

## **Mogan Gölü (Ankara)'nde Yaşayan *Cyprinus carpio* L., 1758 (Sazan)'nun Karyotip Analizi**

Karyotype analyses of the *Cyprinus carpio* (L., 1758) (carp) live in Mogan Lake (Ankara)

Mustafa HAMALOSMANOĞLU

G.Ü. Gazi Eğitim Fakültesi Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı, ANKARA- TÜRKİYE

Mustafa KURU

G.Ü. Gazi Eğitim Fakültesi Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı, ANKARA- TÜRKİYE

### **ÖZET**

*Bu çalışmada Mogan Gölü'nde yaşayan Cyprinidae familyasından Cyprinus carpio (L., 1758)'nin kromozom sayısı araştırılmıştır. Araştırmada kullanılan balıklar laboratuvara getirildikten sonra kaslarına 1 ml / 100 g % 0,1'lik colchicine çözeltisi enjekte edilmiştir. Dört saat sonra balıklar eterle bayıldıktan sonra öldürülmüş, solungaçlarıyla böbrekleri çıkarılmış ve sitogenetik metotlar uygulanmıştır. Bu dokulardaki hücrelerin metafaz kromozomları sayısal olarak incelenmiştir. Sonuçta 2n=100 diploid kromozom tespit edilmiştir.*

**Anahtar Kelimeler:** Karyotip Analizi, *Cyprinus carpio*, Mogan Gölü (Ankara)

### **ABSTRACT**

*In this study chromosome numbers have been investigated in Cyprinus carpio L.,1758 of Cyprinidae family, lived in Mogan Lake. A solution of 1ml/100g of 0.1% colchicine was injected intramuscular of fish. Four hours later fishes were killed, the kidney and gills were removed and cytogenetic methods were applied. Metaphase chromosomes of the cells in these tissues were investigated numerical. Finally, it was determined that these fishes have 2n=100 diploid chromosomes.*

**Key Words:** Karyotype analyses, *Cyprinus carpio*, Mogan Gölü (Ankara)

## 1. GİRİŞ

Türkiye içsularında 27 familyaya ait 226 balık tür ve alttürü bulunmaktadır. Bunların 170'i tatlısularda yaşamaktadır. Tatlısularda yaşayan 108 balık türü Cyprinidae familyasına aittir (Kuru ve ark. 2001). Teknolojinin gelişmesine paralel olarak her geçen gün artan çevre kirliliği sonucu, sahip olduğumuz zengin su kaynaklarımız kirlenmekte ve canlıların doğal üreme ortamları yavaş yavaş yok olmaktadır. Ayrıca artan nüfusun besin ihtiyacını karşılanmasındaki sıkıntılar ve beyaz etin dünyaca kabul edilen besin değerinin önemi her geçen gün daha da anlaşılmaktadır. Bu nedenlerle yakın zamanda yapay üretimin önemi daha da artmış ve balık çiftliklerinde yetiştirilen balıklarla ilgili sitogenetik çalışmalar daha da ileriye götürülüp değişik çaprazlamalar ve seleksiyonlar yapılarak daha kısa zamanda, daha çok ve kaliteli, aynı zamanda da ekonomik yollarla balık üretiminin yapılmasına çalışılmaktadır.

Memelilerde yapılan sitogenetik çalışmalarda elde edilen başarılar, balık sitogenetiğinde yapılan çalışmalara ışık tutmuştur. 1960'dan beri balık sitogenetiğinde yeni metotların geliştirilmesine çalışılmıştır (Denton, 1973).

Gelişmiş ülkelerde sitogenetik çalışmalarda görülen ilerleme; henüz Türkiye'de istenilen seviyeye ulaşamamıştır. Diğer yandan balıklarda oldukça küçük olan kromozomların metafaz safhasında dağılımlarının iyi belirlenememesi nedenler arasında sayılabilir.

