

Kura-Aras Havzasında Yaşayan *Orthrias tigris* (Heckel, 1843)'de Kromozomal Çalışmalar

Berna Kılıç¹, Süleyman Gül¹, Oktay Özkan², Taylan Özgür Kaya³, Gökhan Nur¹, Pınar Aksu² I,II

¹Kafkas Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kars.

²Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı, Kars.

³Kafkas Üniversitesi, Kars Meslek Yüksek Okulu, Kars.

I. Birinci isim yazarın tezinden özetlenmiştir.

II. Ulusal Su Günleri, Antalya, 2007'de poster olarak sunulmuştur

Geliş Tarihi: 21 Aralık 2011; Kabul Tarihi: 25 Temmuz 2012

Özet

Bu çalışmada Kura-Aras Havzasında yaşayan *Orthrias tigris* (Heckel, 1843) (Fam : Balitoridae)'in kromozomlarının sayısı ve yapıları incelenerek, karyotip analizi yapılmıştır. Bu çalışmada kullanılan balıklar Kars ilindeki Kars Çayı'ndan serpmeye ağlarla yakalanarak laboratuara getirilmiştir. Her bir gram vücut ağırlığı için 0.01 ml, %0.6'lık kolşisin solüsyonu balıkların karın boşluğuna enjekte edilmiş ve balık kesilmeden önce 190 dakika beklenilmiştir. Metafaz incelemeleri ile *O.tigris*'in 2n=50 kromozoma sahip olduğu belirlenmiştir. Bunların karyotiplerinin 18 metasentrik, 18 submetasentrik ve 14 akrosentrik kromozom çiftinden (NF: 86) oluştuğu saptanmıştır. Bu türde cinsiyete bağlı herhangi bir kromozom tespit edilememiştir.

Anahtar kelimeler

Kura-Aras Havzası; Kars Çayı; *Orthrias tigris*; Karyotip, Türkiye.

Karyotype Analysis in *Orthrias Tigris* (HECKEL, 1843), Living in the Kura-Aras River Basin

Abstract

In this study, chromosome numbers and the standard karyotypic details for the Blackbrow bleak, *Orthrias tigris* (Heckel, 1843) (Fam: Balitoridae) from Kura-Aras river basin were ascertained. The fish used in this study were caught with fishing nets from the Kura-Aras river basin and taken to the laboratory. Fish were injected intraperitoneally (i.p.) with doses of 0.01 ml/g body weight of 0.6 % solution of colchicine and left for 190 minutes before sacrifice. It was determined that *Orthrias tigris* had 2n=50 chromosomes by metaphase investigation. Their karyotypes were determined as being composed of 18 metacentric, 18 submetacentric and 14 acrocentric chromosome pairs with NF: 86 We were unable to identify any sex-related chromosomes in these species.

Key words

Kura-Aras Basin; Kars Stream; *Orthrias tigris*; Karyotype; Turkey.

© Afyon Kocatepe Üniversitesi

1.Giriş

Bugün dünyada yaklaşık 20.000 balık türü yaşamaktadır. Bunlardan yaklaşık 3000 tanesinin kromozom sayısı belirlenmiş ve karyotipleri yapılmıştır (Gaffaroğlu, 2004) . Bu tip çalışmalar ülkemiz için henüz yeni olup bu konuda yeterli çalışma bulunmamaktadır (Kılıç Demirok, 2001). Balitoridae familyası 52 genus ve 500'den fazla tür içermekte olup genellikle hızlı akan sularda yaşayan küçük vücutlu balıklardır (Ayaz, 2004) . Bu familya içerisinde bulunan *Orthrias* cinsine ait olan *Orthrias*

tigris Anadolu'nun özellikle Doğu ve Güneydoğu bölgelerine özgü bir türdür. Bilhassa Dicle, Fırat, Kura, Aras, Ceyhan ve Asi nehirlerinde bulunduğu bilinmektedir (Geldiay, 1996) .

Sadece morfolojik, anatomik, ve biyokimyasal özelliklere göre yapılan çalışmaların taksonomik ve filogenetik açıdan yeterli olmadığı, aynı cinsine ait tür ve alttürlerin ayırt edilmesinde ve aralarındaki akrabalıkların belirlenmesinde karyolojik çalışmaların ne kadar önemli olduğunu daha önce yapılan çalışmalar ortaya koymaktadır (Gaffaroğlu, 2004). Kromozom sayısı ve morfolojisindeki benzerlik

derecesi türler arasındaki evrimsel ilişkiyi ölçmede kullanılabilir. Bir türün karyotipi o türün genetik sisteminin fiziksel olarak göstergesidir (Vicdanlı, 2007).

