

## Akuakültürde Balık Embriyolarının Dondurularak Muhafaza Edilmesi

Doç. Dr. Yusuf BOZKURT

Y. Lis. Öğr. Uğur YAVUZ

Mustafa Kemal Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Hatay

### Özet

Akuakültürde gamet ve embriyo dondurulması, gerek soyu tükenmekte olan türlerin koruma altına alınması ve gerekse değerli damızlıkların genlerinin gelecek generasyonlarda değerlendirilebilmesi amacıyla son yıllarda oldukça önemli konu haline gelmiştir.

Günümüzde pek çok balık türünün sperması başarılı bir şekilde dondurulabilirken, yumurta ve embriyonun dondurulması ise henüz gelişme aşamasındadır. Balık yumurtalarının dondurulmasındaki problem, büyük ve yoğun yumurta sarısı içeriği ile farklı ozmotik geçirgenliğe sahip farklı tabakalardan oluşmasından kaynaklanmaktadır. Yine balık embriyolarının düşük ozmotik geçirgenliğe sahip olması ve 0°C'nin altındaki sıcaklık değerlerine çok az tolerans göstermesi bu biyoteknolojinin başarılı olması için aşılması gereken önemli noktalar arasında yer almaktadır.

Bu konuda yapılacak çalışmaların artırılması ile yurtdışında akuakültür alanında balık spermasında olduğu gibi dondurulmuş balık yumurta ve embriyo'nun kullanılabilir hale gelmesi ülkemiz için oldukça önemli kazanımlar sağlayacaktır.

### 1.Giriş

Su ürünleri yetiştiriciliği, hayvansal protein ihtiyacının karşılanabilmesi için günümüzde oldukça büyük boyutlara ulaşmıştır. Diğer taraftan su ürünleri yetiştiriciliği gelişimine paralel olarak bir takım sorunları da beraberinde getirmektedir. Su ürünleri yetiştiriciliğinde karşılaşılan önemli sorunların başında; gerek düzenli bir seleksiyon programının uygulanmaması gerekse işletme sahipleri tarafından

kâr amacıyla diğer işletmelerden bol miktarda döllenmiş yumurta ve yavru balık temin edilmesi nedeniyle işletme içerisinde genetik yapının uzun süre muhafaza edilememesi gelmektedir.

İşletmelerdeki söz konusu genetik varyasyondaki azalma; düşük yaşama ve büyüme oranı, yem dönüşüm etkinliğinde azalma, hastalıklara yakalanma riskinde artış ve yavru balıklarda ölüm oranının artması şeklinde kendini göstermektedir. Doğal olarak bunların sonucunda mevcut balık popülasyonu içerisinde arzu edilmeyen genetik varyasyonlar meydana gelmekte ve balıklarda bireysel olarak olması gereken önemli özellikler kaybedilmektedir (1).

Balıkların genetik potansiyeli, türler arası hibridizasyon ve gamet manipülasyonları yoluyla ıslah edilebilmektedir. Bu uygulamaların başında gamet ve embriyoların muhafaza edilerek korunması gelmektedir. Bu nedenle arzu edilen gen havuzlarının oluşturulmasını sağlamak amacıyla gamet ve embriyoların muhafaza edilmesi giderek büyük ilgi görmekte olup bu amaçla başlıca iki ana metot kullanılmaktadır.