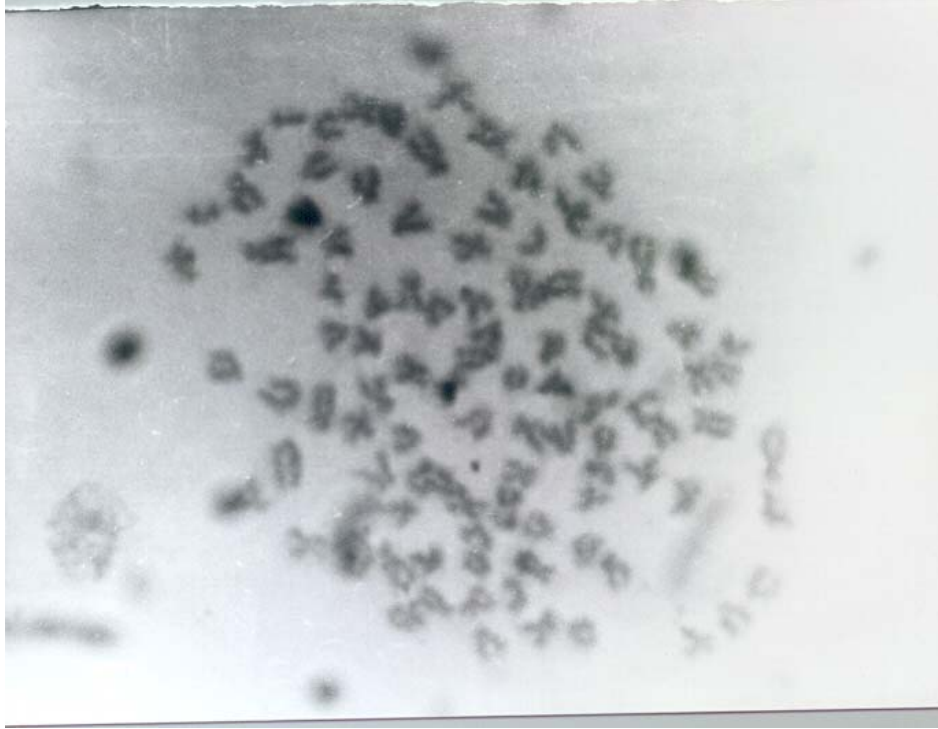
Bu konuda ülkemizde ve yurtdışında yapılan çalışmalardan bazıları şunlardır: Al-Sabti (1986), kromozom sayısını  $2n=98$  bulmuştur. Pankaj ve arkadaşları (1990), kromozom sayısını  $2n=98\pm 4$  olarak bulmuşlardır. Rukhsana ve Malgorzata (1994), *Cyprinus carpio*'nun kromozom sayısını  $2n=100$  olarak bulmuşlardır. Pekol yapmış olduğu iki çalışmada *Cyprinus carpio*'nun kromozom sayısını  $2n=100$  olarak bulmuştur (Pekol, 1999a ve Pekol, 1999b), Ergene Gözükara ve arkadaşları ise *Rutilus tricolor*'da karyolojik analiz için yeni bir yöntem rapor etmişlerdir (Ergene Gözükara ve ark., 2002).

Bu çalışmada, ülkemizde tatlısularında yaşayan kemikli balıkların büyük bir kısmını oluşturan Cyprinidae familyasından en karakteristik örnek olarak bilinen *Cyprinus carpio* (L., 1758)'nin (Pullu sazan) kromozomlarının sayısı ve morfolojisi tespit edilmiştir.

