrol), %15, %30, %45 ve %60 acı bakla unu ilave edilerek hazırlanmıştır. Yem yapımında kullanılan hammaddeler elendikten sonra öğütülüp, yem rasyonunda belirlenen şekilde tartılıp önce kuru hammaddeler ve sonrasında sıvı olan hammaddeler laboratuvar tipi karıştırıcı ile homojen olana kadar karıştırılmış, ağırlıklarının yarısı kadar distile su ile hamur haline getirildikten sonra peletleme makinasıyla 1 mm boyunda peletlenmiştir. Peletleme işlemi sonrasında nem oranları yüksek olan peletler yaklaşık 40°C’de nem oranları %10olana dek kurutulmuş, deneme başlangıcına kadar -20 °C’de saklanmıştır.

Çizelge 1. Yem hammaddelerinin deneme yemlerinde kullanım oranları ve grupların besin madde oranları (% kuru madde)

İçerik (%)	ABU ₀	ABU ₁₅	ABU ₃₀	ABU ₄₅	ABU ₆₀
Balık unu ¹	62	52,7	43,4	34,1	24,8
Acı bakla unu	0	15	30	45	60
Mısır nişastası	12	9	6	3	0.2
Buğday unu	12	9.3	6.6	3.9	1
Balık yağı ²	12	12	12	12	12
Vitamin Mineral ³	2	2	2	2	2
Toplam	100	100	100	100	100
Kimyasal kompozisyon (%)					
Ham Protein	41,6	41,8	41,5	41,6	41,4
Ham yağ	18,4	18,2	18,0	18,1	18,1
Ham kül	9,56	9,20	8,90	8,56	8,25

¹Hamsi balık unu. Koptur Balıkçılık. Trabzon.Turkey

²Hamsi balık yağı.Agromarin Yem San. ve Tic. A.Ş.. İzmir.Turkey

³Vitamin karışımı: Vitamin A. 18000 IU kg⁻¹yem; Vitamin D₃. 2500 IU kg⁻¹yem; Vitamin E. 250 mg kg⁻¹yem Vitamin K₃. 12 mg kg⁻¹ yem; Vitamin B₁. 25 mg kg⁻¹yem; Vitamin B₂. 50mg kg⁻¹yem; Vitamin B₃. 270 mg kg⁻¹yem; Vitamin B₆. 20 mg kg⁻¹yem; Vitamin B₁₂. 0,06 mg kg⁻¹yem; Vitamin C. 200 mg kg⁻¹yem; Folik asit. 10 mg kg⁻¹yem; Kalsiyum d–pantothenate. 50 mg kg⁻¹yem; Biotin. 1 mg kg⁻¹yem; İnositol. 120 mg kg⁻¹yem; Kolin Klorid. 2000 mg kg⁻¹yem. Mineral karışımı(mg kg⁻¹): Fe. 75,3 mg; Cu. 12,2 mg; Mn. 206 mg; Zn. 85 mg; I. 3 mg; Se. 0,350 mg; Co. 1 mg.

Çizelge 2. Deneme yemlerinin amino asit kompozisyonu ve gökkuşağı alabalığının amino asit ihtiyacı (g/kg)

EAA (g/kg)	ABU ₀	ABU ₁₅	ABU ₃₀	ABU ₄₅	ABU ₆₀	Gökkuşağı alabalığı*
Arjinin	21,3	22,4	24,7	25,2	24,1	14
Lizin	38,2	35,8	33,1	24,5	22,6	21
Histidin	15,1	12,9	13,2	10,3	8,4	6
Fenilalenin	28,9	26,4	23,8	20,1	18,8	13
Leusin	32,9	29,7	24,2	21,6	19,9	18
İzoleusin	21,1	18,7	15,9	12,3	11,1	10
Mitiyonin	14,1	13,6	11,9	11,1	9,8	8
Sistin	5,1	4,7	4,3	4,5	4,1	4
Valin	24,8	22,1	20,8	18,9	19,1	13
Treonin	21,7	19,8	19,1	17,9	16,1	14

*Ogino ve Hanri, (1980); EAA, Esansiyel amino asit

Balıklardan Serum Örneklerinin Alınması

60 günlük besleme denemesi sonunda her bir tanktan 5 adet olmak üzere toplamda 15 balık/grup olacak şekilde balıklardan kan alınmıştır. Balıklar deneme tanklarından rastgele ve hızlıca yakalandıktan sonra, en kısa sürede doğal bir bayıltıcı olan ve yaygın olarak kullanılan karanfil yağı (20 mg/L) bulunan kova içerisinde bayıltılmıştır (Iversen ve ark., 2003). Bayılma işleminden sonra balıkların anüs yüzgecinin hemen arkası alkolle temizlenmiş (kana mukoza karışmasını önlemek amacıyla) ve sonra 2,5 ml lik plastik enjektör yardımıyla kaudal venadan kan alınmıştır. İmmünolojik analizler için jelli tüplere alınan kan 5000 dv/dk oranında 10 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen serum -80 °C’de immünolojik analizler yapılabildiği kadar saklanmıştır.



