

Squalius cephalus (L., 1758)' un Nor Fenotipi Ve Sucul Ortam Ekotoksikolojik Çalışmalar Açısından Değerlendirilmesi (Kastamonu Beyler Barajı Populasyonu)

Sefa PEKOL^{1*}, Orhan ARSLAN²

¹ Kastamonu Üniversitesi Eğitim Fakültesi İlköğretim Bölümü Kastamonu

² Gazi Üniversitesi Gazi Eğitim Fakültesi Biyoloji Eğitimi Bölümü Ankara

*e-posta: spekol@kastamonu.edu.tr

Geliş Tarihi: 17/06/2015. Kabul Tarihi: 22/10/2015

Özet: Su ekosisteminde toksik, kimyasal ve diğer beşeri etkenlerin sitogenetik etkilerinin izlenmesi için balık uygun bir biyoidikatördür. Cyprinidae familyası Beyler Barajı (Kastamonu) Squalius cephalus (L.1758) populasyonlarının “One-Step” metoduna göre belirlenen NOR fenotipi subtelo ya da akrosentrik kromozomun kısa kollarında nokta şeklindedir. Genom başına düşen NOR sayısı ikidir. NOR nehir havzalarında kirletici karışımların biyolojik etkilerini değerlendirmek ve sucul ekosistemlerin ekolojik durumunu daha iyi karakterize etmek amacıyla kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: Squalius cephalus, NOR fenotipi, Ekotoksikoloji.

Abstract: The fishes are appropriate bioindicator for screening the cytogenetics effects of toxics, chemicals and human factors in aquatic ecosystems. NOR phenotype of subtelo or acrosentric chromosome short arms of the populations of Cyprinidae family Beyler Lake (Kastamonu) Squalius cephalus (L.1758) is point structure according to “One-Step” method. NOR number is two per genom. The NOR marker can be used in the evaluation of pollutant solution in river basin, for the better characterization of aquatic ecosystems.

Keywords: Squalius cephalus, NOR phenotype, Ecotoxicology.

Giriş

İnsanoğlunun suya bağımlılığı kadar suya olan çok yönlü etkisi göz ardı edilemez ekolojik bir gerçektir. Bu gün yeryüzündeki su kaynakları çok yönlü olarak beşeri faaliyetlerin etkisine maruz kalmış durumdadır.

Nehirler ve göller sanayi, tarım, kentsel su arıtma tesisi atıkları için kap şeklindedir. Bu atıkların bir kısmı bilinir ve etkileri tahmin edilebilir diğer yandan tanımlanamayan yada düzenli olmayan zehirli maddelerin biyolojik etkilerini tahmin edebilmek oldukça zordur (Ohe ve ark., 2004). Su kirliliğinin halk sağlığı ve ekosistemlerin korunması bakımından büyük bir önemi vardır. Nehirleri kirleten karışımların biyolojik etkisini değerlendirmek için havza ekosistemlerini ve sucul ortamın ekolojik durumunu karakterize etmek gereklidir. Akuatik organizmaların çeşitli kimyasal, fiziksel veya biyolojik kirleticilere maruz kalması genetik değişikliklere ve karsinogeneze neden olabilir (Osman ve ark., 2012). Bu etkenlerin biyolojik yöntemlerle etkisinin izlenmesi doğal populasyonlarda genetik çeşitliliğin korunması, varlığını sürdürmesi ve bu kirleticilerden kaynaklanabilecek çarpık genetik çeşitliliğe yol açan mutasyonlar açısından önemlidir (Würgler ve Kramers, 1992; Anderson ve Wild, 1994; Jha ve ark., 2000).

Toksik maddeye maruz kalma canlı hücrelerin DNA' sına zarar verebilir. Bu DNA lezyonları tamir edilmediği takdirde hücreyi, morfolojisini, hayvanı ve sonuçta topluluk ve populasyonu etkileyecek biyolojik sonuçları olan bir çağlayan başlatabilir (Lee ve Steinert, 2003). Ayrıca suda yaşayan organizmaların sağlığının değerlendirilmesi insanların gıda zincirine kanserojenlerin girmesini engellemek için de gereklidir (De Flora ve ark., 1991).

