

Mogan Gölü'nde (Ankara) Yaşayan Kadife Balığının (*Tinca tinca* L., 1758) Karyotip Analizi ve İdiogramı*

Mustafa HAMALOSMANOĞLU, Mustafa KURU
Gazi Üniversitesi, Gazi Eğitim Fakültesi, Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı, Ankara - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 19.08.2002

Özet: Bu çalışmada Cyprinidae familyasından (*Tinca tinca* L., 1758)'nin kromozom sayısı ve yapısı araştırılmıştır. Araştırmada kullanılan balıklar laboratuvara getirildikten sonra kaslarına 1 ml/100 g % 0,1'lik Colchicine solüsyonundan enjekte edilmiştir. Dört saat sonra balıklar öldürülmüş, solungaçlarıyla böbrekleri çıkarılmış ve sitogenetik metotlar uygulanmıştır. Bu dokulardaki hücrelerin metafaz kromozomları sayısal ve morfolojik olarak incelenmiştir. Sonuçta 6 çift metasentrik, 8 çift subtelosentrik ve 10 çift akrosentrik kromozom olmak üzere, $2n = 48$ diploid kromozom tespit edilmiştir. Ortalama kromozom uzunluğu 2,191 μ olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara dayanarak kromozomların kol indeksleri, sentromer indeksleri ve oransal boyları ayrı ayrı hesaplanarak idiogram ve adlandırmaları yapılmıştır.

Anahtar Sözcükler: , Kadife, kromozom, karyotip, Mogan gölü

Karyotype Analyses of the Tench (*Tinca tinca* L., 1758) Living in Lake Mogan (Ankara)

Abstract: Chromosome numbers and structures were investigated in (*Tinca tinca* L., 1758) of the family Cyprinidae. A solution of 1 ml/100 g of 0.1% colchicine was injected intramuscularly. Four hours later the fish were killed and the kidney and gills were removed and cytogenetic methods were applied. Metaphase chromosomes of the cells in these tissues were investigated numerically and morphologically. It was determined that the fish have $2n = 48$ diploid chromosomes made up of 6 pairs of metacentric, 8 pairs of subtelocentric and 10 pairs of acrocentric. The average haploid chromosome length was 2.191 μ . The chromosomes were named and an idiogram was prepared according to the relative length of chromosomes and arm ratios as well as centromer indexes.

Key Words: *Tinca tinca*, tench, chromosome, karyotype, Lake Mogan

Giriş

Sazangiller familyasına (Cyprinidae) ait türler, ülkemiz tatlısularında çok yaygın olarak bulunmaktadır. İç sularımızda 27 familyaya ait 226 balık türü ve alttürünün yaşadığı tespit edilmiştir. Bunların 170'i tatlısularda yaşamaktadır. Bu balıkların 108'i de Cyprinidae familyasına aittir (1).

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 nüfusa paralel olarak besin ihtiyacının karşılanmasındaki sıkıntılar ve beyaz etin dünyaca kabul edilen besin değeri her geçen gün daha da önem kazanmaktadır. Bu nedenlerle yakın

zamanda yapay üretimin önemi daha çok artacak, 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 çalışılacaktır.

Memeli sitogenetiğinde yapılan çalışmalarla elde edilen başarılar, balık sitogenetiğinde yapılan çalışmalara ışık tutmuştur. 1960'dan beri balık sitogenetiğinde yeni metotların geliştirilmesine çalışılmıştır (2).

Sitogenetikte, omurgalıların en az çalışılanları balıklar olmuştur. Bunun sebebi çok sayıda ve oldukça küçük olan kromozomların metafazda iyi dağılmış olanlarının zor bulunmasıdır. Bununla birlikte bazı araştırmacılar çeşitli

* Bu çalışma Gazi Üniversitesi Araştırma Fon'u tarafından desteklenmiştir.

boyama teknikleri vasıtasıyla kadife balıklarının (*Tinca tinca*) karyotiplerini yapmaya çalışmıştır. Berberovic ve ark. (3) yeni bir teknikle karyolojik bir çalışma yapmışlar, Padilla ve ark. ise bilinen Giemsa-boyama metodunu kullanmışlardır (4).

Bu çalışmada, balık kromozomlarının karyotip analizleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara dayanarak kol indeksleri, sentromer indeksleri ve oransal boyları ayrı ayrı hesaplanmıştır (Tablo). Ayrıca idiogram (Şekil 1) ve karyogram (Şekil 2) yapılmıştır.