## 2. MATERYAL VE METOT

Laboratuvara getirilen balıklar daha önce hazırlanmış ve havalandırılmış akvaryumlara konulmuş ve yeterli besin verilmiştir. Bir hafta sonra uyum akvaryuma sağlayan balıkların kaslarının arasına balığın vücut ağırlığının her 100 gramı için % 1'lik colchicine çözeltisinden 1 ml enjekte edilmiştir. Enjeksiyondan sonra balıklar havalandırılmış akvaryuma yeniden konmuştur. 3-4 saat sonra eterle bayıltılan deney balıkları mümkün olduğunca az acı çekmeleri için bistüri ile kesilerek öldürülmüş, rejenerasyonun çok olduğu solungaç ve böbrekleri alınmıştır. Solungaç epitel dokusu ve böbrek dokusu ayrı ayrı tüplere konularak üzerlerine KCl (0,075 M) çözeltisi eklenmiş ve 30 °C'de 45 dakika KCl içerisinde tutulmuştur. Böbrek ve solungaç dokularını içeren çözelti 10 dakika 2000 rpm'de santrifüj edilmiş ve supernatant atılmıştır. Fiksasyonu sağlamak için, 3:1 metanol : asetik asit karışımından her tüp için 7 ml alınıp vakit kaybetmeden tüp içerisine dökülerek çalkalanmıştır. 4 °C'de 15 dakika bekletilen hücre süspansiyonu 10 dakika 2000 rpm'de santrifüj edilmiş ve supernatant atılmıştır. Bu işlem iki defa tekrarlanmıştır. Fiksatifler her seferinde taze olarak hazırlanmıştır. John ve John'un da (1986) belirttikleri gibi, tespit çözeltisini üçüncü kez uygulamadan önce materyal tekrar santrifüj yapılmış ve bir gece buzdolabında (0 °C) saklanmıştır. Son santrifüj işleminden sonra supernatant'ın büyük bir kısmı atılıp tüpün taban kısmında kalan 2-3 ml'lik hücre süspansiyonu iyice karıştırılmıştır. % 50'lik metanol ile yıkanıp kurutulmuş lamalar üzerine 40-50 cmyüksekten 1-2 damla kullanılan çözeltiden damlatılarak iyice yayılması sağlanmıştır. Lamlar üzerine damlatılan çözeltinin ispirto ocağı alevinde aleve temas etmeden havada kuruması sağlanmıştır. Boyama işleminde Giemsa boyama yöntemi kullanılmıştır. Kromozomların boyayı daha iyi kabul etmesi için fosfat tampon solüsyonu (PBS) kullanılmıştır. Stok Giemsa solüsyonundan 5 ml ve PBS (PH=6,8)'den 95 ml alınarak 100 ml'ye tamamlanmıştır. Bu karışım her boyama

için taze olarak hazırlanmıştır. Lamlar oda sıcaklığında 35 dakika boya solüsyonunda tutulmuştur. Bu süre sonunda boyadan çıkarılan lamlar 2 kez asetonda çalkalanmış, 1: 1 aseton : ksilol karışımına batırılıp çıkarılmış ve 2 kez ksilolde çalkalanıp son ksilol kabında 5 dakika tutulmuştur. Bu süre sonunda lamlar Kanada Balzamu ile sabit hale getirilmiştir. Preparatlar mikroskopta incelenmiş ve uygun metafaz dağılımlarının fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 1) .