Tatlı su sistemlerinde kirliliği ve insan tüketim riski potansiyelinin tahmini için en belirleyici faktörlerden birisi balıktır (Papagiannis ve ark., 2004). Son on yıl içinde sucul ortamlarda toksik kimyasalların sitogenetik etkilerinin izlenmesi için uygun biyoidikatörler arasında balık popüler hale gelmiştir (Çavaş ve ark., 2003; Zhang ve ark., 2007; Polard ve ark., 2011; Omar ve ark., 2012; Vignardi ve ark., 2015).

Türkiye'nin biyoçeşitliliği ve zengin tatlı su ekosistemleri biyoizleme mekanizmalarının kurulması ve geliştirilmesini gerekli kılmaktadır. Bu bağlamda halk arasında Çay Balığı olarak isimlendirilen Squalius cephalus (L.1758) (Tatlısu kefalı) Avrupa ve Anadolu'daki bütün iç sularda büyük gruplar halinde yaşayan bir tatlı su balığı türüdür (Geldiay ve Balık, 1988).

Genetik özellikleri bakımından Squalius cephalus'un kromozom sayısı $2n = 50$ olarak tesbit

edilmiştir (Berberovic ve Sofradzija, 1972; Hafez ve ark. 1978; Al-Sabti, 1986; Pekol, 1999).

Beyler Barajı tatlı su kefalinin kromozom kol sayısı $NF= 80$ 'dir. Kromozom takımı 18 metasentrik, 12 submetasentrik, 20 subtelo-akrosentrik kromozomlardan oluşmaktadır. Kromozom büyüklükleri ise $1,5 \mu\text{m}-3,5 \mu\text{m}$ arasındadır (Pekol, 1999).

Ribozomal geni ihtiva eden DNA segmenti şeklindeki çekirdekçik organizatör bölgeleri (NOR), Ag-NOR olarak isimlendirilen özel bir gümüş boyama tekniği ile tespit edilebilen bölgelerdir (Pederson, 1998). Boyama kromozomlarda bulunan NOR bölgelerindeki nonhiston proteinin seçici olarak iyonik gümüş ile bağlanması ve gümüşün indirgenmesiyle koyu kahverengi veya siyah tonda renk alması esasına bağlıdır. (Gold ve ark., 1990).

Araştırmaya konu Leuciscinae'lerden üç Squalius türünde karşılaştırmalı moleküler sitogenetik analiz yapılmıştır. Squalius idus, Squalius cephalus ve Squalius squalius'un Polonya türlerinde gümüş boyama sonunda genellikle heteromorfik olan NOR bölgeleri yaygın olarak gözlenmiştir (Boron ve ark., 2009). Kromozom üzerindeki özel işaretleyici konumu nedeniyle NOR araştırmacılar tarafından farklı maksatlar için kullanılabilir. Amemiya ve Gold, (1990a) ve Gold (1984) NOR bölgeleri sistematik ve taksonomik işaretleyici olarak kullanmışlardır. NOR fenotiplerinin belirlenmesiyle özellikle tür içi ve türler arası varyasyonlar ortaya çıkarılmıştır (Galetti ve ark., 1984; Moreira ve ark., 1984; Amemiya ve Gold, 1986; Mayr ve ark., 1987; Thode ve ark., 1988). Tekstil fabrikasının atıklarına maruz kalmış Oreochromis niloticus balığındaki interfaz NOR bölgeleri incelenmiş, balık yüzgeç hücrelerinde interfaz Ag-NOR parametrelerinin azaldığı tesbit edilmiştir (Çavaş, Ergene-Gözükara., 2003). Günümüzde zararlı üretimin devamı ve suya karışması ile oluşan tehlike sebebiyle genotoksik potansiyelin araştırılması ve çevre kirliliğinin su ortamında izlenmesi önemli bir görev haline gelmiştir (Osman ve ark., 2012).

Bu çalışmada; Ag-NOR tekniği kullanılarak Cyprinidae familyasından Squalius cephalus (L.,1758)'un Kastamonu Beyler Barajı populasyonunda NOR fenotipinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod

Araştırmada S. cephalus (L.,1758)'a ait populasyon örnekleri Kastamonu ili Devrekani ilçesine ait Beyler Barajından temin edilmiştir.