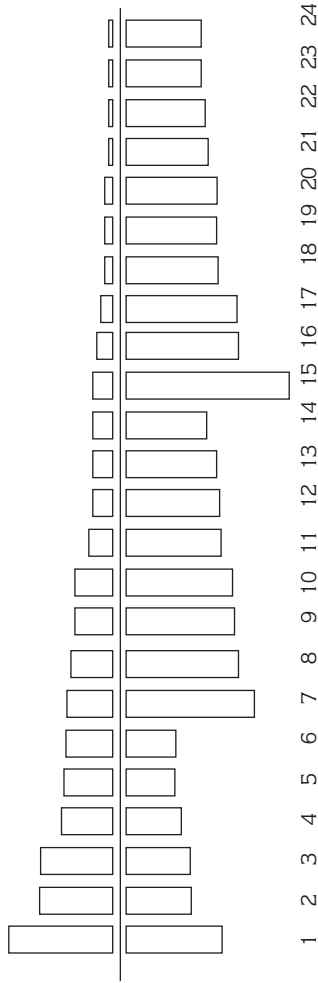
Materyal ve Metot

Laboratuvara getirilen balıklar daha önce hazırlanmış ve havalandırılmış akvaryumlara konulmuş ve yeterli besin verilmiştir. Bir hafta sonra akvaryuma uyum sağlayan balıkların kaslarının arasına balığın vücut ağırlığının her yüz gramı için % 1'lik colchicine'den 1 ml enjekte edilmiş ve enjeksiyondan sonra balıklar havalandırılmış akvaryuma alınmıştır. 3-4 saat sonra balıktan rejenerasyonun çok olduğu solungaçları ve böbrekleri alınmıştır. Solungaç epitel dokusu ve böbrek dokusu ayrı

Tablo. *Tinca tinca* (L., 1758)'nin Kromozom ölçüleri ve sentromer pozisyonları.

Kromozom Çiftleri	Uzun Kol (μ)	Kısa Kol (μ)	Kromozom Boyu (μ)	Kol indeksi	Sentromer indeksi	Oransal Boy	Sentromer Pozisyonu
1	1,848	1,794	3,642	1,030	49,259	6,927	M
2	1,277	1,234	1,511	1,035	49,144	4,776	M
3	1,254	1,224	2,478	1,025	49,395	4,713	M
4	1,067	0,862	1,929	1,238	44,686	3,670	M
5	1,001	0,792	1,793	1,264	44,172	3,410	M
6	0,993	0,780	1,773	1,273	43,993	3,372	M
7	2,383	0,771	3,154	3,091	24,445	5,999	St
8	2,070	0,670	2,740	3,090	24,453	5,212	St
9	2,023	0,654	2,677	3,093	24,430	5,092	St
10	1,982	0,630	2,612	3,146	24,119	4,968	St
11	1,793	0,398	2,191	4,505	18,165	4,167	St
12	1,717	0,334	2,051	5,141	16,285	3,901	St
13	1,685	0,331	2,016	5,091	16,419	3,835	St
14	1,484	0,324	1,808	4,580	17,920	3,439	St
15	2,981	0,354	3,335	8,421	10,615	6,343	T
16	2,058	0,255	2,313	8,071	11,025	4,400	T
17	2,019	0,210	2,229	9,614	9,421	4,240	T
18	1,683	0,156	1,839	10,788	8,483	3,498	T
19	1,656	0,149	1,805	11,114	8,255	3,433	T
20	1,645	0,117	1,762	14,060	6,640	3,351	T
21	1,491	0,099	1,590	15,061	6,226	3,024	T
22	1,401	0,089	1,490	15,742	5,973	2,834	T
23	1,378	0,059	1,437	23,356	4,106	2,733	T
24	1,343	0,056	1,399	23,982	4,003	2,661	T

Ortalama Kromozom Uzunluğu = 2,191 μ



Şekil 1. *Tinca tinca* (L., 1758)'nin İdiogramı.