Lizozim Aktivitesi

Lizozim aktivitesinin tespit edilmesi için Nudo ve Catap (2011) tarafından bildirilen yöntem kullanılmıştır. Özetle, 25 µl serum örneği 175 µl *Micrococcus luteus* süspansiyonuna (pH 5,8) eklenmiştir ve 96 plakada örnekler 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Okumalar 450 nm’de multiskan mikropilaya okuyucuda yapılmış ve standart kullanılarak (L6876 Sigma, Lysozyme – yumurta akından elde edilmiş) µg/mL olarak standart eğriden hesaplanmıştır.

Myeloperoksidaz Aktivitesi

Myeloperoksidaz aktivitesi literatürde bildirilen metotlarda bazı modifikasyonla analiz edilmiştir (Quade ve Roth 1997; Kumari ve Sahoo 2006). Analiz için 10 µl serum örneği 90 µl HBSS solüsyonu ile seyreltilmiştir. Devamında bu karışıma 3,3',5,5'- tetramethylbenzidine dihydrochloride ve hidrojen peroksit içeren solüsyon ilave edilmiş ve reaksiyon 2 dakika sonra 35 µl sülfirik asitle durdurulmuştur. Okumalar 450 nm’ de multiskan mikropilaya okuyucuda yapılmıştır.

Respiratöri Burst Aktivitesi

Fagositlerin respiratöri burst aktivitesi Stasiak ve Baumann (1996) bildirdiği yöntemde bazı modifikasyon ile tespit edilmiştir. Analizde her bir balık için 50 µL kan örneği poli-l-lizin kaplı 96 plaka içerisine yerleştirilmiştir. Devamında örnekler 1 saat inkübasyona bırakılmış ve üst faz atılıp örnekler HBSS ile 3 kez yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra her bir kuyucuğa 100 µL % 0,2 NBT solüsyonu ilave edilmiş ve plaka 1 saat daha inkübasyona bırakılmıştır. Devamında hücreler %100 metanol ile 5 dakika fikse edilmiş ve 3 kez % 70 lik metanol ile yıkanmışlardır. Plakalar kuruduktan sonra her bir kuyucuğa 60 µL 2 M potasyum hidroksit ve 70 µL DMSO ilave edilmiş ve okumalar multiskan spektrofotometrede (Thermo Multiskan Go) 620 nm de yapılmıştır.

Moleküler Analizler

RNA İzolasyonu ve RNA’ların Kalite Kontrolü

60 günlük besleme denemesi sonunda deney gruplarından otopsi yapılarak alınan karaciğer doku örnekleri RNAlater Solüsyonuna (ThermoFisher Scientific) alınmış ve -80°C’de uygulama yapılana kadar saklanmıştır. -80°C’den çıkarılan örnekler GeneJet RNA Purifikasyon Kit (ThermoFisher Scientific) kullanılarak RNA izolasyonu yapılmış ve izole edilen RNA’ların kalitesi ve miktarı Multiskan™ FC Mikroplate Fotometre (Thermo) cihazı ile ölçülmüştür. Aynı zamanda agaroz jelde RNA’ların kalitesi kontrol edilmiştir.

DNaz Uygulaması ve cDNA Eldesi

RNA’lardan DNA’yı uzaklaştırmak için 1 µg kalıp RNA, 1 µl 10X Reaksiyon Solüsyonu, 1 µl RNaz içermeyen DNaz-I (Thermo Scientific) eklenerek ve nükleaz içermeyen su ile toplam hacim 10 µl’ye tamamlanmıştır. Daha sonra 30 dk 37°C ve 10 dk 65°C’de inkübasyona bırakılmıştır. DNaz-I uygulanan RNA’dan RevertAid H Minus Single Strand cDNA Sentez Kit (Thermo Scientific) yardımıyla cDNA sentezi yapılmıştır.

Primer Tasarımı

Oncorhynchus mykiss’a özgü β -aktin, TNF- α , IL-1 β ve IL-8 genlerine ait mRNA dizilerinden ve FastPCR 6.0 (Kalendar ve ark., 2009) bilgisayar paket programından yararlanılarak primer tasarımı gerçekleştirilmiştir. Primer dizileri, toplam baz uzunlukları ve gen bankası numaraları Çizelge 3’de verilmiştir.