Kromozomlar doğrudan yöntemle böbrek doku kullanılarak elde edilmiştir. Ön muamele için

balıklar kesilmeden önce eşey farkı gözetmeden % 0,1'lik kolşisin solüsyonu enjekte edilmiş, çıkarılan böbrek dokusu hipotonik çözelti (0,075 M) ile muamele edilmiştir. Santrifüj işlemi sonunda metanol-glasial asetik asit (3:1) karışımında fikse edilmiş, Pastör Pipeti ile lam üzerine alınmıştır. Havada kurutulmuş preparatlar Howell ve Black (1980)'in "One-Step" metoduna göre gümüş boyama yapılarak NOR'lar belirlenmiştir. Diploid kromozom sayısı (2n), temel kromozomların sayısı (NF), metasentrik (m), submetasentrik (sm), subtelosentrik (st) ve telo-akrosentrik (a) kromozomların ayırımı Levan ve ark. (1964)'na göre yapılmıştır.

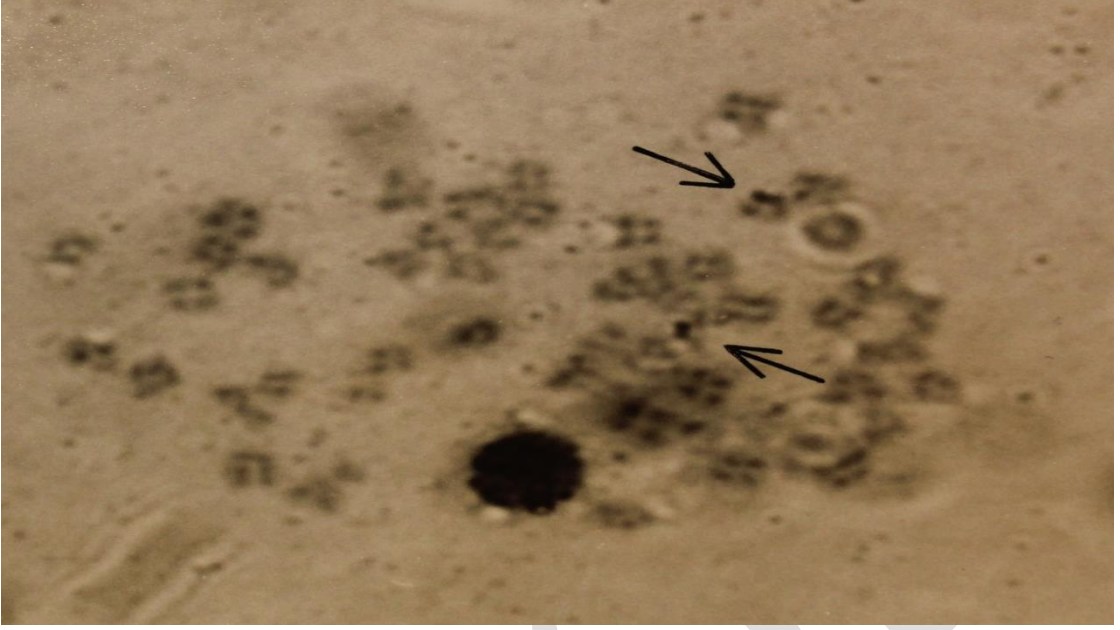
Sonuçlar

Beyler Barajı tatlı su kefalinden gümüş boyanmış 220 metafaz 34 balıktan elde edilmiştir. Kromozomal NOR'ların fenotipleri, genellikle subtelo yada akrosentrik kromozom üzerinde gözlenmiştir. Başlıca iki tipte fenotipik ayırım yapılabilmektedir.

"A" Tipi; Bir çift homolog subtelo yada akrosentrik kromozomun kısa kollarında nokta şeklindeki NOR'lar (Şekil 1).

"B" Tipi; Akrosentrik kromozomların bir tanesinin kısa kolunda nokta biçiminde görülen NOR'lardır (Şekil 2).

"A" tipi NOR lar Beyler poulasyonunda yaygın olarak gözlenmiştir.



Şekil 1. (Beyler Barajı *Squalius cephalus* Populasyonunda “A” Tipi NOR Fenotipi) (x 2050)



Şekil 2. (Beyler Barajı *Squalius cephalus* Populasyonunda “B” Tipi NOR Fenotipi) (x 2050)

Tartışma

Göstermiş olduğu NOR fenotipi sebebi ile *S. cephalus* oldukça plesiomorfik bir NOR karakterine sahiptir (Boron ve ark., 2009). Bu çalışmada *S. cephalus*'un Beyler Baraj Gölündeki populasyonunda NOR fenotipi bakımından genel olarak bir çift subtelo-akrosentrik kromozomun kısa kol uç kısmında nokta şeklindeki NOR pozisyonunun yaygın fenotipi oluşturduğu belirlenmiştir (Şekil 1). Bunun yanısıra büyük ya da küçük subtelo-akrosentrik kromozomlardan sadece bir tanesinin aktif olarak görüldüğü metafaz safhaları da mevcuttur (Şekil 2).