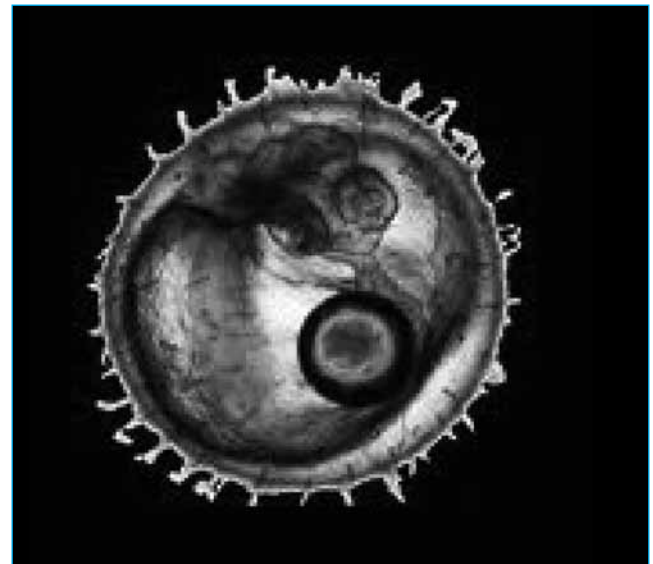
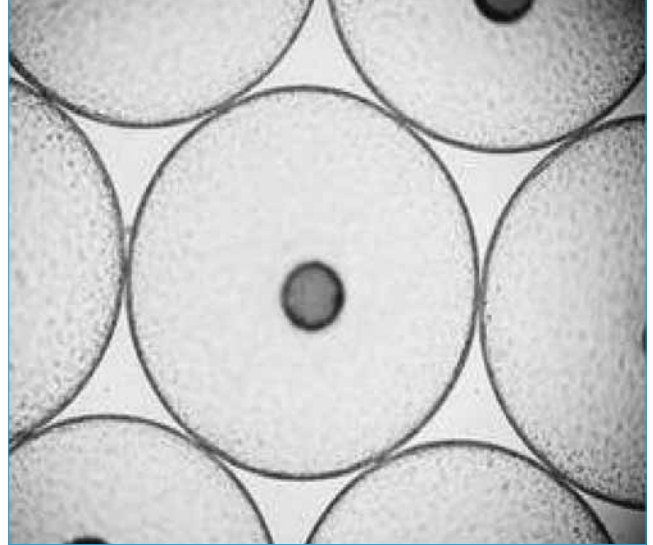
Bunlardan birincisi, balıkların havuzlarda muhafaza edilmesi suretiyle canlı gen bankalarının oluşturulmasıdır. Ancak canlı gen bankalarının gametlerin muhafazasında kullanılması iki önemli sorunda beraberinde getirmektedir. Bunlardan birincisi popülasyonun sahip olduğu genetik yapının meydana gelebilecek kayıplar nedeniyle uzun süreli muhafazanın garanti edilememesi ve ikinci olarak canlı gen bankalarında bu metodun oldukça masraflı olmasıdır (1).

Gamet ve embriyoların muhafaza edilmesinde yaygın olarak kullanılan diğer bir metot ise; dondurarak muhafaza yani kriyoprezervasyon yöntemidir. Balık yetiştiriciliğinde ileri ve yüksek üretim kapasitesi olan birçok ülkede balık üretiminde yeni biyoteknolojik yöntemler özellikle kriyoprezervasyon yöntemi giderek yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Sperm, yumurta ve embriyonun dondurularak muhafaza edilmesi ve ihtiyaç duyulduğunda tekrar kullanılabilmesine olanak sağlayan kriyoprezervasyon teknolojisi birçok canlı türünde uygulanmaktadır (2).

Doku ve hücrelerin kriyoprezervasyonu (süper soğuk sıcaklık derecelerinde dondurma işlemi) 1700'lü yıllardan itibaren bilim adamları tarafından uygulanmakta olan bir tekniktir. Hücrelerin uzun süre canlılığını muhafaza etmesine olanak sağlayan bu teknik 1900'lü yılların ortalarından itibaren solüsyonlara kriyoprotektant maddelerin ilave edilmesinin yararlı etkilerinin görülmesi üzerine Kriyobiyoloji bilimi hızlı bir şekilde gelişme kaydetmiştir. Bugüne kadar 200'den fazla balık türünün spermasına kriyoprezervasyon işlemi başarılı bir şekilde uygulanmasına rağmen bu tekniğin işletme koşullarında pratikte uygulanışı oldukça enderdir (1). Balık yumurta ve embriyolarının dondurularak muhafaza edilmesi ise son yıllarda araştırılmaya başlanmıştır.