Karyotip çalışmaları tür seçiminde, verimli tür üretiminin yönlendirilmesinde ve sitotoksik kimyasalların izlenebilmesinde önemli katkılar sağlamaktadır (Al-Sabti, 1991). Balık kromozomlarının sayısı ve morfolojileri üzerine yapılan çalışmaların hibritleme, sınıflandırma ve evrim araştırmalarına yararlı olduğu belirlenmiştir (Nishikawa, 1971, Çolak, 1985). Balıklarda genetik yapının bilinmesi, ıslah çalışmaları yanında, sistematik kategorilerin belirlenmesi ve canlıların çevresel etkilerden özellikle de kirleticilerden ne ölçüde etkilendiğinin ortaya çıkarılmasını sağlaması bakımından da önemlidir. Ayrıca balıklarda sitogenetik çalışmalar su kirliliğinin indikatörü olarak mutasyonlar ve mutajenlerin belirlenmesinde ve bunların yanında evrimsel anlamda filogenetik ilişkilerin ortaya çıkarılmasında kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak balıkların karyolojik karakterlerinin ortaya konulması daha verimli bireylerin üretilmesine de olanak sağlayabilmektedir (Karahan, 2007).

Bu çalışma ile Kura-Aras Havzasında olan *Orthrias tigris*'in kromozom sayısı ve tiplerinin belirlenmesi ve adı geçen türün diğer akraba türlerle kromozomal açıdan karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

Araştırmada kullanılacak *Orthrias tigris*'in temini için Kura-Aras Havzasının sınırları içerisinde bulunan Kars Çayı'na ve Çıldır Gölü'ne ilkbahar aylarından itibaren yaklaşık 10 kez gidildi. Yakalanan balıklardan (45 adet) 20 adedi bu çalışmada kullanılmıştır. Balıklar avlanırken zedelenmelerini önlemek için düşük voltajlı şoker ve çevirme ağ kullanıldı. Balıkların cinsiyet ayırımı gonad analizi ile yapıldı. Balıklar avlandıkları ortamdan alınmaz, içinde bu ortamdaki sudan bulunan bidonlara konarak, bidonlara oksijen bağlandı. Ortalama ağırlıkları 5-10 gr, uzunlukları 10 cm olan balıklara eşey farkı gözetmeden, vücut ağırlığının

her 1 gr için 0.0006 gr Kolşisin (Colchicine) solüsyon halinde hazırlanarak abdominal boşluktan enjekte edilmiştir. Enjeksiyondan sonra balıklar havalandırılmış akvaryuma alınmıştır. Kolşisin verildikten yaklaşık 3.5-4 saat sonra rejenerasyonun yoğun olduğu bölgelerden biri olan solungaç epitel dokusu alınarak bistüri yardımıyla ufak parçalara ayrılmış ve deney tüplerine konularak üzerlerine KCl (0.046) solüsyonu eklenerek, oda ısısında 30-40 dakika tutulduktan sonra 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılarak hipotonik hücrelerden ayrılmıştır. Fiksasyonu sağlamak için, 3:1 metanol:asetik asit karışımından hücreler üzerine yaklaşık 7 cc karıştırıcı yardımıyla eklenerek aynı devir ve süreyle santrifüj edilerek süpernatant atılmış, bu işlem iki defa tekrarlanmıştır. Son santrifüj işleminden sonra süpernatant'ın büyük bir kısmı atılıp tüpün taban kısmında kalan 2-3 cc'lik hücre süspansiyonu iyice karıştırılmıştır. Hücre süspansiyonunun, lamlar üzerine yüksekten 1-2 damla damlatılmak suretiyle yayılması sağlanmıştır. Preparatlar havada kurutulmuş ve %5'i Giemsa boyası olan Sorenson tamponu içerisinde 20-30 dakika boyanmıştır. Preparatlar mikroskopta incelenmiş ve uygun metafaz dağılımlarının fotoğrafları çekilmiştir.