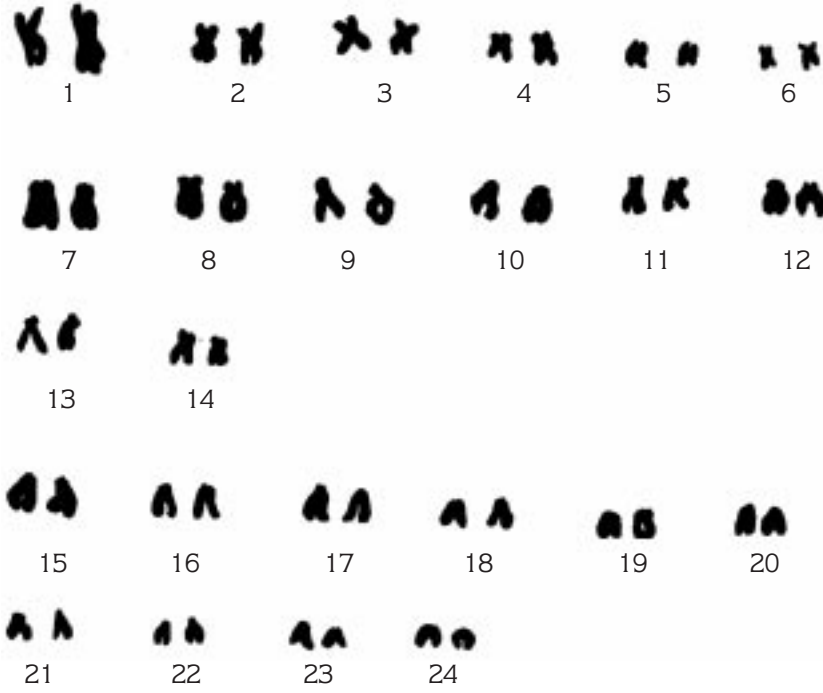
ayrı tüplere konularak üzerlerine KCl (0,075 M) solüsyonu eklenmiş ve 30 °C'de 45 dakika KCl içerisinde tutulmuştur. Böbrek ve solungaç dokularını içeren solüsyon 10 dakika 2000 rpm'de santrifüj edilmiş ve supernatant atılmıştır. Fiksasyonu sağlamak için, 3:1 metanol : asetik asit karışımından her tüp için 7 ml alınıp vakit kaybetmeden tüp içerisine dökülerek çalkalanmış ve kromozomların boyayı daha iyi kabul etmesi için bu fiksatifin 200 ml'si için 1-2 damla demir üç klorür'ün sudaki eriyiği ilave edilmiştir. 4 °C'de, 15 dakika bekletilen hücre süspansiyonu 10 dakika 2000 rpm'de santrifüj edilip supernatant atılmış ve bu işlem iki defa tekrarlanmıştır. Fiksatifler her seferinde taze olarak hazırlanmıştır. John ve John'un da (5) belirttiği gibi, tespit çözeltisinin değişikliğini son kez yapmadan önce materyal tekrar santrifüj edilmiş 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 lamlar üzerine yüksekten 1-2 damla bu solüsyondan damlatılarak iyice yayılması sağlanmıştır. Lamaların, ispiro ocağının alevi üzerinde 3-5 saniyelik periyotlarla tutularak fazla ısınmamasına dikkat ederek 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 tamamlanmış ve bu karışım her boyama için taze olarak hazırlanmıştır. Lamalar oda sıcaklığında 35 dakika boya solüsyonunda tutulmuş ve bu süre sonunda boyadan çıkarılarak 2 kez asetonda çalkalanmış, 1:1 aseton:ksilol karışımına batırılıp çıkarıldıktan sonra 2 kez ksilolde çalkalanıp son ksilol kabında 5 dakika tutulmuştur. Bu süre sonunda lamalar Kanada Balzamu ile devamlı hale getirilmiştir. Preparatlar mikroskopta incelenmiş ve uygun metafaz dağılımlarının fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 3).

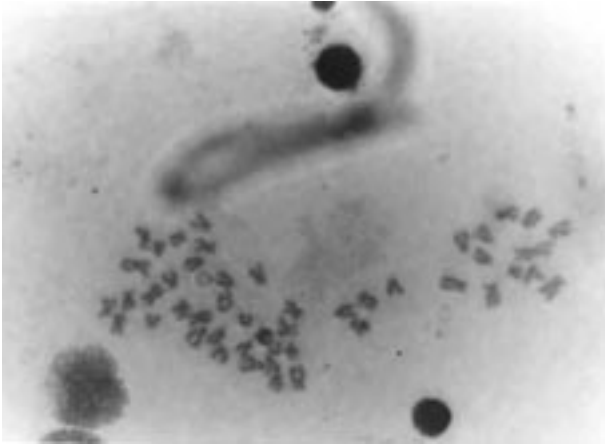
Bulgular

Bu çalışmada imkanlar ölçüsünde direkt yöntemin uygulanması tercih edilmiş ve çalışmalar bu yöntemle yapılmıştır.