Balık yumurtasının büyük bir hacme sahip olması, farklı ozmotik geçirgenliğe sahip membran tabakaları içermesi nedeniyle bu konuda yapılan çalışmalar oositler üzerinde yoğunlaşmaktadır. Diğer taraftan balık oositlerinde membran geçirgenliğinin kriyoprezervasyon için yeterli olmadığı, özellikle pelajik deniz balığı yumurtalarındaki aşırı su içeriğinin önemli bir sorun teşkil ettiği bildirilmektedir. Ayrıca oositin membran yapısı duyarlı olduğu için dondurma ve çözündürme işlemlerine karşı oldukça hassastır. Nitekim benzer şekilde, memeli oositleri üzerinde oositlerin dondurulması ve çözündürülmesi sonrasında yapılan IVF çalışmalarında düşük oranlarda fertilizasyon sonuçları elde edilmiştir (3). Yapılan çalışmalar oosit membran geçirgenliğinin başarılı bir kriyoprezervasyon işlemi için mutlaka geliştirilmesi gerektiğini ortaya koymuştur.

Balık yumurtalarının dondurularak muhafaza edilebilmesi üzerine yapılan çalışmalarda dondurma başarısının çok düşük olması, araştırmacıları embriyo ve embriyonun ileri safhalarını araştırmaya yönlendirmiştir.



## 2. Balık Embriyolarının Dondurulması

Balık embriyolarının dondurulması çok kompleks bir işlem olup; hücre içi ve dışı sıvı değişimini ve sıcaklığın embriyo üzerine olan etkisini içermektedir. Embriyo dondurma işlemi birçok farklı parametrelere dayanmakta olup bu parametrelerin bir bütün olarak algılanması ve çok dikkatli bir şekilde çalışılması gerekmektedir (4). Özellikle Gliserolün sperm hücrelerinin dondurulmasında başarıyla kullanılması, embriyolarında dondurularak saklanması için gerekli araştırmaların yapılmasının başlangıcını oluşturmuştur. İlk başarılı embriyo dondurma işlemi fare embriyolarında gerçekleştirilmiştir.

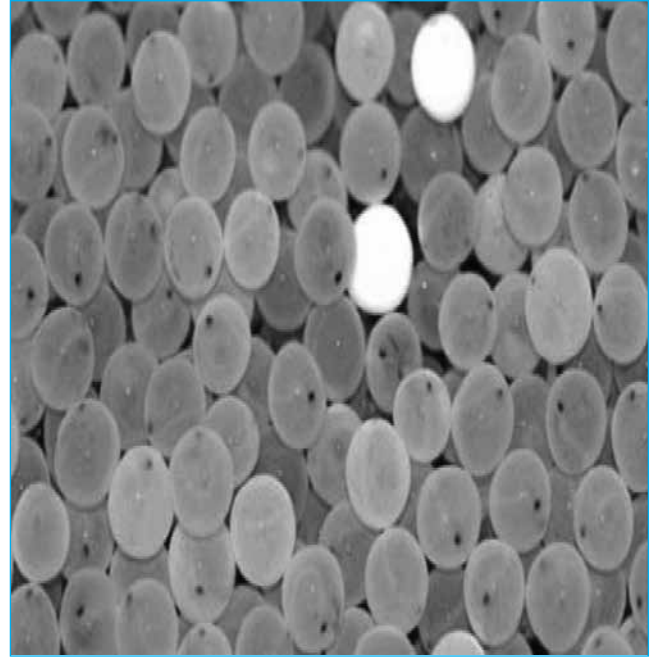
Embriyo dondurma ve çözme işlemi; embriyoların kriyoprotektanlarla dengelendikten sonra soğutulması ve  $-196^{\circ}\text{C}$ 'de sıvı nitrojen içerisinde depolanması ile embriyoların çözündürüldükten sonra kriyoprotektan ortamından uzaklaştırılarak gelişmelerinin sağlanabilmesi için özel kültür ortamlarına aktarılması işlemlerini kapsamaktadır (5).