3. Bulgular

Balıkların beslenmesinin ve su sıcaklığının artırılmasıyla balıkların aktivitelerinin ve dolayısıyla da mitoz bölünmelerinin arttığı gözlenmiştir. Kromozom analizini kolaylaştırmak için verilen kolşisin (colchicine) enjeksiyonundan sonra, yaklaşık 3.5-4 saat bekleme süresinin en iyi sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Bu sürenin az olması halinde metafaz alanlarının azaldığı, uzadığında ise metafaz alanlarının artmasına rağmen kromozom kollarının sıkıca paketlenmediği ve bunun sonucunda analizlerin zorlaştığı gözlenmiştir. Kromozom analizleri yapmak için kullanılan solungaç epitel hücrelerinden yapılan preparatlarda yüksek oranda mitoz bölünme elde edilmiştir. Hipotonikle muameledeki süre 40-45 dakika olarak tespit edilip, bu sürenin altında

yapılan işlemlerde hücrelerin yeterince şişmediği, sürenin üstünde yapılan denemelerde ise hücrelerin patlayarak kromozomların dağıldığı gözlemlenmiştir. Preparatların hazırlanması esnasında hücre solüsyonunun lam üzerine damlatma mesafesinin kromozomların dağılımında önemli bir etken olduğu gözlenmiş, ortalama iyi olarak kabul edebileceğimiz mesafenin 10-15 cm civarında olduğu tespit edilmiştir. Yapılan preparatlardaki inceleme sonucunda, *Orthrias tigris*'den elde edilen 73 adet metafaz dağılımından uygun olanların fotoğrafı çekilerek gerekli değerlendirmeler yapılmıştır. Tablo 1'de görüldüğü gibi *Orthrias tigris*'in en yaygın karyotipi $2n=50$ olarak % 88 oranında bulunmuştur.

Orthrias tigris (Heckel, 1843)'nin solungaç epitelinden elde edilen kromozomların sayısal dağılımı incelendiğinde 48 kromozumlu 3, 49 kromozumlu 3, 50 kromozumlu 64, 51 kromozumlu 1 ve 52 kromozumlu 2 adet olmak üzere toplam 73 adet metafaz sayılmıştır. Sonuçta en yaygın

karyotip $2n=50$ olarak saptanmıştır. Kromozomların sentromer durumları göz önüne alındığında 18 adet metasentrik, 18 adet submetasentrik, 14 adet akrosentrik kromozom olduğu gözlemlenmiş ve kromozom kolları sayısı (NF) 86 olarak saptanmıştır.

İnceleme materyali olarak kullandığımız balıklardan elde edilen metafazlar yukarıda da değinildiği gibi farklı kromozom sayılarına sahiptir. Burada çeşitli faktörler bu sonucun elde edilmesinde etkili olabilmektedir. Çalışma esnasında işlemlerin yapılırken bir hata meydana gelmesi durumunda, bir metafazdan diğerine kromozom katılımı sonucu bazı metafaz dağılımlarının sahip olduğu kromozom sayısında artış gözlenirken, buna bağlı olarak diğerinde azalma olmaktadır. Bu nedenle bu tür hassas ve sonuçların literatür açısından önemli olan çalışmalarda metafaz dağılımları mümkün olduğunca yeterli miktarda sayılarak sonuçların sağlıklı bir biçimde alınması sağlanmıştır.