Balıkların beslenmesinin ve su sıcaklığının artırılmasıyla balıkların aktivitelerinin ve dolayısıyla da mitoz bölünmelerinin 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 analizlerin zorlaştığı gözlenmiştir. Kromozom analizlerini yapmak için kullanılan böbrek ve solungaç epitel hücrelerinden yapılan preparatlarda yüksek oranda mitoz bölünme elde edilmiştir. Hipotonikle muameledeki süre 45 dakika olarak tespit edilmiştir. Bu sürenin altında muamele edilen hücrelerin yeteri kadar şişmediği, üstünde muamele edilen hücrelerin ise patladığı gözlenmiştir. Preparatların hazırlanması esnasında hücre solüsyonunun lam üzerine damlatma mesafesinin kromozomların dağılımında önemli bir etken olduğu gözlenmiş, bu çalışmada en iyi mesafenin



Şekil 2. *Tinca tinca* (L., 1758)'nin karyogramı.



Şekil 3. *Tinca tinca* (L., 1758)'nin mitoz kromozomları.

40-50 cm olduğu tespit edilmiştir. Preparatların boyanmasında kullanılan PBS'nin kromozomların boyanmasında etkili olduğu, PBS kullanılmadığında ise boyamanın analizi engellediği gözlenmiştir. Bu boya solüsyonunda boyamanın en iyi 35 dakikada gerçekleştiği tespit edilmiştir. Yapılan preparatlardaki inceleme sonucunda 193 adet metafaz dağılımından 74 adedinin fotoğrafı çekilmiştir. Bunlardan karyotip analizine uygun 5 alan değerlendirmeye alınmış ve bunun sonucunda *Tinca*

tinca'nın $2n = 48$ kromozoma sahip olduğu tespit edilmiştir.

Tablodan anlaşılacağı gibi en yaygın karyotip $2n = 48$ olarak % 72,97 oranında bulunmuştur. Karyotipte her kromozomun bir homoloğu bulunmaktadır ve 6 çift metasentrik (m), 8 çift subtelosentrik (st) ve 10 çift akrosentrik (a) kromozomdan oluşmaktadır. Ayrıca kromozom dağılışı asimetrik bir karyotip göstermiştir (Şekil 3). Kromozom boyları 1,399 μ ile 3,642 μ arasında değişmekte olup, ortalama kromozom uzunluğu 2,191 μ 'dur. Bu karyotipe ait karyogram Şekil 2'te, idiogram Şekil 1'de, kromozom ölçüleri ve Sentromer pozisyonları Tablo'da verilmiştir.

Tartışma

Giemsa boyama yöntemi kullanılarak *Tinca tinca* (L., 1758)'nin 24 çift homolog kromozoma sahip olduğu bulunmuştur. Bu 24 çift homolog kromozomun 6 çiftinin metasentrik, 8 çiftinin subtelosentrik ve 10 çiftinin ise akrosentrik kromozom olmak üzere $2n = 48$ diploid kromozom olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3).

Schreck ve Moyle'e (6) göre, kromozom preparatları hazırlamak için metafaz hücrelerinin iyi bir kaynağı olan

bölünen dokular (embriyonik dokular, solungaçlar, böbrekler, bağırsaklar, pul epitelleri ve fibroblastlar) tercih edilmelidir.

Balıkların farklı türleri farklı kromozom takımları içerir. Bu yüzden balıklarla ilgili çalışmalarda farklı yöntemler kullanılmıştır. Fakat temel aynıdır (7). *Tinca tinca* (L., 1758)'da uygulanan bu metotla solungaç epitelinin, böbrek dokusuna göre daha iyi sonuç vermesi Berberovic ve ark. (3), Rukhsana ve Malgorzata (8), Padilla ve ark. (4), Çolak ve ark. (9)'nın çalışmalarının sonuçlarıyla farklılık göstermektedir. Bu farklılığın sebebi ön muamelede kullanılan maddenin niteliği ve uygulamadaki değişiklikler olabilir. Bu çalışmada mitotik inhibitör Rukhsana ve Malgorzata (8), Padilla ve ark. (4), Gül ve ark. (10)'nın çalışmaları ile uyum göstermektedir. Çalışma sırasında intramuskular enjeksiyonun çok küçük balıklarda uygulanmasının çok zor olduğu ve yeterli dozun balığa enjekte edilemediği gözlenmiştir. Ergene ve ark.'nın uyguladığı değişikliğe uğratılmış havada kurutma tekniği ile solungaç epitelinden yüksek sayıda metafaz elde edilmiştir (11). Padilla ve ark. (4) boyama için Giemsa boyama ve Ag boyamayı kullanmışlar, bunun sonucunda ise 8 çifti metasentrik, 13 çifti subtelosentrik