Çizelge 3. Çalışmada kullanılacak primer dizileri.

Gen	Oligonükleotid dizisi	Ürün boyutu (bp)	Gen Bankası No
<i>β-Aktin</i>	F GCCGCGACCTCACAGACTACC	126	NP_001117707.1
	R CAAAGTCCAGCGCCACGTAGCA		
<i>TNF-α</i>	F GGGGACAAACTGTGGACTGA	1056	NM_001124357.1
	R GAAGTTCTTGCCCTGCTCTG		
<i>IL-1β</i>	F GGAGAGGTTAAAGGGTGGCGA	106	AJ223954
	R TGCCGACTCCAACCTCCAACA		
<i>IL-8</i>	F GAATGTCAGCCAGCCTTGTC	226	AJ279069.1
	R TCCAGACAAATCTCCTGACCG		



Real-time PCR

Seçilen genlerin ve housekeeping gen (β -Aktin) ekspresyonu, balıkların karaciğer dokularından alınan örnekler real-time PCR cihazında incelenmiştir. β -aktin, $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ ve $IL-8$ genlerine özgü tasarlanan primerler özgül olmayan bağlanmayı engelleyecek şekilde tasarlanmıştır. cDNA'lar real-time PCR tekniği ve Maxima SYBR Green qPCR Master karışımı kullanılarak çoğaltılmıştır. Bu amplifikasyon sırasında çift zincirli DNA'ya bağlanan SYBR Green miktarı florimetrik deteksiyon filtresiyle ölçülmekte ve bu ölçümlerde floresan ışımaya, DNA ürünü ile orantılı olarak değişmektedir. Real-time PCR cihazı, erime eğrisi analizi yapabilme özelliği ile primer dimer oluşumu ve özgül olmayan amplifikasyon ürünleri gibi hataları gözlemlemeye de olanak sağlamaktadır.

Real-time PCR reaksiyonları hazırlanırken, standart eğrilerin çizilebilmesi amacıyla kontrol grubundan elde edilen cDNA örneğinden elde edilen ölçümlerle β -aktin arasındaki ölçümlerin değerlendirilmesi aşamasında analiz programı ile standart eğriler çizilmiştir. Seçilen zaman noktalarında eksprese olan β -aktin, $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ ve $IL-8$ gen ekspresyon miktarları ile karaciğer dokularından elde edilen cDNA ile gen ekspresyon seviyeleri kontrol grubu arasındaki ilişki incelenmiştir.

PCR karışımı, 1 μ l forward primer (10 pmol), 1 μ l revers primer (10 pmol), 10 μ l SybrGreen karışımı (Maxima SYBR Green qPCR Master Karışımı ve ROX Solüsyonu, (Thermo Scientific)), 1 μ l cDNA ve 7 μ l su eklenmiş, toplam hacim 20 μ l'ye olacak şekilde ayarlanmıştır. PCR'da her gene özgü döngü sayıları ve sıcaklık değerleri Çizelge 4'de verilmiştir.

Çizelge 4. Çalışılan genlere ait PCR koşulları

Gen	Başlangıç Ayrılma			Ayrılma		Yapışma		Uzama		Döngü Say
	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)	
β -Aktin	95	10	1	95	30	55	30	72	30	35
$TNF-\alpha$	95	10	1	95	30	59	30	72	30	40
$IL-1\beta$	95	10	1	95	30	58	30	72	30	40
$IL-8$	95	10	1	95	30	58	30	72	30	40

Agaroz Jel Elektroforezi

İzole edilen RNA örneklerinin kalitesi agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir. Agaroz jel miktarı 1g agaroz (Merck) ve 50 ml 1×TAE (Tris asetat EDTA) Solüsyonu (Merck) ile hazırlanmıştır. 2 μ l RedSafe renklendirme solüsyonu (İntron Biotechnology), yükleme tamponu (6XTriTrack™ DNA Loading Dye, Thermo Scientific), marker (Gene Ruler 50bp Marker Plus (Thermo Scientific)) kullanılmıştır. Thermo Electron Corporatin 4000P Power Supply ile 70 V/cm 'da 1 saat koşturularak, Jel Görüntüleme ve Analiz Sistemi ile (Vilber Lourmat) UV lamba altında görüntülenmiştir.