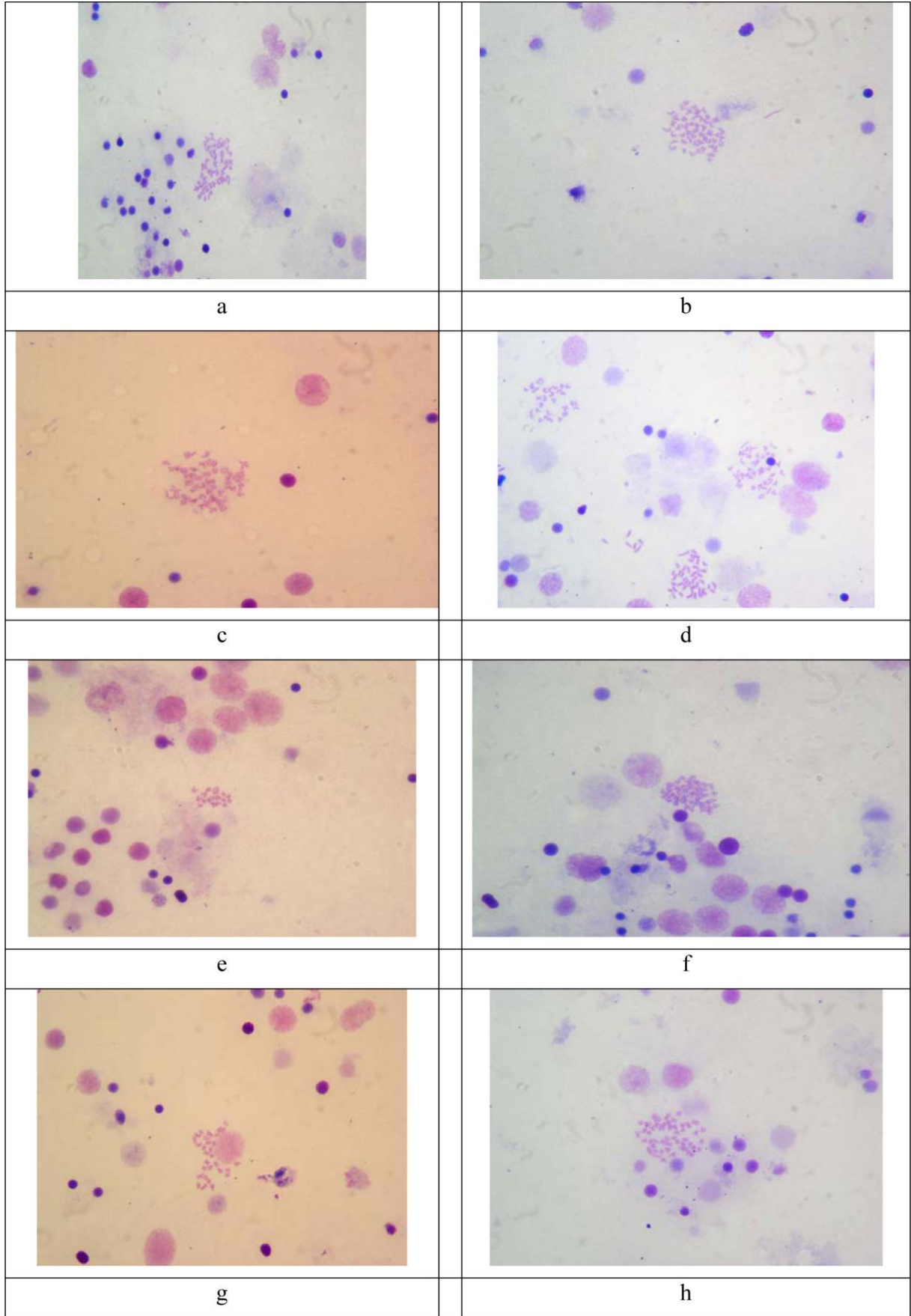
Tablo 1. *Orthrias tigris* (Heckel, 1843)'in solungaç epitelinden elde edilen kromozomların sayısal dağılımı.

İncelenen Örnekler	Kromozom sayısı					Karyotip ($2n=50$)				
	48	49	50	51	52	Metafaz sayısı	m	sm	a	NF
1	1		4			5	16	14	20	80
2			5		1	6				
3			6			6				
4		2	5			7				
5	1		6			7				
6			5			5				
7			3		1	4				
8		1	5			6				
9			5			5				
10			2		1	3				
11			2			2				
12			4			4				
13			3			3				
14	1		5			6				
15			4			4				
Toplam	3	3	64	1	2	73				