**Şekil 1.** *Cyprinus carpio*'da metafaz kromozomlarının dağılımı

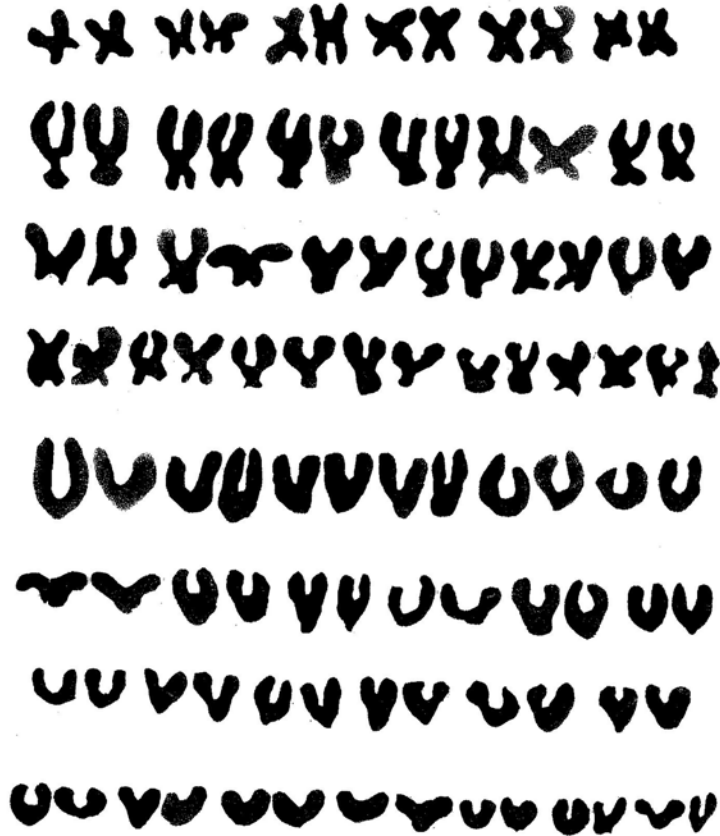
### 3. BULGULAR

Yapılan çalışmada *Cyprinus carpio* L., 1758'nun somatik kromozomlarının elde edilmesi için metot kısmında belirtilen yöntem uygulanmıştır.

Balıkların yerleştirildiği akvaryumların hacmi arttıkça ve balıkların yaşı küçüldükçe adaptasyonun arttığı tespit edilmiştir. Balıkların beslenmesinin ve su sıcaklığının

artırılmasıyla balıkların aktivitelerinin ve dolayısıyla da mitoz bölünmenin arttığı gözlenmiştir. Kromozom analizini kolaylaştırmak için verilen colchicine'nin enjeksiyonundan sonra, 4 saat bekleme süresinin en iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir. Bu sürenin az olması halinde metafaz alanlarının azaldığı, uzadığında ise metafaz alanlarının artmasına rağmen kromozom kollarının kontrakte olması sonucu analizlerinin zorlaştığı gözlenmiştir. *Cyprinus carpio* L., 1758'nun kromozom analizlerini yapmak için kullanılan solungaç epitel hücrelerinden hazırlanan preparatlarda çok miktarda mitoz bölünme elde edilirken böbrek dokusunda daha az elde edilmiş, karaciğerde ise elde edilememiştir. Yapılan denemeler sonucunda Hipotonikle muameledeki süre 65 dakika olarak tespit edilmiştir. Bu sürenin altında muamele edilen hücrelerin yeteri kadar şişmediği, daha uzun süre muamele edilen hücrelerin ise patladığı gözlenmiştir. Tespit çözeltilisi olarak kullanılan asetik alkolün taze ve soğuk olarak kullanılması, öldürme ve tespit işleminin hızlı olmasına ve dolayısıyla da kromozomların doğal hallerine uygun olarak elde edilmesine sebep olmuştur. Preparatların hazırlanması esnasında hücre solüsyonunun lam üzerine damlatma mesafesinin kromozomların dağılımında önemli bir etken olduğu gözlenmiş, bu çalışmada en iyi mesafenin 40 – 50 cm olduğu tespit edilmiştir. Bu mesafenin altında damlatma yapıldığında hücrelerin gerekli hıza ulaşamadıkları için patlamadığı, yüksekte yapılan damlatmalarda ise lam'a çok hızlı çarpan hücrelerin içerisindeki kromozomların gereğinden fazla dağıldığı ve iki yada daha fazla metafaz alanının kromozomlarının birbirine karışarak diploid kromozom sayısının olması gerekenden fazla ya da az olmasına sebep olduğu gözlenmiştir. Preparat hazırlanmasında lamların % 50'lik soğuk ( 0 °C ) etanolla yıkanması ve buzdolabında bekletilmesinin en iyi metafaz alanlarının oluşmasında etkili olduğu tespit edilmiştir. Preparatların boyanmasında kullanılan PBS'nin kromozomların boyanmasında etkili olduğu, PBS kullanılmadığında ise boyamanın analizi engellediği gözlenmiştir. Bu boya çözeltilisinde boyamanın en iyi 35 dk. sonunda gerçekleştiği, bu sürenin altında iyi boyamanın olmadığı, bu sürenin üzerinde ise kromozomların kontrakte olduğu tespit edilmiştir. Kanada Balzamu ve Entellan ile tespit edilen preparatlarda yapılan inceleme sonucunda *Cyprinus carpio* L., 1758'ya ait 121 adet metafaz dağılımından 72 adedinin fotoğrafı