ve 3 çifti akrosentrik olmak üzere 24 çift kromozom olduğunu, bunlardan da 3 çiftinde satellit bulunduğunu belirtmişlerdir. Çalışmalarında daha fazla detaya inmemişler ve kromozom boylarına ait bir bilgi vermemişlerdir. Ancak bu çalışmada daha detaylı bilgiye ulaşılmıştır. Buna göre kromozomların asimetrik bir karyotip gösterdiği (Şekil 3) tespit edilmiştir.

Bu çalışma sonucunda bulunan diploid kromozom sayısı Berberovic ve ark. (3) ve Padilla ve ark. (4) ile benzerlik göstermektedir. Bu çalışmada satellitli kromozoma rastlanılmamıştır. Bunun sebebi metottaki farklılıklar olabilir. Bu iki çalışma sonucunda elde edilen kromozom morfolojileri arasında uyum sağlanamamasına rağmen, kromozom sayısı bakımından uyum sağladığı gözlenmiştir. Bu farklılığın sebebinin çalışmada kullanılan balıkların değişik bölgelere adaptasyon sağlamasından kaynaklandığı söylenebilir.

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

Kaynaklar

1. Kuru, M., Balık, S., Ustaoglu, M.R., Ünlü, E., Taşkavak, E., Gül, A., Yılmaz, M., Sarı, H.M., Küçük, F., Kutrup, B., Hamalosmanoğlu, M.: Türkiye'de Bulunan Sulak Alanların Ramsar Sözleşmesi Balık Kriterlerine Göre Değerlendirilmesi, T.C. Çevre Bakanlığı Çevre Koruma Genel Müdürlüğü ve Gazi Üniversitesi Vakfı, 2001, Ankara.
2. Denton, T.E.: Fish Chromosome Methodology, Charles C. Thomas Publishers USA, 1973, 166 p.
3. Berberovic L.J., Safradzija A., Wagner L.J.: The Chromosomes of the Tench (*Tinca tinca*), Ichthyologia, 1978; 10: 9-15.
4. Padilla, J.A., Fernandez-Garcia, J.L., Rabasco, A., Martinez-Trancon, M., Rodriguez de Ledesma, I., Perez-Regadera, J.J.: Characterization of the Karyotype of the Tench (*Tinca tinca* L.) and Analysis of Its Chromosomal Heterochromatic Regions by C-banding, Ag-staining and Restriction Endonuclease Banding Cytogenet. Cell Genet. 1993; 62: 220-223.
5. John, R., John, G.: A Method to Increase Mitotic Metaphase Spreads and Permanent Chromosome Preparation for Karyotype Studies in Fishes, Aquaculture Hungaria (Szarvas), 1986; 5: 31-36.
6. Schreck, C.B., Moyle, P.B.: Methods for Fish Biology, American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA, 1990, pp. 171-190.
7. Klinkhardt, M.B.: A Brief Comparison of Methods for Preparing Fish Chromosomes: An Overview, Cytobios, 1991; 67: 193-208.
8. Rukhsana, A., Malgorzata, J.: Spontaneous Triploid common carp (*Cyprinus carpio* L.) in a Farm Population, Cytobios, 1994: 78: 153-190.
9. Çolak, A., Sezgin, İ., Süngü, Y.S.: Sazangiller Familyasına (Cyprinidae) Ait Beni Balığında (*Cyprinion macrostomus* Heckel, 1843) Kromozomal Araştırmalar, Doğa Bilim Derg., 1985; A2: 193-195.
10. Gül, S., Çolak, A., Sezgin, İ.: Gümüş Balığı, *Chalcalburnus mossulensis* (Heckel, 1843)'de Sitogenetik İncelemeler, IX. Ulusal Biyoloji Kongresi, 1988, Cilt 1., 21-23 Eylül.
11. Ergene S., Kaya, F., Pekcan, İ., Oral A.: A Karyological Analysis of *Oreochromis niloticus* (L., 1758) (Pisces, Cichlidae) Used in Aquaculture, FISHECO 98, The Proceedings of the First International Symposium on Fisheries & Ecology, 2-4 September 1998, 191-195, Trabzon/TURKEY.