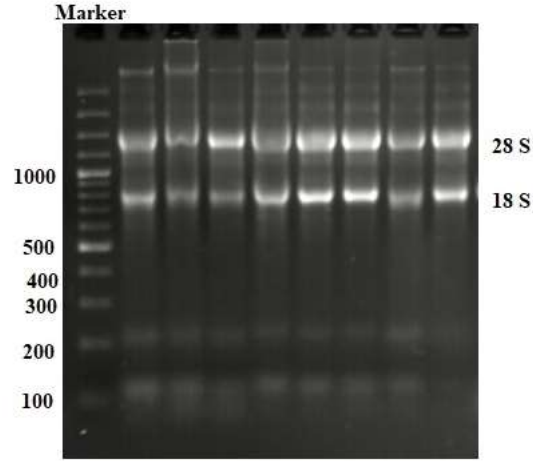
İstatistiksel Analiz

Çalışmada, deney grupları arasındaki farklılık ve ortalamalar her bir gen bakımından tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) ve ikili Tukey testi ile yapılmıştır. Tüm veriler SPSS 15,0 Windows paket programı kullanılarak analiz edilmiştir.

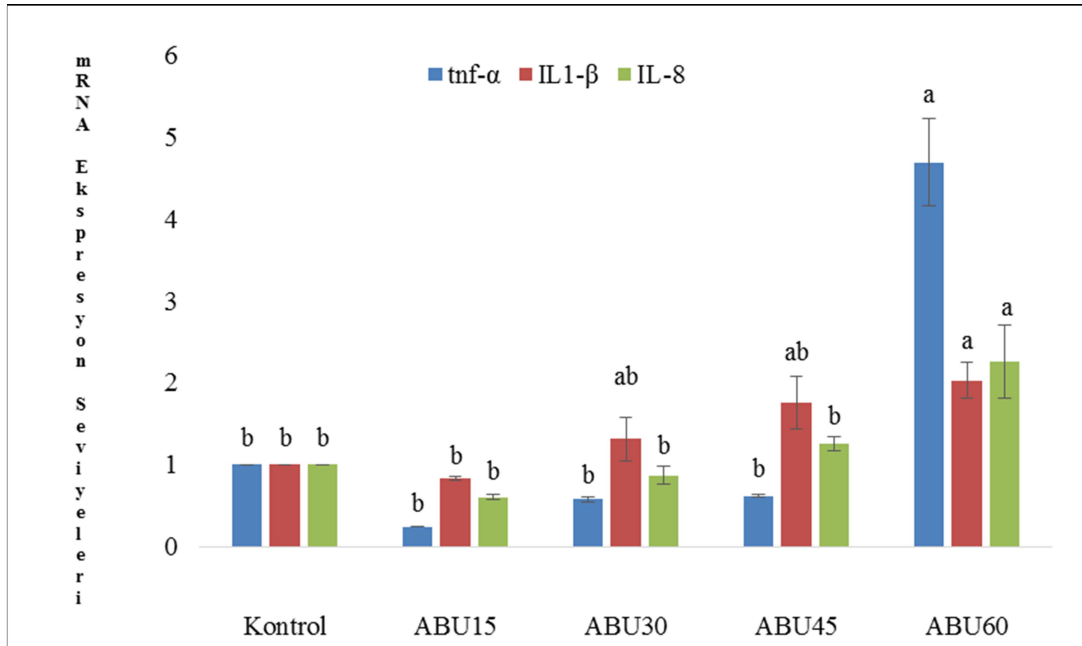
Bulgular

Bu çalışmada, gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yemlerinde acı bakla ununun (*Lupinus albus*) gen ekspresyon seviyelerindeki etkisi karaciğer dokusundan alınan örneklerle incelenmiştir. Balıkların karaciğer dokularından elde edilen RNA'ların saflığı Multiskan™ FC Mikroplate Fotometre (Thermo) cihazında A260/A280 UV dalga boylarında ölçülerek, emilim oranı 2,0-2,3 arasında olan örnekler tercih edilmiş ve izole edilen RNA örneklerinden bazıları Şekil 1'de gösterilmiştir. Şekil 2'de gösterildiği gibi $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ ve $IL-8$ gen ekspresyon seviyelerindeki değişime bakıldığında, % 0 (kontrol), %15, %30, %45 ve %60 acı bakla unu uygulanan gruplarda tüm genlerde doz artışına bağlı olarak ekspresyon seviyesinin arttığı gözlenmiştir. ABU₆₀ grubu yemle

beslenen grubun gen ekspresyon seviyeleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında belirgin şekilde farklı bulunmuştur ($p>0.05$). Besleme denemesi sonunda yemlerinde çeşitli oranlarda acı bakla unu kullanılarak beslenen gökkuşuğu alabalıklarının serum immünolojik bulguları Çizelge 5’te verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, Respiratöri burst aktivitesi (RBA) bulguları bakımından ABU₄₅ ve ABU₆₀ grubu yemlerle beslenen gökkuşuğu alabalıklarının ABU₀ (kontrol) yemi ile beslenen balıklardan yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Benzer şekilde serum lizozim aktivitesi de (LİZ) ABU₄₅ ve ABU₆₀ gruplarında kontrol grubuna göre yüksek bulunurken ($p<0.05$) serum myeloperoksidaz aktivitesi (MPO) deneme grupları arasında farklılık göstermemiştir ($p>0.05$).