Dondurma ve çözme işlemleri sırasında sıcaklık değişimi önemli bir faktör olup, kademeli dondurma sırasında kriyoprotektan etkinliğine bağlı olarak hücre dehidrasyonunun oluşması önemli bir noktadır (6). Balık embriyoları, iki seçici geçirgen kompartmandan oluşan kompleks bir yapıya sahiptir. Bu kompartmanlardan bi-



risi yumurta sarısı, diğeri de blastodermdir. [Hagedorn ve ark, (1997)] (7) yumurta sarısını saran zarın kriyoprotektanların yumurta sarısına ulaşmasına engel olan ana bariyer olduğunu belirtmişlerdir. Bazı araştırmacıların

bildirdiği gibi embriyo kriyoprezervasyonu için anahtar nokta embriyo geçirgenliğidir. (8, 9).



### 2.1. Embriyo Dondurulmasında Uygulanan Yöntemler

Kriyoprezervasyon işleminde kullanılan yöntemler; geleneksel yavaş dondurma, kademeli dondurma ve vitrifikasyon olarak üç grupta toplanmaktadır. Başlangıçta embriyoların dondurulmasında yavaş dondurma metodu kullanılmıştır. Bu yöntemde kullanılan cihaz ve gereçler sperma dondurma yöntemi ile benzerlik göstermekte olup genelde dondurma işlemi payetlerde gerçekleştirilmektedir. Kademeli dondurma yönteminde, embriyoların dondurulması için dondurma prosedürünün tüm aşamalarının monitörden kontrol edilebildiği bilgisayar destekli pahalı ve komplike cihazlara gereksinim vardır. Vitrifikasyon yönteminde ise, buz kristallerinin hiç şekillenmediği vitroz bir ortam oluşturularak hücrelerin, dokuların ve organların direkt olarak sıvı azot içerisinde dondurulmaları sağlanmaktadır. Bu yöntemde buz kristallerinin şekillenmediği bildirilmektedir (10).

Balık embriyolarındaki yumurta sarısı hacminin fazla olması ve düşük membran geçirgenliği, hücre içinden su atılımını ve kriyoprotektanların penetrasyonunu azaltmaktadır. Bu nedenlerden dolayı dondurma sırasında oluşan buz kristalleri embriyoya zarar vermektedir. Bu durum araştırmacıları yeni yaklaşımlara sevk etmiştir. Bu yaklaşımları; embriyoların membran yapılarının geçirgenliğinin artırılması ve yumurta sarısı kütlelerinin mikro manipülasyon ile ortamdan uzaklaştırılması şeklinde özetlemek mümkündür.

Yapılan bazı çalışmalar ışığında, balık embriyosunun yavaş dondurmaya uygun olmadığı anlaşılmıştır. Bu yüzden vitrifikasyon yönteminin araştırılması gerektiği düşüncesi önem kazanmış durumdadır. Bu yöntem memelilerde ba-

şarı ile kullanılmakta olup dondurma prosedüründe kullanılan solüsyonlar genellikle fazla oranda molekül ağırlığı yüksek olan kriyoprotektanlar içermektedir.

## 2.2. Embriyo Dondurma Prosedüründe

### Kriyoprotektan ve Antifriz Protein Kullanımı

Uygulanmakta olan tüm dondurma yöntemlerindeki temel prensip, dondurma ve çözdürme sırasında oluşabilecek hücre içi buz kristallerinin oluşumunu engel-

hem hücre hacmindeki değişiklikler azaltılmakta hem de embriyo hücreleri içerisindeki buz kristallerinin oluşumu minimum düzeye indirilerek dondurma işlemi sırasında hücreleri zarar görmesi en aza indirilmektedir.