çekilmiştir. Bunlardan karyotip analizine uygun 5 alan değerlendirmeye alınmış ve bunun sonucunda *Cyprinus carpio* L., 1758'nun  $2n=100$  kromozoma sahip olduğu, bunlardan 12'sinin metasentrik, 38'inin subtelosentrik ve 50'sinin ise akrosentrik olduğu tespit edilmiştir. Genel görünüş itibariyle subtelosentrik ve akrosentrik kromozomların oluşturduğu karyotipte kromozomların büyüklüğü  $1,5 \mu\text{m} - 3,5 \mu\text{m}$  arasında değişmektedir (Şekil 1 ve 2).



Şekil 2. *Cyprinus carpio*'nun karyotipi

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Şimdiye kadar yapılan sitogenetik çalışmalarda pek çok yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemler doğrudan yöntem ve doku kültürü yöntemi olarak iki grupta toplanabilir. Hangi yöntem uygulanırsa uygulansın önemli olan metafaz dağılımının iyi anlaşılmasıdır. Bu yöntemlerden doku kültürü yöntemi, elde edilen metafaz dağılımının fazla olmasına karşın çok zaman isteyen pahalı bir yöntemdir. Doğrudan yöntem ise metafaz dağılımının daha az olduğu fakat kısa zaman isteyen, ucuz bir yöntemdir. Araştırmacılar bu yöntemlerden kendilerine en uygun olanı seçip, ortama göre metot üzerinde küçük değişiklikler yaparak çalışmalarını yapmaktadırlar. Birden fazla yerde ve kişi tarafından yapılan benzer çalışmalar bu sebepten dolayı farklı sonuçlar verebilmektedir.

Bu çalışma yapılırken imkanlar ölçüsünde doğrudan yöntemin uygulanması tercih edilmiştir.

Schreck ve Moyle'e (1990) göre, kromozom preparatları hazırlamak için metafaz hücrelerinin iyi bir kaynağı olan bölünen dokular (embriyonik dokular, solungaçlar, böbrekler, bağırsaklar, pul epitelleri ve fibroblastlar) tercih edilmiştir.

Farklı balık türleri, farklı kromozom takımları içerir. Bu yüzden balıklarla ilgili çalışmalarda farklı yöntemler kullanılmıştır. Fakat temel aynıdır (Klinkhardt, 1991). *Cyprinus carpio* L., 1758'da uygulanan bu metotla solungaç epitelinin, böbrek dokusuna göre daha iyi sonuç vermesi Pekol (1999a), Pekol (1999b), Rukhsana ve Malgorzata (1994) ve Padilla ve Ark. (1993), Çolak ve arkadaşları (1985)'nin çalışmalarının sonuçları ile uyum sağlamamaktadır. Bu farklılığın sebebi ön muamelede kullanılan maddenin niteliği ve uygulamadaki değişiklikler olabilir. Pekol (1999a), Pekol (1999b), Rukhsana ve Malgorzata (1994), Padilla et al. (1993), Gül ve arkadaşları (1988)'in çalışmaları ile bu çalışmada mitotik inhibitör kullanılması uygunluk göstermektedir.