Şekil 1. RNA örneklerinin elektroforez görüntüsü



Şekil 2. Balıkların karaciğer dokularındaki *TNF-α*, *IL-1β* ve *IL-8* mRNA düzeylerinin β -aktin mRNA düzeylerine göre nisbi değişimi. Farklı harfler $p<0,001$ seviyesinde deneysel gruplardaki etkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir ($n=6$).

Çizelge 5. Deneme süresince immünolojik parametrelerdeki değişimler

	ABU ₀	ABU ₁₅	ABU ₃₀	ABU ₄₅	ABU ₆₀
RBA	0,14±0,05 ^b	0,13±0,03 ^b	0,11±0,04 ^b	0,24±0,06 ^a	0,21±0,03 ^a
LİZ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	7,46±3,17 ^b	8,44±2,36 ^b	11,43±5,19 ^{ab}	11,84±2,66 ^{ab}	15,85±1,25 ^a
MPO (U L^{-1})	0,47±0,11 ^a	0,48±0,12 ^a	0,52±0,06 ^a	0,53±0,10 ^a	0,56±0,07 ^a

Aynı satırdaki üst yazılarla aynı harflere sahip değerler önemli ölçüde farklı değildir ($P> 0.05$).



Tartışma

Gökkuşığı alabalığı yemlerinde balık unu yerine kullanılabilir birçok alternatif bitkisel protein kaynağı test edilmiştir. Bu çalışmalar sonunda kullanılan alternatif protein kaynakları, temel protein kaynağı balık unu olan kontrol yemlerine nazaran büyümeyi düşürmüştür (Gatlin ve ark., 2007; Lim ve ark., 2008). Benzer şekilde, yetiştiriciliği yapılan balık türlerinin yemlerine eklenen bitkisel protein kaynakları düşük protein oranları, dengesiz amino asit içerikleri ve yapılarında buldukları toksinle ile anti besinler faktörleri sebebiyle balıkların immün sistemlerinde olumsuz etkilemiştir (Montero ve ark., 2003, 2010; Dong ve ark., 2000). Yemlerdeki balık unu ikame seviyeleri yükseldikçe, alternatif kaynaklardan amino asitlerin içeriği ve biyoyararlanma gücü düşebilir. Bitkisel proteinlerin, özellikle de besin zincirinde görünmeyen bir kaynaktan elde edilen bitki proteinlerinin dahil edilmesi, amino asit profilinde dengesizliğe yol açabilir. Ancak, bu çalışmada gökkuşığı alabalığının amino asit ihtiyacını karşılayacak şekilde yeme %15, %30, %45 ve %60 oranlarında acı bakla unu balık unu yerine kullanılmış ve serum lizozim aktivitesi, myeloperoksidaz aktivitesi, respiratöri börs aktivitesi ve bazı immün genlerin ekspresyon seviyeleri incelenmiştir.

Önceki balık besleme çalışmalarında, yem bileşenlerinin balıklarda sağlık durumunu ve gen ekspresyon seviyelerini etkilediği bildirilmektedir (Spielbauer ve Stahl, 2005). Mevcut çalışmada, TNF- α geninin ekspresyon seviyesi ABU₆₀ grubu yemle beslenen grupta diğer gruplar ile karşılaştırıldığında belirgin derecede yüksek bulunmuştur. Diğer çalışılan IL-1 β ve IL-8 genlerin ekspresyon seviyeleri gruplar arasında farklılık göstermemiştir. TNF- α doğuştan gelen bağışıklık sisteminin ve doku hasarının belirlenmesi için güvenli bir göstergedir (Secombes ve ark., 2001; Cho ve ark., 2001). Karaciğerde TNF- α geninin ekspresyon seviyesinin artışına benzer bir sonuç, Sealey ve ark., (2009) tarafından yapılan bir çalışmada, gökkuşığı alabalığı yemlerine %43 oranında soya unu kullanıldığında da tespit edilmiştir. IL-1 β ve IL-8 genleri balık bağışıklık sisteminde görevli diğer önemli sitokinlerdir. Balığın bulaşıcı hastalıklara yanıt vermesinde aracılık eder. Birçok çalışma TNF- α , IL-1 β ve IL-8 sitokinlerinin balıklarda beslenmeye bağlı olarak değiştiğini göstermiştir (Kiron, 2012). Bu çalışmanın sonuçlarına dayanarak gökkuşığı alabalığı yemlerinde balık unu yerine kullanılan acı bakla ununun balıkların immün yanıtını kuvvetlendirdiği ve olumsuz etki yaratmadığı kanısına varılabilir. Benzer şekilde Nil tilapyası (*Oreochromis niloticus*) yemlerine eklenen Spiriluna ununun TNF- α ve IL-1 β genlerinin ekspresyon seviyelerini arttırdığı bildirilmiştir (Mahmoud ve ark., 2018). Ayrıca benzer sonuçlar Gu ve ark., (2016) tarafından balık unu yerine soya unu kullanılarak 60 gün boyunca beslenen kalkan (*Scophthalmus maximus*) balıklarının bağırsaklarında da tespit edilmiştir.