Kriyoprotektan maddelerin spesifik miktarlarda olması, dondurma işleminin başarısı için kritik öneme sahiptir. Eşit olmayan ve tamamlanmayan penetrasyon embriyo için öldürücü etkiye neden olabilmektedir. Bazı



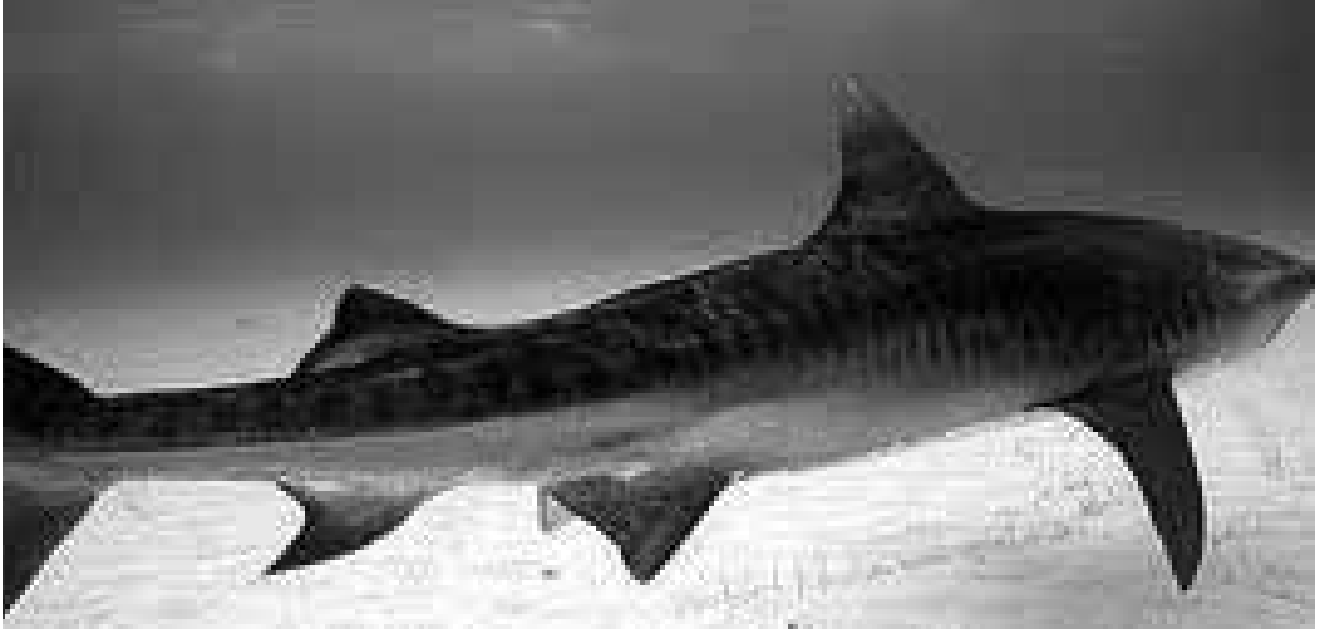
leyerek, hücrelerin buz kristallerinden görebilecekleri zararı önlemektir. Bunu sağlamak amacıyla hücre içi sıvısının, hücre membranından geçebilen ve hücrelere olabildiğince zararsız olan kriyoprotektan maddeler ile yer değiştirilmesi hedeflenmektedir. Dondurma ve çözdürme işlemlerinde hücrelerin zarar görmesini önlemek amacıyla, dondurma çözdürme solüsyonları içerisinde Kriyoprotektan adı verilen çeşitli kimyasal maddeler ilave edilmektedir.

Kriyoprotektanlar, dondurma ve çözdürme işlemleri sırasında hücrelerde oluşabilecek zararları önlemek amacıyla kullanılan kimyasal maddeler olarak tanımlanmaktadır (11). Kriyoprotektanlar genel olarak koruyucu etkilerini ortamdaki donmamış fraksiyonu artırarak ve ortamdaki iyon miktarını azaltarak göstermektedir. Kriyoprotektan maddeler, hücre membranından nüfuz edebilme özelliklerine göre internal ve eksternal olarak iki grupta incelenmektedir.