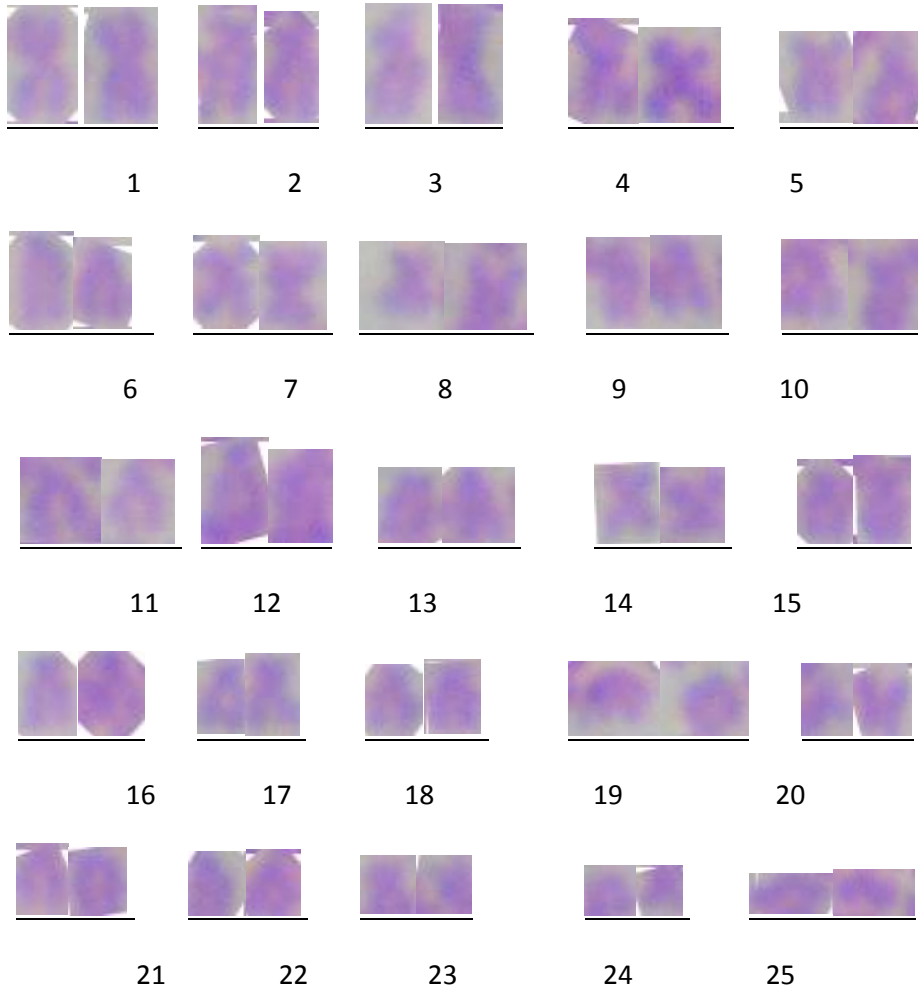
m: Metasentrik sm: Submetasentrik a: Akrosentrik NF: Kromozom kolları sayısı

Yapılan preparatlardaki inceleme sonucunda, *Orthrias tigris*'den elde edilen 73 adet metafaz dağılımından uygun olanların fotoğrafı çekilerek gerekli değerlendirmeler yapılmıştır (Şekil 1). Tablo

1'de görüldüğü gibi en yaygın karyotip $2n=50$ olarak % 88 oranında bulunmuştur. *Orthrias tigris*'in metafaz yayılımlarından elde edilmiş karyotipi Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 1 a,b,c,d,e,f,g,h. *Orthrias tigris*'den elde edilen metafaz kromozomları.



Şekil 2. *Orthrias tigris*'in metafaz yayılımlarından elde edilmiş karyotipi.

4. Tartışma

Canlılarda sitogenetik incelemelerle kromozomların elde edilme yöntemleri oldukça fazladır. Balıklarda kan hücrelerinin üretim yeri olan böbreklerin incelenmesi yöntemiyle kromozom elde edilebilmektedir (Al-Sabti, 1991). Bölünmekte olan hücreleri metafaz evresinde yakalamak önemlidir. Kromozomların net bir biçimde görülebilmesi için en pratik, en ucuz ve en çabuk olan yöntemin uygulanması gerekir.

Balık kromozomlarının boyca küçük ve sayıca fazla olması ve balık kromozomu preparasyonları için standart bir tekniğin olmaması, sitogenetik, genotoksik çalışmalarda ve diğer amaçlar için balık kromozomlarının kullanılmasını zorlaştırmaktadır. Bununla beraber, memeli sitogenetiğindeki ve özellikle insanlar üzerindeki sitogenetik çalışmalarındaki ilerlemeler, benzer çalışmaların balıklarda da yapılmasına yol açmış, balık

kromozomu çalışmalarında gözle görülür bir artış sağlanmıştır (Wong, 1988, Gold, 1990).