Intraperitoneal'e ve intramuskular'a % 8'lik NaCl'de hazırlanmış % 0,1'lik colchicine çözeltisinden 1 ml/100 g. vücut ağırlığı olarak enjekte edildiğinde yeterli sayıda iyi

kalitede metafaz dağılımları elde edilmiştir. Bu çalışmada hücrelerin fiksasyonu için kullanılan 3:1 oranında methanol-glacial asetik asit kullanılmıştır. Padilla ve Ark. (1993) çalışmalarında materyalle fiksatif karıştırdıktan sonra 4°C'de 2 saat bekletip 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapmışlardır. Bu çalışmada ise 4°C'de 15 dakika bekletip 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Bu çalışma, Pekol (1999a) ve Pekol (1999b)'un yaptığı çalışma ile uygunluk göstermektedir.

Havada kurutulan preparatların % 5'lik Giemsa solüsyonu ile 35 dakika süresince boyanması yeterli kontrastı sağlamaktadır. Bu oran ve süre araştırmacılara göre farklılık göstermektedir.

*Cyprinus carpio* L., 1758'nun diploid kromozom sayısı  $2n=100$  olarak bulunmuştur. Bu sonuç Pekol (1999), Rukhsana ve Malgorzata (1994) ile Pankaj ve arkadaşları (1990)'nın bulduğu sonuçlarla aynı ancak Al-sabti (1986)'nin bulduğu sonuçla farklılık göstermektedir. Bu farklılığın sebebi, kromozom sayısının çok fazla olması nedeni ile metafaz alanlarının çok iyi elde edilememesi ya da ekolojik izolasyon nedeni ile balıkların genotipinde meydana gelebilecek olan değişikliklerin araştırma sonuçlarına yansyacağı olarak düşünülebilir. Ayrıca bu çalışma sonucunda elde edilen kromozom sayısının bir çok araştırmacı ile aynı olmasına rağmen morfolojilerinde bazı farklılıklar gözlenmiştir. Bunun sebebinin ise araştırmacıların kromozom formülünü verirken kesin bir morfolojik ayırım yapmamalarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Karyotip morfolojilerinin farklı olması, genel olarak kromozom hazırlama yöntemlerine ve elde edilen kromozomların yapısına bağlıdır (Denton, 1973). Özellikle preparasyon esnasında meydana gelen kromozom spiralizasyon (kısalmaya kalınlaşma) dereceleri farklı sonuçların alınmasına sebep olur. Oldukça kontrakte olmuş kromozomların kullanılarak yapıldığı karyotiplerde özellikle daha küçük olan submetasentrik ve subtelosentrik kromozomların ayırımı güçleşmektedir. Tersine, erken bir metafazda elde edilen kromozom sonuçları farklılık arzeder (Rab ve ark., 1989).

Bu türlerle daha ileride yapılacak olan çalışmalarda kromozom bantlama tekniği kullanıldığında balık kromozomlarının sayı ve yapıları daha iyi bir biçimde ortaya konulacaktır. Aynı zamanda, bantlama tekniği, yeni melezleri tanımlamaya, aynı



kromozom sayılarında şüpheleri yok etmeye, dolayısıyla seleksiyonun önemini aydınlatmaya yararlı olacaktır. Daha verimli balık türlerinin elde edilmesine ışık tutacaktır.

Sonuç olarak; mitoz kromozomlarının incelenmesi zor olduğundan bu tür çalışmaların daha çok araştırmacı tarafından yapılması karşılaştırma imkanını arttıracak ve tartışmalara yeni boyutlar kazandırarak en iyi sonuca ulaşılması mümkün olacaktır.