Donmanın gerçekleşmesinden önce, ozmotik basınç farkından dolayı embriyo hücreleri içerisindeki sıvı, kriyoprotektan maddeler ile yer değiştirmektedir. Böylece

araştırmacılar, balık embriyosunun farklı katmanlarını geçmek için mikroenjeksiyon tekniğinin en etkin yol olduğunu belirtmektedirler (12). Bu teknik, gen manipülasyonlarında ve gen transferi yoluyla transgenik canlı üretimi amacıyla yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca embriyo dondurulmasında membranlar arası geçirgenliği arttırmak için ultrason tekniğinin kullanılabileceği de bildirilmektedir (4). Yapılan çalışmalarda ultrasonun düşük frekansla muamelesinde embriyonun absorpsiyonunun arttığı belirtilmektedir. Bununla birlikte ultrason çalışmalarının da, geçirgenlik oranını ve kriyoprotektanların lokalizasyonunun nasıl sağlanacağına çalışılması ve geliştirilmesi gerektiği belirtilmelidir. Elektroprosyon ise, lipid katmalarındaki tek katlı geçirgenliği tersine çevirelebilen elektriksel bir teknik olarak tanımlanmaktadır. Elektroprosyon aynı zamanda elektro-osmozis yolu ile membranlar arası moleküler geçişi de değiştirmektedir (13).

Bunlara ilave olarak, Arktik balıklardan ekstrakte edilen antifriz proteinler, toksik olmamaları ve soğuğa karşı dayanımı artırmada yararlı etkileri nedeniyle yumurta ve embriyolara mikroenjeksiyon yoluyla dondur-



ma başarısını artırılması amacıyla kullanılmaktadır. Antiriz molekülleri, peptid ve glikopeptid yapısında olup buz parçacıklarına bağlanarak hücrelerin düşük sıcaklıklara dayanımlarını artırdığı ve hücreye zarar vermelerini engellediği bildirilmektedir (14).

### 2.3. Dondurulan Embriyoların Çözdürülmesi

Çözdürme işlemi, embriyoları taşıyan payetlerin sıvı azottan çıkarıldıktan sonra belirli sıcaklık derelerindeki su banyosu içerisine belirli bir süre daldırılması suretiyle gerçekleştirilmektedir. Kriyoprotektanların zararlı etkilerini ve hücre içi ortamda bulunabilecek küçük buz kristallerinin membran yapısına olan zararlı etkilerini önlemek amacıyla çözdürme aşamasında oldukça hızlı hareket edilmesi gerekmektedir (15).

Kriyoprotektanların ortamdaki uzaklaştırılması amacıyla sukroz, trehaloz veya galaktoz gibi hücre içerisine nüfuz edemeyen şekerler kullanılmaktadır. Çünkü bu maddelerin ortamda bulunması sonucu kriyoprotektan madde yoğunluk farkından dolayı dışarı çıkmaktadır (16).

### 3. Embriyo Dondurma İşleminde Dikkat Edilmesi Gereken Noktalar

Embriyo dondurma prosedüründe en kritik sıcaklık +15 ile -5 °C arasındaki sıcaklıklardır. Dondurma sırasında bu sıcaklık aralığına dikkat edilmelidir. Aksi takdirde buz kristalleri oluşmakta ve bu kristaller hücrelere zarar verebilmektedir. Dondurma prosedüründe kullanılan kriyoprotektan maddelerin hacimlerini düşürerek kristalleşmenin önüne geçilebilmektedir.

Dikkat edilmesi gereken bir başka nokta ise kriyoprotektanların toksik etkisidir. Kriyoprotektanların toksik etkisi, kullanılacak konsantrasyonun sınırlarını belirlemede ve dondurmaya karşı koruyucu özelliğini sınırlamaktadır. Toksik düzey, embriyonun gelişim aşamasına