Cyprinidae familyasının geniş bir tatlı su alt familyası olan Leuciscinae karyotipleri arasında *Squalius cephalus*'ta gözlenen bir çift kromozomun kısa kollarında yerleşmiş olan NOR fenotipinin en yaygın ve özellikle küçük sub telosentrik kromozom çiftinin kısa kollarında olduğu bildirilmiştir. (Collares-Pereira ve ark., 1998; Rabova ve ark., 2003; Boron ve ark., 2009). Bu veriler çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular ile tam olarak uyumaktadır. Gümüş boyama ile orta büyüklükte bir submetasentrik kromozom çiftinin kısa kollarının üzerinde bulunan iki NOR (boyutu genellikle heteromorfik), çoğu Avrupa leuciscine cyprinidlerinde birleri ile tutarlı bir şekilde tespit edilmiştir (Rossi ve ark., 2012). Çalışmamızda bulduğumuz NOR fenotipleri elde edilen tutarlılığın devamı şeklindedir.

Avrupa Cyprinid'leri *Chondrostoma* türlerinde (Leuciscinae) sitogenetik ve ribozomal DNA kromozomları üzerinde NOR yerleşimlerinin bir çift sub metasentrik kromozomun kısa kollarında terminal konumda lokalize olduğu tespit edilmiştir (Pereira ve ark., 2012). Leuciscine Cyprinidlerin karyotipleri genellikle sm kromozom çiftinin kısa kollarındaki NOR' lar ile karakterize edilen ortak bir tek NOR fenotipine sahip olduğu bildirilmiştir (Ra' b ve ark., 1996; Collares-Pereira ve ark., 1998). Bir çift NOR bulunması bakımından çalışmamız uyumludur, fakat NOR bölgeleri bu çalışmalarda farklı kromozomlar üzerinde tanımlanmıştır. Bu farklılığın ana sebebinin kromozom hazırlama yöntemlerine ve preparasyon esnasında meydana gelen spiralizasyona bağlı olabileceği ileri sürülmektedir (Rab ve ark. 1989).

Allium cepa kök hücreleri çevresel etki değerlendirme araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Teerarak (2009) çeşitli etkenlerin sebep olduğu sitotoksik ve genotoksik etkilerin araştırılmasında *Allium cepa*' yı kullanmış, ayrıca bitkilerde de NOR fenotipinden yararlanılabileceğini göstermiştir. Balıkların

biyolojik ve genetik özelliklerinin çevre şartlarının değişimi karşısında etkilenme mekanizmalarının araştırılması ve izlenmesi günümüzde büyük önem kazanmış tatlı su ekosistemlerinde *Squalius cephalus* bir test organizması olarak çalışılmıştır (Güner ve Muranli, 2011; Banerjee ve ark.,2014; Schnurstein ve Braunbeck, 2001).

Bu çalışma ile belirlenen, Türkiye Cyprinid'lerinden *S. cephalus*' un NOR fenotipi temel sitogenetik bir marker olarak genetik yapının muhafazası, balık işletmeciliği, orijin kontrolleri, populasyon genetiği, balık ıslahı, sürdürülebilirlik gibi farklı amaçlı çalışmalarda kullanılabilir. Ancak tüm bunların dışında özellikle çevresel kaynaklı genotoksitenin uzun vadedeki olumsuz etkileri için erken uyarı sinyali niteliğinde bir veri olacaktır..