Acı bakla ununun balıklarda immünolojik yanıtı olan etkilerini belirlemek için yapılan çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Lizozim, balıklarda spesifik olmayan bağışıklık sisteminin tepkilerinde önemli rol oynar ve balıkların serumlarında, yumurtalarında ve mukuslarında bulunur. Bu çalışmada serum lizozim aktiviteyi yem rasyonundaki acı bakla ununun artışına bağlı olarak yükselmiş ve en yüksek ABU₆₀ grubu yem ile beslenen balıklarda tespit edilmiştir. Benzer şekilde sıcaklık uygulanmış soya unu kullanılan yemle beslenen kanal yayın balığında (*Ictalurus punctatus*) serum lizozim seviyesini artırmıştır (Peres ve ark., 2003). Rumsey ve ark. (1994) ve Krogdahl ve ark. (2000) Atlantik salmon balıklarında yürüttükleri çalışmalarda yeme eklenen soya ununun balığın büyüme performansını düşürürken, serum lizozim miktarını artırdığını belirtmişlerdir ve bunun sebebinin yemde kullanılan soya ununun bağırsakta aşırı duyarlılığa neden olmasının bir sonucu olabileceğini kaydetmişlerdir. Buna karşılık, Bransden ve ark. (2001) tarafından yapılan çalışmada gökkuşığı alabalığı yemlerine balık ununun %40'ına ikame edilen acı bakla ununun lizozim aktivitesinde herhangi bir etki göstermediği bildirilmiştir. Balıklarda immün sistemin diğer bir göstergesi olarak kabul edilen myeloperoksidaz aktivitesinin mevcut çalışmada gruplar arasında farklılık göstermediği tespit edilmiştir. Bitkisel kaynaklı hammaddelerde bulunan endojen anti-besin faktörleri, işleme ve biyoteknolojik yöntemlerle bertaraf edilmez ise, balıklara toksik etkiye yol açabilir (Tacon, 1995). Bu sonuçlara dayanarak acı bakla ununun gökkuşığı alabalığı yemlerinde balık ununun %60'ı yerine ikame edilebileceği, bu orana kadar yapılan katkının balık sağlığına herhangi bir olumsuz etki göstermeyeceği sonucuna varılabilir. Ancak, Rumsey ve ark. (1994) mevcut çalışmadan farklı olarak gökkuşığı alabalığı yemlerinde balık unu yerine soya unu kullanıldığında serum myeloperoksidaz seviyesinin arttığını bildirmişlerdir. Bu farklılık kullanılan hammaddeler üzerinde uygulanan ön işlemlerden kaynaklanabileceği gibi, içerdikleri tripsin inhibitörü, oligosakkaritler ve lektin gibi anti-besin faktörlerden de kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, amino asitler,



savunma mekanizmalarında antikorlar gibi bir dizi proteinin sentezinde ve bağışıklık düzenleyici olarak önemli fonksiyonlara sahiptir ve Özellikle arginin, glutamin ve sistein bağışıklık ve hastalık direncini artırıcı yönüyle insan gıdasında ve hayvan besinlerinde yapılan çalışmalarda öne çıkmaktadır. Li ve ark. (2007) tarafından da vurgulandığı gibi, yemlerin amino asit profilinde herhangi bir dengesizlik besinlerin değerlendirme gücüne veya sindirilme oranlarına olumsuz etki gösterebileceği anlaşılmaktadır. Yapılan bu çalışmada da amino asit profilinin balıklarda ihtiyaç duyulan minimum düzeyin üzerinde olmasına özen gösterilmiş ve sonuçların amino asit profilinden etkilenmemesi sağlanmıştır.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre, gökkuşağı alabalıklarında yemdeki balık ununun acı bakla unu ile %60 oranında ikame edilebileceği ve bu durumun balıkların bazı serum immün parametrelerinde ve genlerin ekspresyon seviyelerinde herhangi bir olumsuzluğa yol açmayacağı sonucuna varılmıştır.