Kromozom analizi için organizmanın farklı dokuları kullanılabilir. Nitekim bazı araştırmacılar bunun için balıkların böbreğini kullanmalarına karşın (Çolak, 1985, Yamazaki, 1971) bazıları da solungaç epitel hücrelerini aynı amaçla kullanmışlardır (Cooper 1983, Nishikawa, 1973). Bu çalışmada da daha pratik ve ucuz olması nedeniyle solungaç epitelinden yararlanıldı. Balık solungaç epitel hücrelerinde ideal kromozom eldesi için hipotonikte bekleme süresini 30 dakika olarak belirledik. Bu süre Yamazaki (1971) tarafından böbrek dokusu için 40 dakika olarak belirlenmiştir (Yamazaki, 1971).

Balık kromozomları mitoz bölünmenin fazla olduğu ve metafaz safhasında bir ışık mikroskobu yardımıyla çok kolay görülebilir ve çok iyi tanımlanabilirler. Kromozom preparasyonlarının yapımında temel yaklaşım, metafazda bölünen

hücreleri artırmak ve daha sonra gözlemek için bir mikroskop lamı üzerinde metafaz hücrelerinden kromozomları yaymaktır. Aynı prensipler insanlar dahil, diğer memelilerle çalışmalarda da geçerlidir (MacGregor, 1987, Yunis, 1974).

Bölünen hücreleri metafazda durdurmak için çeşitli kimyasal maddeler kullanılır. Kolşisin, kolsemid ve vinblastin sülfat'ın hepsi iğ ipliği oluşumunu önlemek için kullanılabilir. Kullanılan kolşisin miktarı diğer canlılarda kullanılanlara oranla biraz yüksektir. Kimyasal maddeye maruz bırakma süresi 20 dakikadan 6-8 saate kadar uzatılabilir. Kısa süreli muamelede metafaz sayısı az iken uzun süreli muamelede ise kromozomların aşırı yoğunlaşmasından kaynaklanan büzülmeler meydana gelebilmektedir. Nanda ve arkadaşlarının (Nanda, 1995) yönteminde ise balık % 0.03'lük kolşisin içeren suda 6-8 saat bekletilmiştir. Daha sonra, metafaz kromozomlarını birbirinden ayırmak için hipotonikle muameleye tabi tutulur. Bu muamele, hücrenin kendi içindeki osmotik basınçtan daha düşük basınçlı bir solüsyon (örneğin; %1'lik sodyum sitrat veya %0.35-0.56'lık KCl) ile hücreleri açığa çıkarmayı ihtiva eder. Bu işlemde, hücreye su girer ve hücre şişer. Böylece kromozomlar birbirinden ayrılır. Bu işlemlerden sonra, hücre içi unsurların korunması amacıyla hücreler fiske edilir. Fiksasyon için, genellikle 3 kısım etanol veya metanol ve 1 kısım glasiyel asedik asit (Carnoy fiksatif) kullanılır. Fiske edilmiş hücreler bir mikroskop lamı üzerinde yayılır ve boyanır, daha sonra bu hücrelerin metafaz kromozomları ışık mikroskobu ile incelenir.

Türkiye'deki balıklar üzerinde günümüze kadar çeşitli araştırmacılar tarafından çok az sayıda araştırma yapılmıştır. Bir çalışmada, Dicle nehrinde yaşayan 8 Cyprinid türü üzerinde yaptığı karyolojik çalışmalarda *Alburnoides bipunctatus*'ta kromozom sayısını 2n=50; 16 metasentrik, 22 submetasentrik, 12 subteloakrosentrik ve NF=88, *Barbus rajanorum mystaceus*'da 2n=100; 22 metasentrik, 30 submetasentrik, 48 subtelo-akrosentrik ve NF=152, *Capoeta trutta*'da 2n=150; 20 metasentrik, 54 submetasentrik, 76 subteloakrosentrik ve NF=224, *C. capoeta umbla*'da 2n=150 ve 26 metasentrik, 58 submetasentrik, 66 subtelo-akrosentrik ve NF=234,

Cyprinion macrostomus'ta 2n=50; 6 metasentrik, 26 submetasentrik, 18 subtelo-akrosentrik ve NF=82, *Garra rufa obtusa*'da 2n=44; 16 metasentrik, 26 submetasentrik, 1 subtelosentrik, 1 akrosentrik ve NF=87 ve *Leuciscus cephalus orientalis*'te 2n=50; 14 metasentrik, 20 submetasentrik, 16 subtelo-akrosentrik ve NF=84 olarak bulunduğunu bildirmiştir (Gaffaroğlu, 2004). Gaffaroğlu M ve ark. (2004) *Pseudorasbora parva*'da kromozom sayısını 2n=50; 7 metasentrik, 10 submetasentrik, 8 subtelosentrik ve NF=100 olarak bulmuştur (407-409).