Kaynaklar

- Al-Sabti, K., 1986. Karyotypes of *Cyprinus carpio* and *Squalius cephalus*. *Cytobios*, 47: 19-25.
- Amemiya, C.T. and Gold, J.R., 1986. Chromomycin A3 stains nucleolus organizer regions of fish chromosomes. *Cpoeia*, 226-231.
- Amemiya, C.T. and Gold, J.R., 1990a. Cytogenetic studies in North American minnowvs (Cyprinidae). *Hereditas*, 112: 231-247.
- Anderson, S.L. , Wild, G.C., 1994. Linking Genotoxic Responses to Reproductive Success in Ecotoxicology. *Environmental Health Perspectives*, 102: 9-12.
- Banerjee P., Sarkar S., Dey T.K., Bakshi M., Swarnakar, S., Mukhopadhyay, A., Ghosh, S., 2014. Application of isolated bacterial consortium in UMBR for detoxification of textile effluent: Comparative analysis of resultant oxidative stress and genotoxicity in catfish (*Heteropneustes fossilis*) exposed to raw and treated effluents. *Ecotoxicology*, 23 (6): 1073-1085.
- Berberovic, Lj. and Sofradzija, A., 1972. Pregled podataka chromosomkim garniturama slatkovonih riba, Jugoslavie. *Ichthyologia*, 4: 1-21.
- Boron, Al., Porycka, K., Abe, S., Kirtiklis, L., 2009. Comparative molecular cytogenetic analysis of three *Squalius* species (Pisces, Cyprinidae) using chromosome banding and FISH with rDNA. *Genetica*, 135 (2): 199-207.
- Claxton, L.D., Houk V.S., Hughes T.J., 1998. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutat. Res.*, 410: 237-243.
- Collares-Pereira, M.J., Pro'spero, M.I., Bile' u, R.I., Rodrigues, E.M., 1998. *Squalius* (Pisces,

- Cyprinidae) karyotypes: transect of Portuguese populations. *Genet. Mol. Biol.*, 21: 1–13.
- De Flora, S., Bagnasco, S., Zancchi, M., 1991. Genotoxic, Carcinogenic and Teratogenic Hazards in the Marine Environment, with Special Reference to the Mediterranean Sea. *Mutation Research*, 258: 285-320.
- Çavaş, T., Ergene-Gözükarar S., 2003. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 538(1-2): 81-91.
- Galetti, P.M. Foresti, F., Bertollo, L.A.C. and Moreira, F.O., 1984. Characterization of eight species of Anostomidae (Cypriniformes) fish on the basis of the nucleolar organizer region. *Caryologia*, 37: 401-406.
- Geldiay, R. ve Balık, S., 1988. Türkiye Tatlısu Balıkları. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitapları Serisi, No: 97, E.Ü. Basımevi, 180s, Bornova-İzmir.
- Gold J.R., Shipley, N.S. and Powers, P.K., 1990. Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. *Journal of Fish Biology*, 37: 563-75.
- Gold, J.R., 1984. Silver-staining and heteromorphism of chromosomal nucleolar organizer regions in North American Cyprinid fishes. *Copeia*, 1: 133-139.
- Güner, U., Muranlı, F.D.G., 2011. Micronucleus test, nuclear abnormalities and accumulation of Cu and Cd on *Gambusia affinis* (Baird & Girard, 1853). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 11(4): 635-642.
- Hafez R., Labat R. and Quillier R., 1978. Etude cytogenetique chez quelques especes de cyprinides de la Region Midi-Pyrenees. *Bull. Soc. Hist. Nat., Toulouse*, 114: 85-92.
- Jha, A.N., Cheung, V.V., Foulkes, M.E., Hill, S.J., Depledge, M.H., 2000. Detection of Genotoxins in the Marine Environment: Adoption and Evaluation of an Integrated Approach Using the Embryo-Larval Stages of the Marine Mussel, *Mytilus edulis*. *Mutation Research*, 464: 213-228.
- Lee, R., Steinert, S., 2003. Use of the Single Cell Gel Electrophoresis/Comet Assay for Detecting DNA Damage in Aquatic (Marine and Freshwater) Animals. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 544: 43-64.
- Levan, A., Fredgy, K., Sandberg, A., 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201.
- Mayr, B., Kalat, M., Rab. P. and Lambrou, M., 1987. Band karyotypes and specific types of heterochromatin in several species of European percid fishes (Percidae, Pisces). *Genetica*, 75: 199-205.
- Moreira-Filho, O., Bertello, L.A.C. and Galetti, P.M. 1984. Structure and variability of nucleolar organizer regions in Paradontidae fish. *Can. J. Genet. Cytol.*, 26: 564-568.
- Ohe, T., Watanabe, T., Wakabayashi, K., 2004. Mutagens in surface waters: a review. *Mutat. Res.*, 567: 109–149.
- Omar, W.A., Zaghoul, K.H., Abdel-Khalek, A.A., Abo-Hegab, S., 2012. Genotoxic effects of metal pollution in two fish species, *Oreochromis niloticus* and *Mugil cephalus*, from highly degraded aquatic habitats. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 746(1): 7-14.
- Osman, A.G., Abuel-Fadl, K.Y., Kloas, W., 2012. In Situ Evaluation of the Genotoxic Potential of the River Nile: II. Detection of DNA Strand-Breakage and Apoptosis in *Oreochromis niloticus niloticus* (Linnaeus, 1758) and *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Mutation Research*, 747: 14-21.
- Papagiannis, I., Kagalou, I., Leonardos, J., Petridis, D., Kalfakaou, V., 2004. Copper and zinc in four freshwater fish species from Lake Pamvotis (Greece). *Environmental International*, 30: 357-362.
- Pederson, T., 1998. The plurifunctional nucleolus. *Nucleic Acids Res.*, 26: 3871-3876.
- Pekol, S., 1999. Beyler Barajında (Kastamonu) Yaşayan *Leuciscus cephalus*'un Karyotip Analizi. *Kastamonu Eğitim Dergisi*, 7 (1): 179-184.
- Pereira C.S. A., Ra' b, P., Collares-Pereira M. J., 2012. Chromosomes of European cyprinid fishes: comparative cytogenetics and chromosomal characteristics of ribosomal DNAs in nine Iberian chondrostomine species (Leuciscinae). *Genetica*, 140: 485-495.
- Polard, T., Jean, S., Merlina, G., Laplanche, C., Pinelli, E., Gauthier, L., 2011. Giemsa versus acridine orange staining in the fish micronucleus assay and validation for use in water quality monitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(1): 144-149.
- Ra' b, P., Karakousis, Y., Ra'bova', M., Economidis, P.S., 1996. Banded karyotype