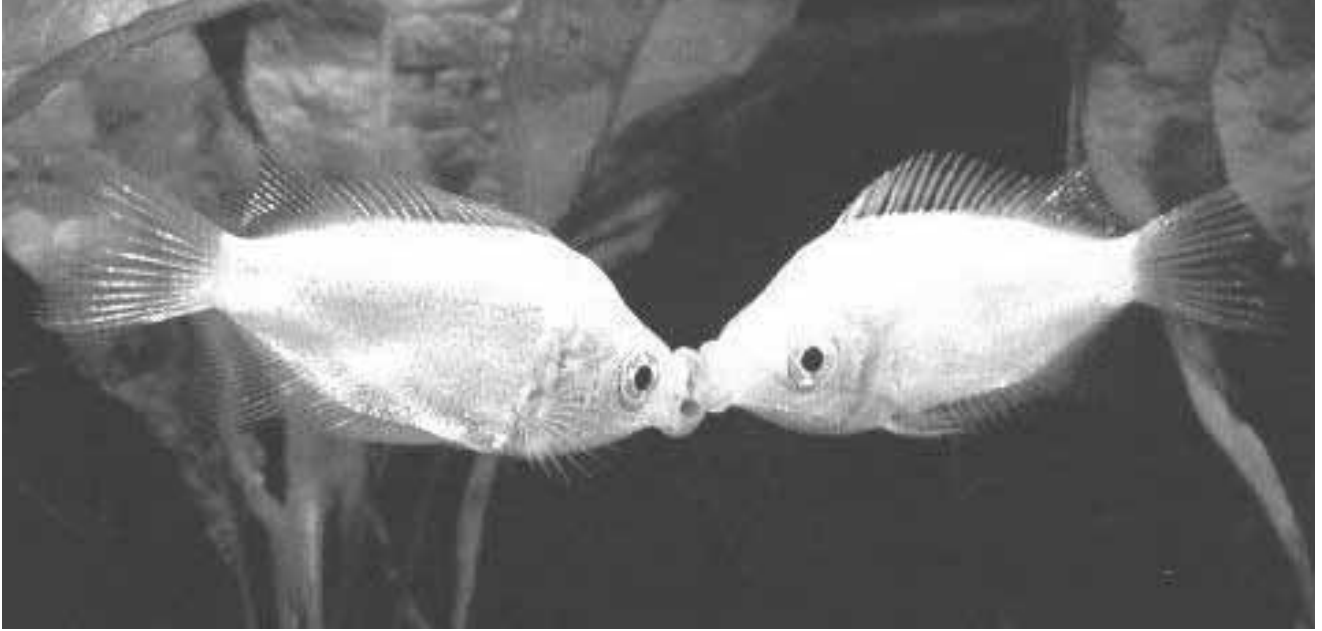
ve türe göre değişim gösterebilmektedir. Hangi kriyoprotektanın hangi konstarasyonda kullanılacağı, difüzyon katsayısı, toksik seviyesi, muamele süresi, donmaya karşı duyarlılık, uygun vitrifikasyon solüsyonlarının formüle edilmesi, dondurma ve çözdürme sıcaklıklarının türlere göre değişmesi embriyo dondurma başarısını düşük tutmaktadır (17).

Kriyo zararı ve kriyoprotektan maddelerin toksisitesini azaltmanın bir başka yolu da dondurma hızının artırılmasıdır. Yapılan bu çalışmalarda kriyoprezervasyon işleminde sulandırıcı ve kriyoprotektan etkileşiminin önemli olduğu, fertilizasyon oranlarının artırılabilmesi ve başarılı bir dondurma protokolü için farklı yönlerden araştırmaların tekrarlanması gerekmektedir (18).

### 4. Sonuç

Balık embriyolarının dondurulması akuakültür alanında gen bankalarının oluşturulması açısından büyük fayda sağlamaktadır. Balık embriyolarının dondurulması, mümkün olan en küçük alanda babadan (paternal) ve anadan (maternal) olan genetik materyalin taşınması ve saklanması gibi önemli bir avantaja sahip olması yanında aynı zamanda transgenik ve melez türler üretilmesine de olanak sağlamaktadır.