Teşekkür

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FBA-2017-1217 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

- AOAC, 1998. Official Methods of Analysis of AOAC International., Gaithersburg MD.
- Brandsen, M.P., Carter, C.G., Nowak, B.F., 2001. Effects of dietary protein source on growth, immune function, blood chemistry and disease resistance of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr. Anim. Sci. 73: 105–114.
- Cho, K., Adamson, L. K., Greenhalgh, D. G., 2001. Parallel self-induction of TNF- α and apoptosis in the thymus of mice after burn injury. J. Surg. Res. 98(1): 9-15.
- Dong, F.M., Hardy, R.W., Higgs, D.A., 2000. Antinutritional factors. In: Encyclopedia of Aquaculture (Stickney, R.R. ed.), pp. 45–51. John Wiley & Sons, Inc., New York, USA.
- Gatlin, D. M., Barrows, F. T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T. G., Hardy, R. W., Herman, E., Hu, G., Krogdahl, Å., Nelson, R., Overturf, K., Rust, M., Sealey, W., Skonberg, D., J Souza, E., Stone, D., Wilson, R., Wurtele, E., 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. Aquac. Res. 38: 551–579.
- Glencross, B. D., Carter, C. G., Duijster, N., Evans, D. R., Dods, K., McCafferty, P., Hawkins, E., Mass, R., Sipsas, S., 2004. A comparison of the digestibility of a range of lupin and soybean protein products when fed to either Atlantic salmon (*Salmo salar*) or rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 237(1-4): 333-346.
- Gu, M., Bai, N., Zhang, Y., Krogdahl, Å., 2016. Soybean meal induces enteritis in turbot *Scophthalmus maximus* at high supplementation levels. Aquaculture. 464: 286-295.
- Hardy, R.W., 2010. Utilization of plant proteins in fish diets: Effects of global demand and supplies of fishmeal. Aquacult Res. 41:770-776.
- Hernández, A. J., Román, D., Hooft, J., Cofre, C., Cepeda, V., Vidal, R., 2013. Growth performance and expression of immune-regulatory genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles fed extruded diets with varying levels of lupin (*Lupinus albus*), peas (*Pisum sativum*) and rapeseed (*Brassica napus*). Aquacult. Nutr. 19(3): 321-332.
- Iversen M., Finstad B., McKinley R.S., Eliassen R.A., 2003. The Efficiency of Metomidate Clove Oil AQUI-S™ and Benzoak® as Anaesthetics in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Smolts and Their Potential Stress-Reducing Capacity. Aquaculture. 221 (1-4): 549-566.
- Kalendar, R., Lee, D., Schulman, A. H., 2009. Fast PCR Software for PCR Primer and Probe Design and Repeat Search. Genes. Genomes and Genomics. 3(1); 1-14.
- Kiron, V., 2012. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. Anim. Feed. Sci. Tech. 173(1-2): 111-133.
- Krogdahl, Å., Bakke, M., Baeverfjord, G., 2000. Feeding Atlantic salmon, *Salmo salar* L., soybean products: effects on disease resistance (furunculosis), and lysozyme and IgM levels in the intestinal mucosa. Aquacult. Nutr. 6: 77–84.
- Kumari J., Sahoo P.K., 2006. Dietary Levamisole Modulates the Immune Response and Disease Resistance of Asian Catfish *Clarias batrachus* (Linnaeus). Aquac. Res. 37: 500-509.
- Li, P., Yin, Y. L., Li, D., Kim, S. W., Wu, G., 2007. Amino acids and immune function. Brit. J. Nutr. 98 (2): 237-252.
- Lim, C., Lee, C. S., Webster, C. D., (Eds.). 2008. Alternative protein sources in aquaculture diets. CRC Press.
- Mahmoud, M.M., El-Lamie, M.M., Kilany, O.E., Dessouki, A.A., 2018. Spirulina (*Arthrospira platensis*) supplementation improves growth performance, feed utilization, immune response, and relieves