- of cyprinid fish *Squalius borysthenicus*. *Ichthyol. Res.*, 43: 463-468.
- Ra'bova, M., Ra'b, P., Ozouf-Costaz, C., Ene, C., Wanzebo'ck, J., 2003. Comparative cytogenetics and chromosomal characteristics of ribosomal DNA in the fish genus *Vimba* (Cyprinidae). *Genetica*, 118: 83-91.
- Rab, P., Pokorny J. and Roth. P., 1989. Chromosome studies of Common Carp, *Cyprinus carpio*, I. karyotype of Amurain carp, *C. carpio haematopterus*. *Caryologia*, 42: 27-36.
- Rossi, A.R., Milana, V., Hett, A. K., Tancioni L., 2012. Molecular cytogenetic analysis of the Appenine endemic cyprinid fish *Squalius lucumonis* and three other Italian leuciscines using chromosome banding and FISH with rDNA probes. *Genetica*, 140: 469-476.
- Teerarak, M., Bhinija, K., Thitavasanta, S., Laosinwattana, C., 2009. The impact of sodium chloride on root growth, cell division, and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) in root tip cells of *Allium cepa* L. *Sci. Hort.*, 121: 228-232.
- Thode, G., Martinez, G., Ruiz, J.L, and lopez, J.R., 1988. A complex chromosomal polymorphism in *Gabius fallax* (Gabiidae, Perciformes), *Genetica*, 76: 65-71.
- Tokur, S., Zeybek, N. ve Kesercioğlu, T., 1988. Bitki tayininde sitotaksonominin önemi, *Anadolu Üniv., Fen-Edebiyat Fakültesi*, 1: 17-23.
- Vignardi, C.P., Hasue, F.M., Sartório, P.V., Cardoso, C.M., Machado, A.S.D., Passos, M.J.A.C.R., Santos, T.C.A., Nucci, J.M., Hwer, T.L.R., Watanabe I.S., Gomes, V., Phan, N.V., 2015. Genotoxicity, potential cytotoxicity and cell uptake of titanium dioxide nanoparticles in the marine fish *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766). *Aquatic Toxicology*, 158: 218-229.
- Würgler, F.E. and Kramers, P.G., 1992. Environmental Effects of Genotoxins (Eco-Genotoxicology). *Mutagenesis*, 7: 321-327.
- Zhang, X., Sun, H., Zhang, Z., Niu, Q., Chen, Y., Crittenden, J.C., 2007. Enhanced bioaccumulation of cadmium in carp in the presence of titanium dioxide nanoparticles. *Chemosphere*, 67: 160-166.