Balık üretim çiftliklerinde doğal şartlarda yılda bir-kez yavru alınırken, embriyo dondurulmasında başarıyla ulaşılabildiği bilinmektedir. Başarılı bir embriyo dondurma prosedürü aynı zamanda kuluçkahanelerde kullanılacak damızlık balık sayısını azaltarak işletme giderlerini düşürecektir. Sonuçta hastalıklara direnç ve reproduktif açıdan üstün bireylerin yetiştirilmesi sağlanmış olacaktır. Bu konuda yapılacak çalışmaların artırılmasıyla ülke ekonomisine katkı sağlanabileceği gibi akuakültür sektöründe önemli gelişmeler sağlanabilecektir.



#### Kaynaklar

- Bozkurt, Y., Seçer, S. (2005). Balık spermasının muhafazası. *Ziraat Mühendisliđi Dergisi*. 345: 38-41.
- Yavaş, İ. (2010). Balık spermasının dondurulması. *Ziraat Mühendisliđi Dergisi*. 354: 54-57.
- Dinnyes, A., Dai, Y., Jiangs, S., Yang, X. (2000). High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 63: 513-518.
- Bart, A.N. (2000). New approaches incryopreservation of fish embryos. In: Tiersch, T.R., Mazik, P.M. (Eds.), *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, pp. 179-187.
- Longzhen, Z., Xianting, L., Dachun, L., Songlin, C., Jianping, F. (1992) Effects of several factors on the survival rate of fish embryos pre-cryopreservation. *Changjiang Fisheries Institute. Chinese Academy of Fisheries Institute, Shashi, Hubei, China*, pp. 1-11.
- Zhang, T., Rawson, D.M. (1998). Permeability of dechorionated one cell and six-somite stage zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos to water and methanol. *Cryobiology*, 37: 13-21.
- Hagedorn, M., Hsu, E., Kleinhans, F.W., Wildt, D.E. (1997). New approaches for studying the permeability of fish embryos: toward successful cryopreservation. *Cryobiology*, 34: 335-347.
- Zhang T, Rawson DM (1996) Feasibility studies on vitrification of intact zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos. *Cryobiology*, 33: 1-13.
- Robles V, Cabrita E, Cunˆado S, Herraˆez, MP (2004) Effect of a vitrification protocol on the LDH and 6GPDH activities and the hatching rates of zebrafish and turbot embryos. *Theriogenology*, 61: 1367- 1379.
- Rall, Wf, Meyer, Tk. (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos. *Nature*, 313: 573-574.
- Palasz, A., Mapletoft, R. (1996). Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes. *Recent Adv. Biotechnol. Adv.* 14: 127-149.
- Janik, M., Kleinhans, F.W., Hagedorn, M. (2000). Overcoming a permeability barrier by microinjecting cryoprotectants into zebrafish embryos (*Brachydanio rerio*). *Cryobiology*, 41:25-34.
- Mitragotri, S., Blankschtein, D., Langer, R. (1995). Ultra-sound-mediated transdermal protein delivery. *Science*, 269: 850-853.
- DeVries, A.L. (1984). Role of glycopeptides and peptides in inhibition of crystallization of water in polar fishes. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 304: 575-588.
- Edashige, K., Asano, A., An T., Kasai, M. (1999). Restoration of resistance to osmotic swelling of vitrified mouse embryos by short-term culture. *Cryobiology*, 38: 273-280.
- Cseh, S., Horlacher, W., Brem, G., Corselli, J., Seregi, J., Solti, L., Bailey, L. (1999). Vitrification of mouse embryos in two cryoprotectant solutions. *Theriogenology*, 52: 103-113.
- Özgöray, E.D., Akçay, E. (2009). Deniz balıklarında sperma, yumurta ve embriyo dondurulması. *Lalahan Hay. Arast. Enst. Derg.* 50 (1): 53-64.
- Tekin, N., Seer, S., Akçay, E., Bozkurt, Y. and Kayam, S. (2007). Effects of glycerol additions on post-thaw fertility of frozen rainbow trout sperm, with an emphasis on interaction between extender and cryoprotectant. *Journal of Applied Ichthyology*. 23 (1), 60-63.