### KAYNAKLAR

- Al-Sabti, K. (1986). Karyotypes of *Cyprinus carpio* and *Leuciscus cephalus*. *Cytobios*, 47, 19-25.
- Çolak, A., Sezgin, İ. ve Süngü, Y.S. (1985). Sazangiller Familyasına (Cyprinidae) Ait Beni Balığında (*Cyprinion macrostomus* Heckel, 1843) Kromozomal Araştırmalar. *Doğa Bilim Dergisi*, A2, 9-2.
- Denton, T.E. (1973). *Fish Chromosome Methodology*. U.S.A: Charles C. Thomas Puplicher. 166.
- Ergene Gözükara, S., Karahan, A., Kuru, M. (2002, Eylül). *Güney Akdeniz Sularında Bulunan *Rutilus tricolor* Lortet, 1883 (Pisces: Cyprinidae)'in Karyolojik Analizi İçin Bir Yöntem*. XVI. Ulusal Biyoloji Kongresi, 88, Malatya.
- Gül, S., Çolak, A ve Sezgin, İ. (1988, Eylül). *Gümüş Balığı, *Chalcalburnus mossulensis* (HECKEL, 1843)'de Sitogenetik İncelemeler*. IX. Ulusal Biyoloji Kongresi, Cilt 1., Sivas.
- John, R. And John, G. (1986). A Method to Increase Mitotic Metaphase Spreads and Permanent Chromosome Preparation for Karyotype Studies in Fishes. *Aquacultura Hungric (Szarvas)*, Vol. V, 31-36.
- Klinkhardt, M.B. (1991). A Brief Comparasion of Methods for Preparing Fish Chromosomes: an Overview. *Cytobios*, 67, 193-208.
- Kuru, M., Balık, S., Ustaoglu, M.R., Ünlü, E., Taşkavak, E., Gül, A., Yılmaz, M., Sarı, H.M., Küçük, F., Kutrup, B., Hamalosmanoğlu, M. (2001). Türkiye'de Bulunan Sulak Alanların Ramsar Sözleşmesi Balık Kriterlerine Göre Değerlendirilmesi. *T.C. Çevre Bakanlığı Çevre Koruma Genel Müdürlüğü ve Gazi Üniversitesi Vakfı*, Ankara.
- Pankaj, G., Dholakia, A.H. and Gadhia, M. (1990). Cadmium Nitrate Induced Chromosomal Aberrations in a Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquacultura Hungarica (Szaivas)*, Vol.VI, 19-23.
- Padilla, J.A., Fernandez-Garcia, J.L., Rabasco, A., Martinez-Trancon M., Rodriguez de Ledesma, I. and Perez-Regadera, J.J. (1993). Characterization of the Karyotype of the Tench (*Tinca tinca* L.) and Analysis of It's Chromosomal Heterochromatic

Regions by C-banding, Ag-staining and Restriction Endonuclease Banding. *Cytogenet. Cell Genet.* 62, 2220-2223.

Pekol, S. (1999b). Kastamonu Beyler ve Germeçtepe Barajlarındaki *Cyprinus carpio* (L.,1758) Populasyonlarının Karşılaştırmalı Analizi. *Kastamonu Eğitim Derg.* 7(2), 3-8.

Pekol, S. (1999a). Beyler Barajında (Kastamonu) Yaşayan *Cyprinus carpio* (L.,1758)'nin Karyotip Analizi. *Kastamonu Eğitim Derg.* 7(1), 173-178.

Rab, P., Pokorny J. And Roth. P. (1989). Chromosome Studies of Common Carp, *Cyprinus carpio*, I karyotype of Amuran carp, *C. Carpio haematopterus*. *Caryologia, Vol. 42(n:1)*, 27-36.

Rukhsana, A. and Malgorzata, J. (1994). Spontaneous Triploid Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) in a Farm Population. *Cytobios*, 78, 153-157.

Schreck, C.B. and Moyle, P.B. (1990). *Methods for Fish Biology*. Maryland (U.S.A.): American Fisheries Society Bethesda, 171-190.