- oxidative stress in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) challenged with *Pseudomonas fluorescens*. *Fish. Shellfish. Immun.* 72: 291-300.
- Mohanty, B.R., Sahoo, P.K., 2010. Immune responses and expression profiles of some immune-related genes in Indian major carp, *Labeo rohita* to *Edwardsiella tarda* infection. *Fish. Shellfish. Immun.* 28 (4): 613-621.
- Montero, D., Kalinowski, T., Obach, A., Robaina, L., Tort, L., Caballero, M.J., Izquierdo, M.M., 2003. Vegetable lipid sources for gilthead seabream (*Sparus aurata*): effects on fish health. *Aquaculture.* 225: 353–370.
- Montero, D., Mathlouthi, F., Tort, L., Afonso, J.M., Torrecillas, S., Fernández-Vaquero, A., Negrin, D., Izquierdo, M.S., 2010. Replacement of dietary fish oil by vegetable oils affects humoral immunity and expression of pro-inflammatory cytokines genes in gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Fish. Shellfish. Immunol.* 29: 1073–1081.
- Naylor, R.L., Hardy, R.W., Bureau, D.P., Chiu, A., Elliott, M., Farrell, A.P., Forster, I., Gatlin, D.M., Goldberg, R.J., Hua, K., Nichols, P.D., 2009. Feeding aquaculture in an Era of Finite resources. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106 (36): 15103-15110.
- Nudo L.P., Catap E.S., 2011. Immunostimulatory Effects of *Uncaria perrottetii* (A. Rich.) Merr. (Rubiaceae) Vinebark Aqueous Extract in Balb/C Mice. *J. Ethnopharmacol.* 133: 613-620.
- Ogino, C., Nanri, H., 1980. Relationship between the nutritive value of dietary proteins for rainbow trout and the essential amino acid compositions. *B. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 46(1): 109-112.
- Peres, H., Lim, C., Klesius, P.H., 2003. Nutritional value of heat-treated soybean meal for channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture.* 225: 67–82.
- Peron, G., Mittiaine, J.F., Le Gallic, B., 2010. Where Do Fishmeal and Fish Oil Products Come from? An Analysis of the Conversion Ratios in the Global Fishmeal Industry. *Mar. Policy.* 34: 815-820.
- Quade M.J., Roth J.A. 1997. A Rapid Direct Assay to Measure Degranulation of Bovine Neutrophil Primary Granules. *Vet. Immunol. Immunop.* 58: 239-248.
- Rumsey, G.L., Siwicki, A.K., Anderson, D.P., Bowser, P.R., 1994. Effect of soybean protein on serological response, non-specific defense mechanisms, growth, and protein utilization in rainbow trout. *Vet. Immunol. Immunop.* 41: 323–339.
- Salini, M.J., Adams, L.R., 2014. Growth performance, nutrient utilisation and digestibility by Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed Tasmanian grown white (*Lupinus albus*) and narrow-leafed (*L. angustifolius*) lupins. *Aquaculture.* 426: 296-303.
- Sealey, W.M., Hardy, R.W., Barrows, F.T., Pan, Q., Stone, D.A.J., 2011. Evaluation of 100% fish meal substitution with chicken concentrate, protein poultry by-product blend, and chicken and egg concentrate on growth and disease resistance of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. World. Aquac. Soc.* 42: 46–55.
- Secombes, C. J., Wang, T., Hong, S., Peddie, S., Crampe, M., Laing, K. J., Cunningham, C., Zou, J., 2001. Cytokines and innate immunity of fish. *Dev. Comp. Immunol.* 25 (8-9): 713-723.
- Sicuro, B., Badino, P., Daprà, F., Gai, F., Galloni, M., Odore, R., Palmegiano, G.B., Macchi, E., 2010. Physiological effects of natural olive oil antioxidants utilization in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) feeding. *Aquaculture international*, 18(3), 415-431.
- Spielbauer, B., Stahl, F. 2005. Impact of microarray technology in nutrition and food research. *Mol. Nutr. Food Res.*, 49: 908–917.
- Stasiak S.A., Baumann P.C. 1996. Neutrophil Activity as a Potential Bioindicator for Contaminant Analysis. *Fish. Shellfish. Immun.* 6: 537-539.
- Tacon, A.G.J., 1995. Fishmeal replacers: review of antinutrients within oilseeds and pulses – a limiting factor for the aquafeed green revolution Feed Ingredients Asia'95 Conference, 19–21 September, pp. 23-48
- Tacon, A.G.J., Metian, M. 2008. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and Future Prospects. *Aquaculture.* 285:146-158.
- Welch, A., Hoening, R., Stieglitz, J., Benetti, D., Tacon, A., Simms, N., O'Hanlon B., 2010. From Fishing to the Sustainable Farming of Carnivorous Marine Finfish. *Rev.Fish. Sci.*18(3):235-247.