Orthrias tigris'in solungaç epitelinden elde edilen kromozomların incelendiği çalışmamızda ise kromozom sayısını 2n=50; metasentrik 16, submetasentrik 14, akrosentrik 20 ve NF=80 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar ile Kura-Aras havzasında yaşayan *Orthrias tigris*'in kromozom sayısı ve tipleri belirlenmiştir. Yapılan bu ve daha sonra yapılacak araştırmalardan elde edilen sonuçlar ile ekonomik değeri olan balıklarda ıslah, melezleme, mutajenite araştırmalarına ve ekolojik çalışmalara katkılar sağlayabileceği düşünülmektedir.

5. Kaynaklar

- Al-Sabti, K., 1991. Handbook of Genotoxic effects and fish chromosomes. J. Stefan Institute, Ljubljana, Yugoslavia, 221pp.
- Ayaz, M., 2004. Kars Çayı Balıklarının Taksonomik Yönden Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kars, 50.
- Cooper, D.N., 1983. Eukaryotic DNA methylation. *Hum. Genet.*, **64**, 315-333.
- Çolak, A., Sezgin, Ü., Süngü, S., 1985. Sazangiller (Cyprinidae) familyasına ait Beni Balığında *Cyprinion macrostomum* (Heckel, 1843) Kromozomal araştırmalar. *Doğa Bilim Dergisi*, Seri A₂, **19(2)**, 193-195.
- Gaffaroğlu, M., Yüksel E., 2004. *Cyprinion macrostomus* Heckel, 1843 (pisces:cyprinidae)'un karyotip analizi. Gazi Üniv. Kırşehir Eğitim Fakültesi, **5 (2)**, 235-239.
- Geldiay, R., Balık, S. 1996. Türkiye Tatlısu Balıkları. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları No:46 Ders Kitabı Dizini:16, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir.

- Gold, J.R., L, Y.C., Shipley, N.S., Powers, P.K. 1990. Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. *J. Fish Biol.*, **37**, 563-575.
- Karahan, A., 2007. Garra rufa ve Garra variabilis'in morfolojik ve sitogenetik yönden karşılaştırmalı olarak incelenmesi. Doktora Tezi, Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin, 123 .
- Kılıç Demirok, N., Ünlü, E., 2001. Karyotypes of Cyprinid fish *Capoeta trutta* and *Capoeta capoeta umbra* (Cyprinidae) from the Tigris river. *Turk J Zool.*, **25**, 389-393.
- MacGregor, J.T., Heddle, J.A., Hite, M., Margolin, B.H., Ramel, C., Salamone,
- Nanda, I., Scharl, M.N., Feichtinger, W., Schlupp, I., Parzefall, J., Schmid, M. 1995. Chromosomal evidence for laboratory synthesis of a triploid hybrid between the gynogenetic teleost *Poecilia formosa* and its host species. *J.Fish.Biol.*, **47**, 619-623.
- Nishikawa, S., Amaoka, K., Karasawa, T., 1971. On the Chromosomes of two species of eels (*Anguilla*). Chromosome Information Service No:12, Shiminoseki University of Fisheries, Shiminoseki, 27-28.
- Nishikawa, S., Amaoka, K., Karasawa, T., 1973. A Preliminary study on the chromosomes of *Cichlasoma citrinella* (Cichlidae; Pisces). Chromosome Information Service No:14 Shiminoseki University of Fisheries Shiminoseki, 32-33.
- Vicdanlı, S.M., 2007. Sinop yöresinde avlanan ekonomik öneme sahip bazı deniz balıklarında kromozom çalışmaları. Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, 130.
- Wong, A.K.C., Rattner, J.B., 1988. Sequence organisation and cytological localisation of the minor satellite of mouse. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 645-661.
- Yamazaki, F.A., 1971. Chromosome study of Ayu, Salmonoid Fish. *Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries.*, **37(8)**, 707-710.
- Yunis, J.Y. 1974. Human chromosome methodology. *Academic Press*, New York.